

TRABAJO DE FINAL DE GRADO

Grado en MEDICINA



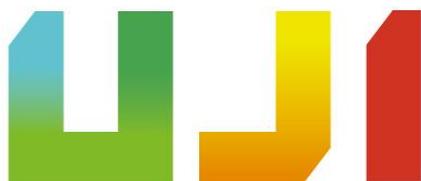
**Terapia génica ad-REIC
en pacientes con cáncer
de próstata,
¿En qué punto nos
encontramos actualmente?**

Autor: Carlos García Martí

Promoción 2012-2018

Director/a: Ana María Sánchez Pérez

Fecha de lectura: Mayo 2018



**UNIVERSITAT
JAUME I**

ÍNDICE

1. Índice.....	1
2. Hoja de firma del tutor/a en el que éste/a certifique que autoriza la presentación del trabajo, y que el estudiante lo ha desarrollado a lo largo de 6 créditos ECTS (150 horas).....	2
3. Abreviaturas.....	3
4. Resumen.....	4
5. <i>Abstract</i>	5
6. <i>Extended Abstract</i>	6-8
7. Introducción (antecedentes, justificación, objetivos).....	9-19
8. Métodos.....	20-25
○ Criterios de selección de los estudios	
○ Estrategia de búsqueda	
○ Extracción de datos	
○ Evaluación de la calidad metodológica	
○ Análisis y síntesis de la evidencia científica	
9. Resultados.....	26-33
10. Discusión.....	34-36
11. Conclusiones de los autores.....	37
12. Referencias utilizadas y Estudios.....	38-40
13. Anexos.....	41-43

HOJA CERTIFICADO

**TRABAJO DE FIN DE GRADO (TFG) - MEDICINA**

EL/LA PROFESOR/A TUTOR/A hace constar su **AUTORIZACIÓN** para la Defensa Pública del Trabajo de Fin de Grado y **CERTIFICA** que el/la estudiante lo ha desarrollado a lo largo de 6 créditos ECTS (150 horas)

TÍTULO del TFG:

Terapia génica ad-REIC en pacientes con cáncer de próstata, ¿en qué punto nos encontramos actualmente?

ALUMNO/A: Carlos García Martí

DNI: 53725332T

PROFESOR/A TUTOR/A:

Ana María Sánchez Pérez



Fdo (Tutor/a):

ABREVIATURAS

- **REIC:** Reduced expression in immortalized cells, expresión reducida en células inmortales.
- **Ad:** Adenovirus, adenovirus
- **Dkk-3:** Dickkopf-3, Dickkopf-3
- **ER:** Endoplasmic reticulum, retículo endoplasmático
- **CPRC:** Castration-resistant prostate cancer, cáncer de próstata resistente a castración
- **mCPRC:** Metastatic CPRC, CPRC metastásico
- **CTLs:** Cytotoxic lymphocytes, linfocitos T citotóxicos
- **PSA:** Specific prostate antigen , antígeno prostático específico
- **RP:** Radical prostatectomy, prostatectomía radical
- **NK:** Natural killer, natural killer
- **DL:** Dosis level, nivel de dosis
- **BRFS:** Biochemical recurrence free-survival, supervivencia a recidiva bioquímica
- **ETR:** Transrectal echography, ecografía transrectal
- **IL-7:** Interleukin-7, interleukina-7
- **PrSC:** Stromal prostate cells, células estromales prostáticas
- **PrEC:** Epithelial prostate cells, células epiteliales prostáticas

RESUMEN:

Introducción: actualmente la recidiva bioquímica tras prostatectomía del cáncer de próstata al igual que el cáncer de próstata resistente a castración con o sin metástasis son dos entidades cuya tasa de supervivencia tras el tratamiento convencional con quimioterapia y/o castración bioquímica es muy baja. Nuevas estrategias terapéuticas surgen ante esta situación y la terapia génica ad-REIC es una de ellas. **Objetivos:** la finalidad de esta revisión es evaluar la eficacia de dicho tratamiento y saber en qué punto nos encontramos. **Métodos:** la revisión incluye dos ensayos clínicos aleatorizados no controlados reclutados a partir de una búsqueda estructurada en *Pubmed*. Para la síntesis de los resultados se elaboró una tabla resumen y se evaluó la calidad metodológica analizando y sintetizando, al mismo tiempo, las evidencias que se presentaban. **Resultados:** de los dos ensayos revisados obtuvimos una seguridad y factibilidad aptas para avanzar a fases más maduras del proceso de investigación, destacando la dosis-dependencia para su eficacia y las evidencias genéticas, inmunológicas y bioquímicas. **Conclusión:** debido a la inmadurez de la línea investigadora podemos concluir que el camino a seguir es positivo y resulta imprescindible llevar el proceso a fases más avanzadas del ensayo clínico gracias a los resultados en fases anteriores.

Palabras clave: Cáncer de próstata, ad-REIC, terapia génica neoadyuvante

ABSTRACT

Introduction: Nowadays high-risk localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy and castration-resistant prostate cancer with or without metastasis are two entities whose survival rate after conventional treatment with chemotherapy or androgen blockage is quite low. New techniques arise in this situation and gene therapy ad-REIC is one of them. **Targets:** The objective of this review is to evaluate the efficacy of this treatment and to know what the situation right now is. **Methods:** the review includes two random not controlled clinical trials taken from a structured research in *Pubmed*. To summarize the results, a data table was created and, on the other hand, the methodological quality was evaluated analysing and synthesizing, at the same time, the evidences that were presented. **Results:** from the two reviewed trials, we obtained an adequate safety and feasibility to advance to more mature phases of the research process, underlining the dose-dependence for its efficacy and the genetic, immunological and biochemical evidences. **Conclusion:** Due to the immaturity of the research line, we can conclude that the way forward is positive and it is essential to take the process to more advanced stages of the clinical trial thanks to the results in previous phases.

Key words: Prostate cancer, ad-REIC, neoadyuvant gene therapy

Extended summary

Introduction

Prostate cancer is the most common cancer in men and the second most common cancer in general after lung cancer. Nowadays, high-risk localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy and castration-resistant prostate cancer with or without metastasis are two entities whose survival rate is quite low. The current therapeutic strategies, such as androgen deprivation therapy, radiation, and cytotoxic chemotherapy, often fail to stop the progression of the disease we discuss. Therefore, novel and capable therapies against prostate cancer are urgently needed.

Cancer cells adjust the apoptotic and metastatic malignant processes by producing both positive and negative effectors and a number of proteins display potent anti-cancer effects involved in these procedures. REIC/Dkk-3, a member of the Dickkopf (Dkk) gene family known to meddle with Wnt signalling, plays a peculiar role in apoptosis induction and invasion/motility inhibition in cancer processes. These findings strongly hint that REIC/Dkk-3 is a tumor-suppressor gene and an attractive therapeutic protein to inhibit prostate cancer progression. Moreover, it is known the antineoplastic process that REIC does and this is related to the secretion of IL-7 that produces antitumor immunity through the activation of NK cells and to the monocytes differentiation to dendritic cells and, consequently, the augmentation of the CTLs, improving the antitumor systemic immunity.

Gene therapy has been utilized in clinical trials for human diseases and it is considered to have a novel and attractive therapeutic potential. Specifically for the treatment of prostate cancer, through COS-TPC method, adenovirus-mediated gene delivery has been well reported and indicates a marked advantage in terms of a high transduction efficacy. Therefore, to develop ad-REIC as a new class of therapeutic cancer vaccine, a remarkable quantity of clinical trials from a phase I/IIa study of in situ Ad-REIC gene therapy for prostate cancer are being developed.

The target of this review is to analyse the efficacy of the treatment, including the safety and the feasibility, and see in what point we are.

Methodology

Regarding the methodology used, a research in different sources like Pubmed, UpToDate or Cochrane Library was carried out. "Ad-REIC" was the key Word used with the inclusion and exclusion criteria to find the two last clinical trials that we included in a final table of the review.

Afterwards, a descriptive analysis of the different papers was brought on in a summary chart, consisting of different sub-parts: autor, date, kind of study, website or magazine.

In addition, a methodological assessment of the clinical trials included in the review was conducted according to Manual Cochrane 5.1.0./part 2 and CasPe criteria. To summarize, GRADE system was used to give a synthesis of the studies and generate some recommendations shared with the conclusions.

Results

A total of eighteen patients were studied in the final random not controlled clinical trials, without any significant difference between them. They were patients with high-risk localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy.

On the one hand, safety and feasibility were confirmed by the absence of fever or other liver disorders in the majority of the patients. Moreover, neither intraoperative nor postoperative complications related to the neoadjuvant treatment with ad-REIC were observed, illustrating, again, safety profiles of *in situ* ad-REIC treatment. No adenoviral DNA in blood was detected in almost all the patients either.

On the other hand, histopathological evaluation of RP patients was discovered to be the most reliable form of measurement. PSA levels, cytokines, B cells, T cells, NK cells and CD4⁺ were not regarded as reliable parameters for the evaluation of the clinical outcome with the treatment with ad-REIC.

Biochemical recurrence free survival (BRFS) of each dose group was compared using the Kaplan-Meier survival analysis, demonstrating BRFS in DL-4, the highest doses, was significantly more favourable than in DL-1+2+3 group patients. Consequently, it was obvious that multitrack injections to multiple target cancer areas with an enough and safe dose of ad-REIC were clearly effective for successful neoadjuvant gene therapy.

Conclusion and discussion

Neoadjuvant therapy is popularly accepted in the treatment of patients with locally advanced or localized high-risk solid cancers like breast cancer, for example. In prostate cancer, however, the beneficial effects on pathological and clinical outcomes in the case of treatment with neoadjuvant androgen deprivation therapy and chemotherapy with or without androgen deprivation therapy did not joint to improved disease free survival or overall survival. Neoadjuvant therapy with androgen deprivation therapy and chemotherapy is not currently recommended in those patients who have high-risk localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy. Therefore, *in situ* immune gene therapy has a

highly regarded potential to offer a new option for neoadjuvant therapy by generating indirect systemic antitumor effects.

In the present neoadjuvant study, it is believed that the evidence of simultaneous induction of selective killing of cancer cells and augmentation of antitumor immunity by Ad-REIC has been successfully established. Enrolled RP patients after two intratumoral Ad-REIC injections, tumour degeneration with cytolysis and pyknosis and striking TILs in significant areas of the targeted tumour regions were detected in a clear dose-dependent manner.

In this review of phase I/IIa clinical trials, it was used one track injection to the most prominent cancer area in the firstly planned DL-1+2 plus DL-3 groups and three track injections to multiple target cancer areas in the DL-4 group. Because of it, BRFS in DL-4 was significantly more favourable demonstrating an unexpected outcome of Ad-REIC to be a promising neoadjuvant therapy for high-risk localized prostate cancer. At this point, it is obvious that multitrack injections to multiple target cancer areas with an enough dose of Ad-REIC are essential for prosperous neoadjuvant therapy. Although further studies are needed to circumscribe the optimal dose, dosing interval and number of doses, the present technique using three track injections of Ad-REIC is regarded as one of the recommended options.

To sum up, in order to offer more reliable recommendations, the results have been favourable but, it is necessary to carry out more trials and that ones in more advanced phases, presenting at the same time some methodological improvements such as the increase in the sample and the introduction of a control group. Finally, due to the limitations that arise in the search of articles because of the limited number of results using the different inclusion and exclusion criteria, it can be a conclusion that this genetic therapy called ad-REIC is in premature phases and there is still a long path in their research and investigation lines.

INTRODUCCIÓN

El adenocarcinoma prostático es el tumor maligno más frecuente del aparato genitorinario masculino y el segundo en frecuencia general, después del pulmonar ^{1,2}. El 95% de los carcinomas prostáticos son adenocarcinomas originados en la zona periférica de la próstata, es una enfermedad frecuente en hombres mayores de 60 años y, puede cursar tanto asintómicamente como provocando síntomas obstructivos, hematuria o dolor óseo, coagulopatías, mieloptisis y compresión medular, estos últimos en consecuencia de su metástasis ³.

Su diagnóstico es clave para el tratamiento, para ello utilizaremos técnicas como el tacto rectal o la detección de marcadores tumorales importantes tales como el PSA (Antígeno prostático específico). Ante cualquier anomalía, tal como un aumento de PSA mayor de 4 ng/ml, presencia de nódulos regionales o un tacto rectal sospechoso se realiza una biopsia confirmatoria. Una vez confirmada la sospecha se utilizan técnicas radiológicas como una ETR (Ecografía transrectal), tomografía computerizada, resonancia magnética o gammagrafía ósea para determinar el estadio TNM (*Tabla 1*) del cáncer en ese justo momento. La T, con sus diferentes subtipos numerados en primera estancia y con letras en segunda, se referirá al tamaño y extensión del tumor principal, la N a la extensión del cáncer que se ha diseminado a los ganglios (o nódulos) linfáticos cercanos y la M a si el cáncer se ha metastatizado ³. La *Tabla 1* se centra en la clasificación tumoral en base al tumor primario y todos los subtipos identificados.

TNM: Tumor primario – Clínico (T)	
TX	El tumor primario no puede evaluarse
T0	Sin evidencia de tumor primario
T1	Tumor no evidenciado clínicamente mediante tacto rectal o diagnóstico por imágenes
T1a	Hallazgo histológico incidental de tejido tumoral en ≤ 5% del total de la muestra reseçada
T1b	Hallazgo histológico incidental de tejido tumoral en > 5% del total de la muestra reseçada
T1c	Tumor identificado mediante punción biopsia con aguja (por ejemplo, debido a un PSA elevado)
T2	Tumor confinado a la glándula prostática ^a
T2a	Tumor confinado a ≤ 50% de un lóbulo prostático
T2b	Tumor confinado a > 50% de un solo lóbulo prostático
T2c	Tumor que compromete ambos lóbulos prostáticos
T3	Tumor que se extiende a través de la cápsula prostática ^b (implica extensión extracapsular, no solo contacto capsular)
T3a	Extensión extracapsular (uni o bilateral)
T3b	Tumor que invade vesícula(s) seminal(es)
T4	Tumor fijo o que invade estructuras adyacentes: pared pelviana, recto, esfínteres externos, vejiga o músculos elevadores (excepto vesículas seminales)

PSA: antígeno prostático específico.
^aEl tumor que se encuentra en uno o ambos lóbulos mediante biopsia con aguja, pero que no se palpa o detecta mediante imagenología, se clasifica como T1c.
^bLa invasión hacia el ápice prostático o hacia la cápsula prostática (pero no más allá) no se clasifica como T3, sino como T2.

Tabla 1. Estadificación TNM del cáncer de próstata ³.

Por otro lado, el adenocarcinoma prostático, con frecuencia, es multifocal y presenta poblaciones en distinto grado de diferenciación. En esta heterogeneidad se

basa la clasificación de Gleason (*Figura 1*), que asigna una puntuación de 1 a 5, según el patrón histológico de cada una de las dos poblaciones más representativas de la masa biopsiada, sumando ambas puntuaciones para obtener un resultado final de 2 a 10³.

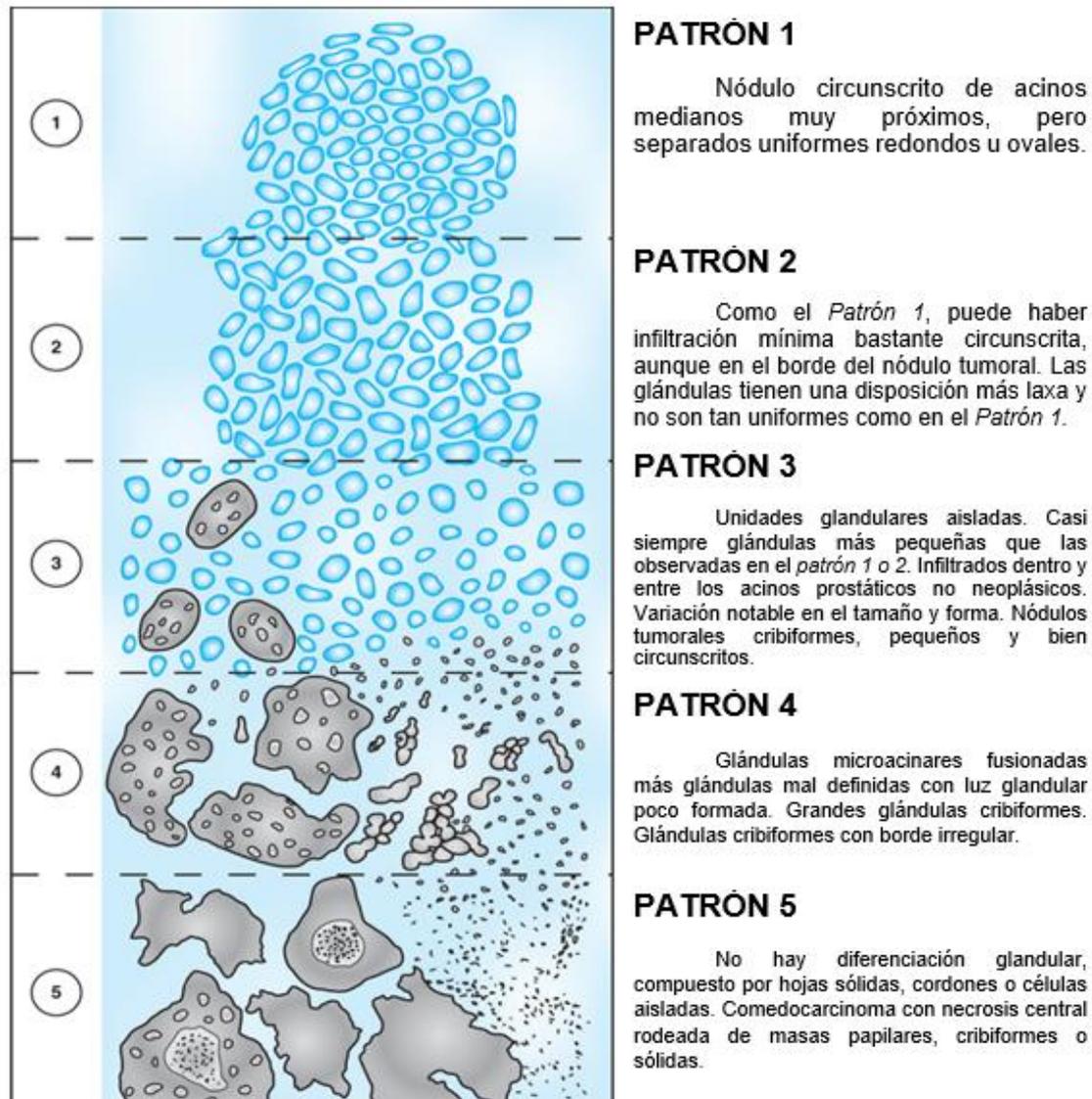


Figura 1. Clasificación de Gleason. En Lange, diagnóstico clínico y tratamiento (p. 39), por Patricia A. Cornett, MD; Tiffany O. Dea, 2015, 54e, México DF.

Cabe destacar la existencia de otros modelos predictivos importantes como el normograma de Kattan (*Figura 2*) que incorpora al mismo tiempo el estadio clínico, la clasificación de Gleason a través de la biopsia diagnóstica y los niveles de PSA en el sérum antes del tratamiento para predecir la recidiva bioquímica 5 años después del tratamiento quirúrgico basado en la prostatectomía radical⁴.

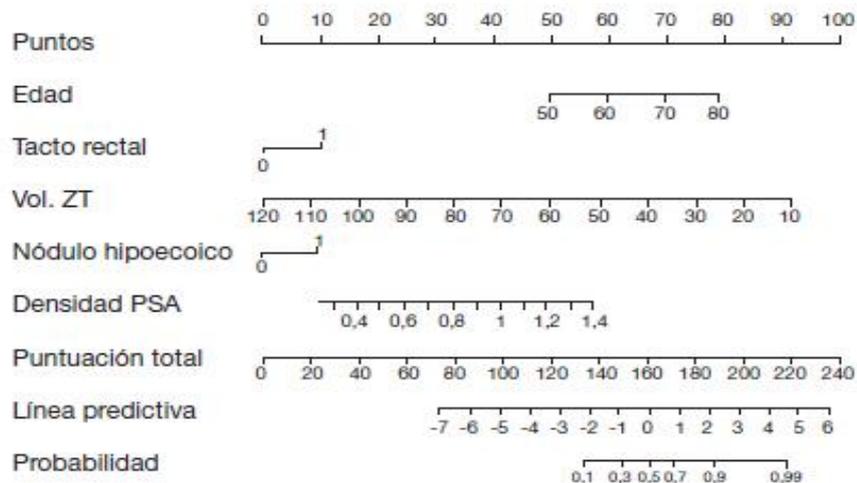


Figura 2. Normograma de Kattan ⁵.

Entre las diferentes opciones terapéuticas para el tratamiento del cáncer de próstata se encuentran la radioterapia, la quimioterapia, la cirugía basada en la prostatectomía radical y la hormonoterapia o comúnmente llamada castración química, cada una de estas opciones dependerá del estadio de la enfermedad. La técnica óptima y única para reducir la mortalidad del paciente enfermo de cáncer de próstata es la prostatectomía radical, acompañada de linfadenectomía íleo-obturatriz en caso de riesgo medio-alto de la enfermedad ^{3, 6, 7}.

En la actualidad muchas formas de cáncer de próstata escapan al tratamiento aumentando la tasa de mortalidad entre los pacientes. Entre otros, el cáncer de próstata resistente a castración (CPRC) es bastante común, con una alta morbilidad, y es padecido por hasta el 10-20% de los pacientes. Además, las metástasis se encuentran presentes en más del 84% de los casos de CPRC, y la supervivencia en los pacientes con CPRC y metástasis (mCPRC) es de 9-13 meses ^{3, 8}. En contraposición, también existe riesgo de recidiva tumoral tras tratamiento con prostatectomía radical, hasta un 30%, sospechando así, la existencia de metástasis a distancia o de la propia recidiva a nivel local, comúnmente llamada recidiva bioquímica ^{3, 9}. A pesar de las mejoras en el aumento de la supervivencia del paciente con el tratamiento convencional de quimioterapia y/o castración química, tanto mCPRC como la recidiva tumoral siguen sin cura y el incremento de la calidad de vida del paciente tratado con estas terapias sigue siendo un reto ^{3, 8, 9}.

Actualmente, están surgiendo nuevas formas de tratamiento neoadyuvante, entre las cuales destaca la terapia génica, basada en la manipulación de la expresión génica para combatir la patología oncológica ¹⁰.

A día de hoy, se ha desarrollado un abanico amplio de estrategias en terapia génica del cáncer, y se están llevando a cabo diversos ensayos clínicos para tratar diferentes tipos de cáncer: de mama, ovario, cabeza y cuello, pulmón, próstata, células renales, tumor cerebral, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, linfomas, melanoma, mieloma múltiple y neuroblastoma ¹¹. Por ello, las diferentes terapias génicas se pueden diseñar o bien para mejorar el sistema inmune con “vacunas de ADN anti-tumorales”, o bien silenciando dentro de las mismas células tumorales la expresión de oncogenes. También pueden inducir la expresión de genes supresores del crecimiento, para provocar la apoptosis de estas células tumorales. Como veremos a continuación, en otras estrategias, el uso de adenovirus mutantes se utiliza para provocar la apoptosis de tumores sólidos ^{12, 13, 14}.

En esta revisión nos centramos en la innovadora terapia ad-REIC/dkk-3 basada en la utilización de un vector derivado del adenovirus, codificando el gen REIC o dkk-3, el cual contiene potencial antineoplásico ¹⁵.

En terapia génica se utilizan, entre otros, vectores derivados de adenovirus para introducir el material genético a las células. El adenovirus es un virus de cadena doble de DNA que, como vector, tiene muchas ventajas como la eficiencia en la infección y expresión génica. Su principal inconveniente es la alta respuesta inmune que induce en el huésped y que puede llegar a ser perjudicial para su salud y bienestar ¹⁶.

El método más utilizado y eficiente para la recombinación del genoma del adenovirus con el gen REIC/dkk-3 es el método denominado COS-TPC (Figura 3) ¹⁷. Este procedimiento está basado en el uso de, por un lado, un cósmido de DNA recombinante con el gen

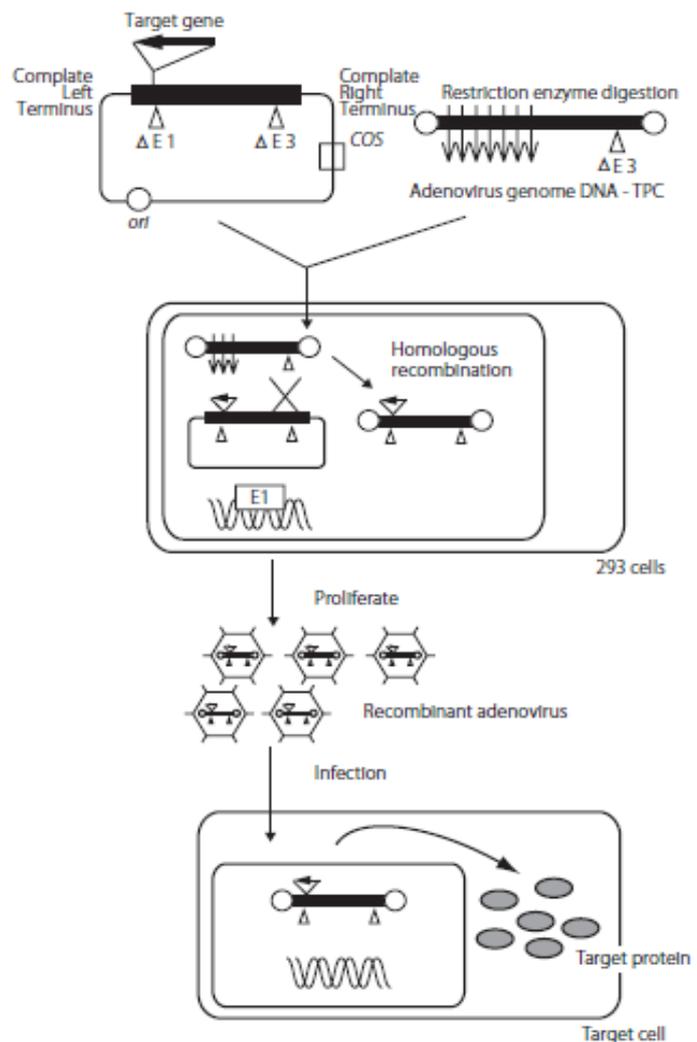


Figura 3. Generación de adenovirus recombinantes mediante el método COS-TPC ¹⁷.

terapéutico REIC/dkk-3 que debe llevar la señal de empaquetamiento para el adenovirus y, por otro lado, la construcción de genoma del adenovirus en la que se ha delecionado la señal de empaquetamiento y el gen viral E1. Finalmente se utiliza la línea celular 293, que son las células empaquetadoras que contienen integrado en su genoma el gen E1, para la replicación viral. La célula empaquetadora se transfecta con estos dos constructos, que recombinarán para dar lugar a una molécula híbrida que contiene el gen terapéutico con la señal de empaquetamiento. Lógicamente, los transcritos que no llevan la señal de empaquetamiento no van a ser encapsulados, solo el material genético en sí y, en consecuencia, el gen terapéutico. Las células 293 empaquetan el cósmido con el ADN viral y el gen terapéutico en la cápside y las partículas víricas se aíslan y se purifican para su uso curativo ¹⁶. Dado que las proteínas expresadas por la región E1 son imprescindibles para la expresión de otros genes virales y la replicación del adenovirus, su delección implica que el adenovirus recombinante sea defectivo para su multiplicación impidiéndose, así, que pueda replicarse y amplificarse, es decir, ser infeccioso tras su administración; y añade, además, un elemento de seguridad evitando la mutagénesis a pesar de dar lugar a expresión a corto plazo, lo que significa la necesidad de muchas administraciones ^{18, 19}.

Al igual que los genes p53 y MDA7/IL-24, el gen REIC/dkk-3 es un gen supresor de tumores. Este gen de la familia Dickkopf se localiza en el cromosoma 11p15.1 ²⁰ y actúa de forma pleiotrópica por la vía de los receptores WNT, encargados del crecimiento y la diferenciación celular. En otras muchas ocasiones están relacionados con el cáncer, de hecho, el gen REIC/dkk-3 se encuentra pobremente expresado en muchos procesos tumorales humanos ^{21, 22, 23}.

La proteína codificada por REIC/dkk-3 es un tipo de proteína N-glicosilada que normalmente es secretada ²³. El mecanismo por el cual REIC induce apoptosis cuando se sobre-expresa en células cancerosas se ha estudiado en muchos estudios en modelos animales ^{21, 22, 25-27} y se resume en la *Figura 4* ²⁴. Las células cancerígenas donde se induce la expresión de REIC, no lo secreta sino que lo acumulan en su forma prematura (U-REIC/dkk-3) en el retículo endoplasmático, hecho que provoca la apoptosis por estrés de retículo que estimula las caspasas vía JNK ^{23, 28}. En contraposición, en las células no cancerosas existe una alta resistencia a la apoptosis mediada por ad-REIC ya que observamos una respuesta diferente de estrés celular, el estrés del retículo no induce apoptosis en células normales sino que induce la secreción de interleukinas (IL-7) por la vía p38, STAT1 e IRF1 ²¹. Este aumento de IL-7 actúa en el sistema inmunitario mejorando su respuesta anticancerígena activando las células natural Killer (NK), que, destacan por su habilidad para reconocer y matar células

tumorales o infectadas por virus y bacterias, sin necesidad de antígeno sensibilizante. Las células NK, tienen la capacidad de diferenciar las células infectadas por un virus, o las células tumorales puesto que éstas pierden los receptores MHC de clase I que inhiben a las células NK ²⁹.

Por otra parte, en el tratamiento con Ad-REIC tanto las células cancerígenas como las normales (éstas en mayor medida) secretan proteínas REIC/Dkk-3 (Figura 4) lo que provoca la diferenciación de monocitos en células dendríticas que a su vez estimulan a los linfocitos T citotóxicos (CTLs) que regulan la inmunidad antitumoral sistémica, es decir, producen efectos antitumorales en lesiones locales y distantes ²³.

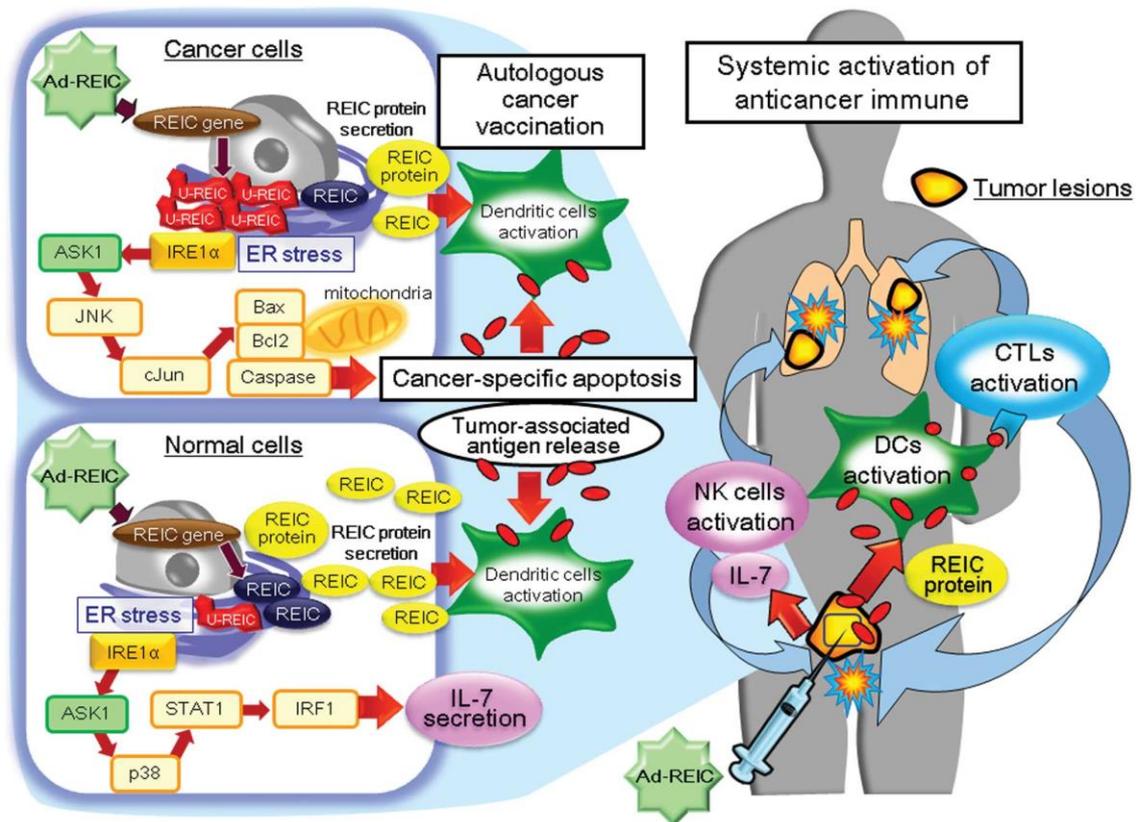


Figura 4. Mecanismo terapéutico del tratamiento con Ad-REIC intratumoral. Ad, adenovirus; REIC, reduced expression in immortalized cells; JNK, c-Jun N-terminal kinase; ER, endoplasmic reticulum; Dkk-3, dickkopf-3; U-REICs, unfolded REIC/Dkk-3 protein; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; Bax, Bcl-2-associated X protein; STAT1, signal transducer and activator of transcription 1; IRF1, interferon regulatory factor 1; IL, interleukin; TAAs, tumor-associated antigens; DC, dendritic cell; CTLs, cytotoxic T lymphocytes; NK, natural killer ²³.

Además, estudios recientes demuestran un mecanismo biológico más en el tratamiento con ad-REIC, basado en la reducción de la expresión de la oncoproteína CD147 lo que provoca la inhibición del crecimiento de células prostáticas cancerígenas

Para identificar el mecanismo de apoptosis de REIC en células tumorales se han utilizado, en gran medida, líneas celulares derivadas del cáncer de próstata como PC3, DU145 y LNCaP y aquellas del tejido normal prostático: PrEC (epitelial) y PrSC (estromal). En estas se utilizan distintas técnicas de inmunodetección (Inmunohistoquímica, inmunofluorescencia o el Western Blot o inmunoblot) para detectar la expresión de REIC/dkk-3^{22, 23, 25-30}. Estos métodos permiten visualizar las proteínas de interés mediante la marcación con el uso de anticuerpos primarios y secundarios apropiados. Como se observa en la *Figura 5*, REIC se encuentra expresado en las células estromales y epiteliales normales no cancerígenas (PrSC y PrEC) mientras que la reducción de la expresión de la proteína REIC/dkk-3 es visible en las líneas células prostáticas cancerígenas, e incluso, de otros tipos de cáncer²⁸.

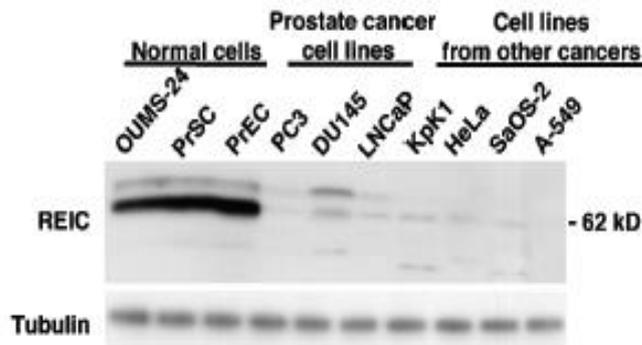


Figura 5. Western blot sobre los niveles de REIC. La tubulina se usa como control de carga²⁸.

Una vez tratadas las células cancerígenas con ad-REIC, el aumento de proteínas REIC/dkk-3 en las diferentes líneas celulares cancerígenas se evalúa mediante Western Blot. En el caso de la *Figura 6* vemos la expresión de la proteína REIC/dkk3 en la línea celular prostática cancerígena PC3 36 horas después del tratamiento con dosis ad-REIC²⁸. Del mismo modo, el aumento de la expresión de las proteínas del proceso de apoptosis que se producen al tratar con ad-REIC se identificaron mediante Western Blot^{23, 25-30}.

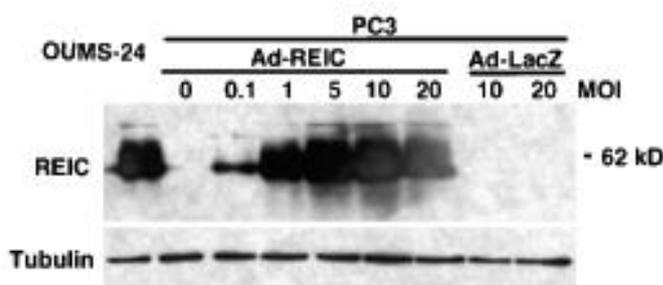


Figura 6. Niveles de REIC post-tratamiento con ad-REIC. La tubulina se usa a modo de control interno²⁸.

En otros estudios, *in vivo* se analizó la distribución de REIC en diferentes tejidos mediante la técnica de PCR comparando grupos de ratones a los que se les había

inyectado ad-REIC intravenoso o intraprostático (*Figura 7*), como resultado la inoculación intraprostática tiene una distribución a altas dosis mucho más alta que la intravenosa, con la excepción del cerebro (*Tabla 2*)²⁶.

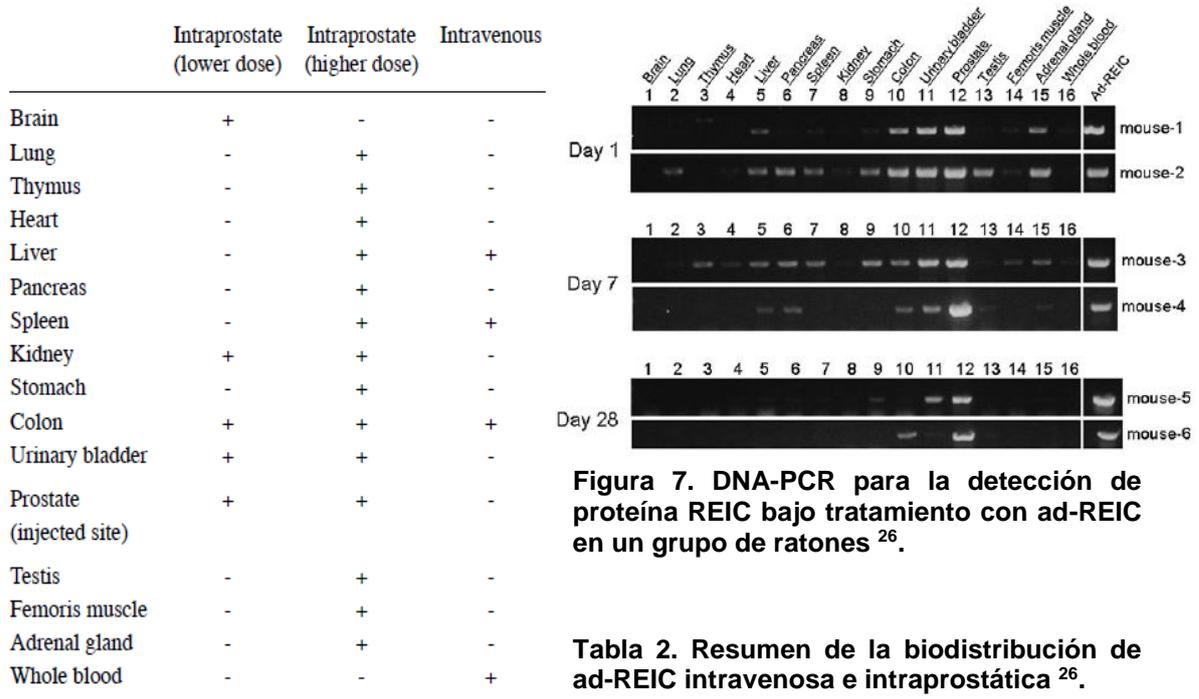


Figura 7. DNA-PCR para la detección de proteína REIC bajo tratamiento con ad-REIC en un grupo de ratones²⁶.

Tabla 2. Resumen de la biodistribución de ad-REIC intravenosa e intraprostática²⁶.

En otros estudios se confirmó la inducción de apoptosis resultante de la inyección de ad-REIC por zimografía. Este procedimiento electroforético permitió detectar la actividad proteolítica de las diversas enzimas en el proceso de la apoptosis provocado por el tratamiento con ad-REIC en uno de los estudios preclínicos realizados²¹. Por otra parte, el método común para detectar fragmentación de ADN debida a cascadas de señalización apoptóticas se ha detectado por el denominado método TUNEL en varios estudios preclínicos^{21, 28}, demostrando que la sobreexpresión de REIC/dkk-3 induce una apoptosis selectiva en las células prostáticas (*Figura 8*)²¹.

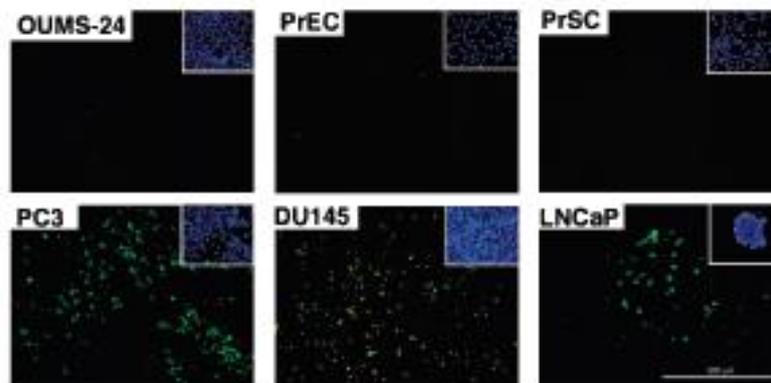


Figura 8. Tinción TUNEL (verde) de células humanas normales (OUMS-24, PrEC y PrSC) y línea celular de cáncer de próstata (PC3, DU145 y LNCaP) fijadas 36 horas después de la infección. En azul tinción nuclear como control²⁰.

La mayoría de ensayos de experimentación animal utilizan la prueba estadística t-student para comparar entre dos grupos cuando estos siguen una distribución normal y determinar, con ello, si las diferencias son estadísticamente significativas ($p_{\text{valor}} < 0,05$), dicho de otro modo, que las hipótesis nulas planteadas son ciertas ²¹⁻³⁰. Por otra parte, si los grupos no tienen una distribución normal, se utiliza la prueba o test no paramétrico U de Mann-Whitney ^{21,22}. Por último, algunos estudios utilizan el estimador de Kaplan-Meier que analiza la supervivencia para demostrar que, efectivamente, hay diferencia significativa ($p_{\text{valor}} < 0,005$) entre el tratamiento con ad-REIC y el tratamiento control (ad-LacZ) (Figura 9), y por tanto se concluye que el tratamiento in situ con ad-REIC prolonga la supervivencia de los ratones en un modelo ortotópico de cáncer de próstata ²¹.

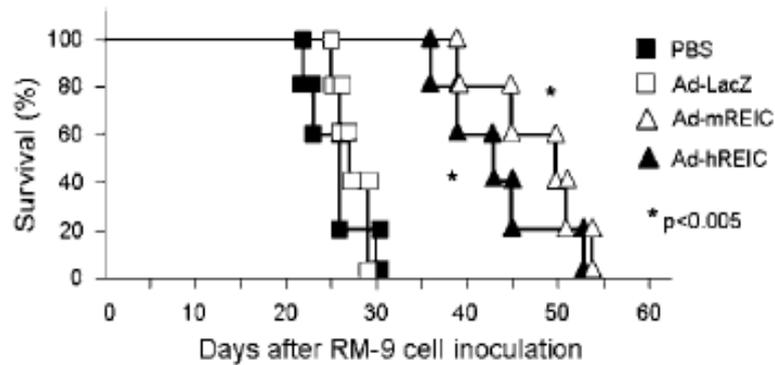


Figura 9. Supervivencia a lo largo del tiempo de un grupo de ratones (RM-9) con tumor prostático después de la inyección intratumoral de ad-REIC o control.

Observamos la curva Kaplan-Meier con un p_{valor} menor de 0,005 ²¹.

En definitiva, se ha demostrado que mediante una inyección intratumoral de ad-REIC se inhibía la metástasis y el tumor primario en un modelo ortotópico de un ratón prolongando, de este modo, la supervivencia de éste ²¹. Por otra parte, otros estudios preclínicos han destacado la ínfima o nula toxicidad sistémica e inflamatoria no específica ²⁵ y la importancia de la dosis y el lugar de inyección del tratamiento con ad-REIC ²⁶. Los estudios *in vitro* han contribuido a elucidar la función del gen REIC/dkk-3 y su implicación en el proceso de apoptosis ²⁸.

A raíz de la necesidad de desarrollar ad-REIC como una nueva forma de terapia del cáncer de próstata, el primer ensayo clínico en humanos, un estudio de la terapia génica ad-REIC in situ para cáncer de próstata en fase I/IIa; fue iniciado en 2011. En este primer gran estudio inicial se incluyen dos grupos de pacientes ya destacados inicialmente en esta revisión: por un lado aquellos pacientes con cáncer de próstata resistente a castración (CRPC) con o sin metástasis, y por otro, pacientes con alto riesgo de recidiva tumoral tras prostatectomía radical ^{31, 32, 33}.

Para resaltar la potencialidad de este tratamiento contra el cáncer de próstata, cabe destacar un reporte de un caso clínico de un paciente de 63 años con mCRPC que tras tratamiento quimioterapéutico sin éxito el paciente sufre graves neuropatías. Una vez aprobada su introducción en el ensayo, se le inyectó ad-REIC en el nódulo linfático del músculo obturador izquierdo donde se había detectado el adenocarcinoma metastásico con un Gleason de 9. Como observamos en la *Figura 10*, después de 15 inyecciones en diferentes nódulos linfáticos pélvicos y para-aorticos durante un periodo de 24 meses se observaron niveles de PSA por debajo de 4 ng/mL y además no se detectó ni metástasis óseas ni viscerales, ni otros efectos adversos por el tratamiento a parte de una leve fiebre transitoria tratada con antipiréticos ³¹.

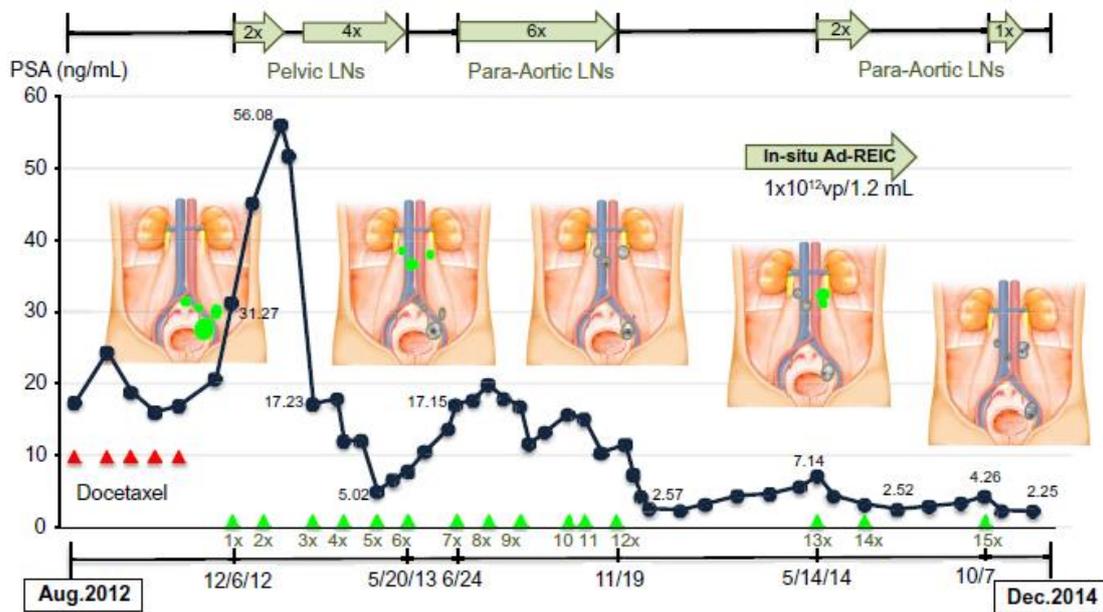


Figura 10. Curso clínico de la terapia génica *in situ* ad-REIC. El paciente recibió dos inyecciones programadas en los nódulos linfáticos del obturador izquierdo y otras 13 inyecciones en los demás nódulos linfáticos metastásicos. Se representan cambios dinámicos en los nódulos linfáticos metastásicos y los niveles de PSA a lo largo de los dos años de tratamiento. En verde se representa los nódulos viables y en gris los no viables para el tratamiento ³¹.

Justificación del estudio

En la actualidad, el cáncer de próstata es el tipo de cáncer más frecuente del aparato genital del hombre y uno de los más frecuentes en general. Muchas formas de cáncer de próstata escapan al tratamiento convencional aumentando la tasa de mortalidad entre los pacientes: el cáncer de próstata resistente a castración (CPRC) con o sin metástasis es bastante común y tiene una alta morbilidad, éste es padecido por hasta el 10-20% de los pacientes y la supervivencia en los pacientes con CPRC y

metástasis (mCPRC) es de 9-13 meses; y el cáncer de próstata con riesgo de recidiva bioquímica tras tratamiento con prostatectomía radical lo sufren hasta un 30% de pacientes, sospechando así, la existencia de metástasis a distancia.

Por ello, tanto mCPRC como la recidiva tumoral siguen sin cura y el incremento de la calidad de vida del paciente tratado con estas terapias sigue siendo un reto. Por tanto, es aquí donde surge la idea de uso de la terapia génica ya que, entre otros, la próstata es un órgano de muy fácil acceso para poder experimentar con su tejido y obtener resultados factibles que dañen al paciente en la menor medida posible ³¹⁻³³.

Objetivos del estudio

En la presente revisión nos centramos en los avances de la técnica de terapia génica contra el cáncer de próstata ad-REIC. Nuestro objetivo se basará en analizar el rumbo que está tomando esta estrategia terapéutica y sopesar la eficacia de la terapia génica en el aumento de la supervivencia en pacientes que sufren de cáncer de próstata y sus complicaciones.

MÉTODOS

La siguiente metodología fue realizada siguiendo las guías PRISMA (*Anexo 1*). En esta revisión utilizamos la metodología PICOS (P: Población identificada; I: Intervención a estudio; C: Comparación de resultados; O: Resultado esperado; S: Diseño del estudio) para realizar las preguntas de ésta y orientar nuestra búsqueda bibliográfica ³⁴.

La población identificada para el estudio serán aquellos pacientes diagnosticados de cáncer de próstata. Seguidamente, la intervención es el tratamiento mediante terapia génica ad-REIC basándonos en ensayos clínicos. La comparación de resultados demostrará si existe una mejora de la supervivencia del paciente con esta nueva intervención con respecto al tratamiento convencional de castración química y/o quimioterapia. Por tanto, el resultado mínimo esperado sería el aumento de la supervivencia del paciente bajo las condiciones de tratamiento que se expongan, evaluando así, la eficacia de este tratamiento nuevo.

La primera búsqueda bibliográfica utiliza las diferentes combinaciones de palabras clave mostradas en la *Tabla 3* en la base de datos de *MedLine-PubMed* y el filtro de “textos completos” (“free full text”) y “últimos 15 años”.

Tabla 3. Criterios de búsqueda bibliográfica.

“gene therapy” AND “cáncer”	51560
“prostate cancer” AND “gene therapy”	3638
“REIC/dkk-3”	23
“ad-REIC”	13
“ad-REIC” AND “Prostate cancer”	11

Otras fuentes utilizadas de manera directa para recabar información previa y básica del estudio fueron la *Sociedad Española de farmacia universitaria* (SEFH) de la cual obtuvimos información esencial a cerca de la terapia génica. Por otra parte, acudimos a la *sociedad americana sobre el cáncer* y a la *sociedad europea de urología* para obtener datos epidemiológico-clínicos primordiales para poder introducir ésta revisión.

Por último, probamos a recabar más información sobre la terapia génica en la que nos decidimos centrar en otras bases de datos tales como *Cochrane controlled trials register*, *embase*, *Scopus*, *Uptodate* o *índice médico español*, pero no localizamos información o, por defecto, encontramos la misma que en *Pubmed*, como ocurrió en

Cochrane controlled trials register, que hallamos, utilizando el término “ad-REIC”, un documento inaccesible que reseñaba ser una conferencia muy relacionada con los estudios ya encontrados.

Selección de estudios y estrategia de búsqueda

Como ya se ha mencionado, con los criterios previamente citados, se efectuó una primera búsqueda bibliográfica introductoria sobre el tema en cuestión. Seguidamente se seleccionaron artículos con los siguientes criterios de inclusión:

- Diseño de estudio: Ensayo clínico
 - La población de estudio debía padecer de cáncer de próstata con o sin metástasis y/o recidiva bioquímica con un Gleason (*Figura 1*) mayor o igual que 8 y resistentes, generalmente, a terapia hormonal y/u otros tratamientos.
 - La población debía padecer de cáncer de próstata con un estadiaje (*Tabla 1*) mayor a T2a y un normograma de Kattan (*Figura 2*) de alto riesgo.
- Intervención a estudio: terapia génica ad-REIC
- Idioma de publicación: Español, inglés o valenciano
- Estudios que estuvieran disponibles en texto completo
- Estudios desde el 1 de Enero de 2003 hasta el 15 de Febrero de 2018

Por otro lado, nuestros criterios de exclusión fueron:

- No es un ensayo clínico
- Se realiza mediante experimentación animal (ensayo preclínico)
- Más de 15 años de antigüedad
- Estudios que no estuvieran disponibles en texto completo
- Idioma no inglés, español o valenciano

Extracción de datos

La extracción de datos fue efectuada con los criterios de inclusión establecidos utilizando los términos de búsqueda “ad-REIC” y “Prostate cancer”. Después de aplicar los criterios de exclusión se obtuvieron dos ensayos clínicos finales (*Tabla 4*).

Autores	Título	Fecha de publicación	Revista/web publicada
Kumon H, Sasaki K, Ariyoshi Y, Sadahira T, Araki M, Ebara S, et al.	Feasibility of Neoadjuvant Ad-REIC Gene Therapy in Patients with High-Risk Localized Prostate Cancer Undergoing Radical Prostatectomy.	2015 Diciembre	Clinical and Translational Science
Kumon H, Ariyoshi Y, Sasaki K, Sadahira T, Araki M, Ebara S, et al	Adenovirus vector carrying REIC/DKK-3 gene: neoadjuvant intraprostatic injection for high-risk localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy.	2016 Noviembre	Cancer Gene Therapy

Tabla 4. Ensayos clínicos resultantes finales.

Evaluación de la calidad metodológica

Para clasificar la evidencia científica y determinar el grado de las recomendaciones se utilizaron los criterios de CASPe ³⁵ para ensayos clínicos, por un lado, los cuales se basan en 11 preguntas:

A. ¿Son válidos los resultados de los ensayos?

1. ¿Se orienta el ensayo a una pregunta claramente definida?

Si, en los dos estudios se orienta a ello.

2. ¿Fue aleatoria la asignación de los pacientes a los tratamientos?

En los dos estudios fue aleatoria dentro del grupo de pacientes en cuestión.

3. ¿Fueron adecuadamente considerados hasta el final del estudio todos los paciente que entraron en él?

Si, en los dos ensayos se tuvieron en cuenta todos los pacientes.

4. ¿Se mantuvo el cegamiento?

Se tratan de ensayos clínicos sin cegamiento, al menos por parte del paciente y del personal, es decir, no disponemos de doble ciego.

5. ¿Fueron similares los grupos al comienzo?

Fueron siempre los mismos grupos de pacientes.

6. ¿Al margen de la intervención en estudio los grupos fueron tratados de igual modo?

Si.

B. ¿Cuáles son los resultados?

7. ¿Es muy grande el efecto del tratamiento?

Si, en los dos estudios se miden los desenlaces del protocolo de manera sistematizada y correcta generando un efecto grande del tratamiento.

8. ¿Cuál es la precisión de este efecto?

Ninguno de los dos estudios concluye con intervalos de confianza, por tanto no podemos evaluar la precisión del efecto. A pesar de que se concluye que el efecto es positivo y favorable con respecto a la intervención, no disponemos de parte de los métodos estadísticos para llegar a ello.

C. ¿Pueden ayudarnos estos resultados?

9. ¿Puede aplicarse estos resultados en tu medio o población local?

Al ser ensayo clínicos de evidencia II-1 en fases I/IIa que no llegan a cubrir por completo la fase IIb necesaria para continuar con su aplicación, no podemos afirmar que se pueden aplicar en nuestro medio local pero si podemos decir que el camino que está tomando es el correcto.

10. ¿Se tuvieron en cuenta todos los resultados de importancia clínica?

Si, en los dos estudios se tuvieron en cuenta tanto resultados positivos como negativos, creando al final un balance positivo de todos ellos.

11. ¿Los beneficios a obtener justifican los riesgos y los costes?

Los riesgos quedan justificados, no se proporcionan los costes de los tratamientos.

En definitiva, la evaluación de la calidad metodológica mediante los criterios CASPe, nos demuestra que los resultados son moderadamente válidos, factibles y nos pueden ayudar si los trasladamos al medio real y cotidiano.

Por otro lado, también se evaluó la calidad metodológica de cada uno de los estudios basándonos en el *Manual Cochrane 5.1.0. / Parte 2: Métodos generales para las revisiones Cochrane*³⁶, para determinar el riesgo de sesgo de los estudios. Dicho manual, establece diferentes apartados o tipos de sesgo que hay que evaluar, estos son: generación de la secuencia aleatorizada (sesgo de selección), ocultación de la asignación (sesgo de selección), cegamiento de los participantes (sesgo de realización), cegamiento del personal (sesgo de realización), cegamiento de los resultados (sesgo de detección) y manejo de los datos incompletos (sesgo de atracción). El riesgo de sesgo para cada apartado fue clasificado en riesgo alto, riesgo bajo y riesgo poco claro o indefinido según lo establecido en el *Manual Cochrane 5.1.0*. Los estudios fueron posteriormente considerados o clasificados globalmente en: riesgo bajo de sesgo si todos los apartados había sido puntuados con bajo riesgo, riesgo moderado de sesgo si solo 1 o 2 de los apartados habían sido puntuados con alto riesgo y por último, estudios con riesgo alto de sesgo aquellos en que tenían más de 2 apartados con puntuación de alto riesgo. La evaluación queda reflejada en el apartado “*Resultados*” en la *Tabla 5* y extendida y razonada en el *Anexo 2*.

Análisis y síntesis de la evidencia científica

Para evaluar la calidad de la evidencia y formular las recomendaciones usaremos la metodología desarrollada por el grupo GRADE (Grading the Quality of Evidence and the Assessment of Recommendations)³⁷.

Aunque la calidad de la evidencia, también denominada confianza y/o certidumbre es un espectro continuo, GRADE propone una clasificación en cuatro categorías: Alta, cuando la confianza en el estimador del efecto disponible en la literatura científica se encuentra muy cercano al efecto real; moderada, cuando es probable que el estimador del efecto se encuentre cercano al efecto real, aunque podrían existir diferencias sustanciales; baja, cuando el estimador del efecto puede ser sustancialmente diferente al efecto real; o muy baja, en el caso de que sea muy probable que el estimador del efecto sea sustancialmente diferente al efecto real.

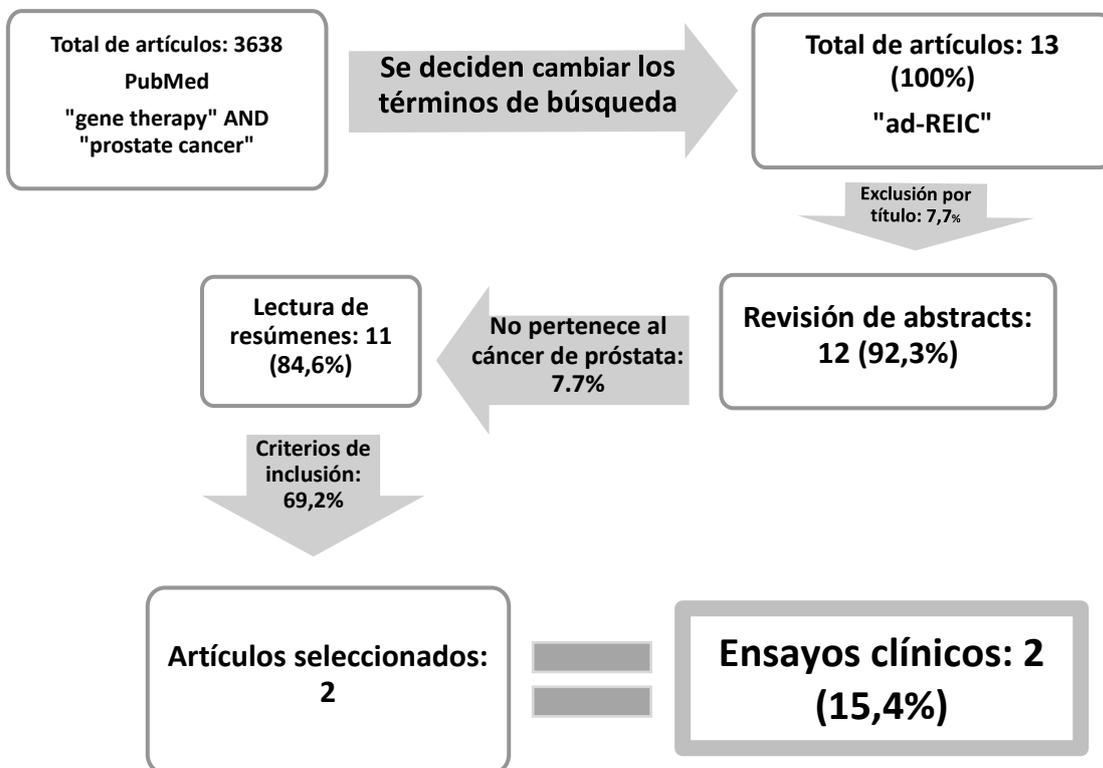
En los dos ensayos clínicos que acabamos revisando no hay diferencias significativas entre los diferentes pacientes, y las distintas dosis del tratamiento que fueron repartidas de manera aleatorizada. Estos hechos aumentan la calidad de la evidencia. Por otra parte, la ausencia de sesgo de publicación, ya que se habla de todos los resultados tanto positivos como negativos, y la presencia de un gradiente dosis-respuesta, es decir, a más dosis más respuesta; también aumentan la calidad de la evidencia. Pero, por otro lado, el hecho de disponer de una muestra reducida (18 pacientes) al estar prácticamente en fase I/IIa del ensayo reduce la calidad de la evidencia.

Con todo ello, podemos determinar que nuestro estudio tiene una calidad de evidencia moderada.

Por último, como no realizamos ningún tipo de experimentación consideramos que para efectuar la revisión sistemática actual no era necesaria especialmente la aprobación de un Comité de ética e investigación.

RESULTADOS

Como resultados de la búsqueda inicial se llegaron a localizar 2938 referencias en *Pubmed* en relación a la terapia génica y cáncer de próstata. Ante el gran número de artículos, se deciden los términos por el nombre de la terapia: ad-REIC. A continuación obtenemos 13 resultados, de las cuales, una vez leídos todos los títulos y excluidos los repetidos se redujeron a 12. Cuando se leyeron los resúmenes se volvió a excluir una referencia al considerar que el contenido de ésta no era relevante y no pertenecía al ámbito de cáncer de próstata. De los 11 restantes se excluyeron otros 9 por no responder en a los diferentes criterios de inclusión, la mayoría eran ensayos clínicos centrados en experimentación animal (preclínicos) o revisiones; de modo que finalmente se incluyeron 2 artículos en nuestra revisión final.



A continuación, los resultados de los estudios revisados se exponen en relación a la bioquímica y genética del cáncer de próstata y a los resultados obtenidos en su tratamiento mediante la terapia génica que se expone.

Características de los estudios incluidos

Los dos ensayos clínicos aleatorizados no controlados en fases tempranas con una evidencia científica II-1 y una calidad metodológica moderada guardan relación entre sí, siendo parte de un amplio y mayor estudio centrado en el objetivo de descubrir

una terapia neoadyuvante eficaz contra el cáncer de próstata con alto riesgo de recidiva bioquímica una vez realizado el tratamiento quirúrgico de prostatectomía radical. Cabe destacar que en ambos estudios tenemos a los mismos pacientes, un total de dieciocho, la diferencia entre los ensayos es la cronicidad y sus conclusiones; cómo podemos ver uno precede a otro haciendo posible su realización.

A continuación, en la *Tabla 5* podemos observar un resumen de las características de los dos ensayos clínicos incluidos en nuestra revisión. Esta tabla está compuesta por diferentes apartados que se han comentado detenidamente:

- ❖ Autor y país: autor principal y país dónde se ha realizado el estudio.
- ❖ Nombre del estudio
- ❖ Diseño del estudio: tipo de estudio según la clasificación del *Manual de Epidemiología y Salud pública para grados en ciencias de la salud*.
- ❖ Nº de pacientes (n): número de pacientes con los que se empieza el estudio y que han recibido la intervención.
- ❖ Edad media de los pacientes
- ❖ Intervenciones que han recibido todos los pacientes por igual, independientemente de la dosis.
- ❖ Medidas de resultados: nos referimos a los instrumentos (escalas, cuestionarios, histología, etc.) utilizados para medir las distintas variables cualitativas y poder así transformarlas en variables cuantitativas para poder comparar los resultados entre los distintos ensayos de manera más óptima.
- ❖ Riesgo de sesgo: valoración global del riesgo de errores sistemáticos cometidos en cada uno de los ensayos clínicos, en otras palabras, cuánto de exactos son los resultados obtenidos para los pacientes del estudio o cuánto se desvían estos de los posibles verdaderos resultados. Extendido en *Anexo 2*.
- ❖ Nivel de evidencia: nivel de evidencia científica según el tipo de estudio realizado.
- ❖ Tiempo de seguimiento: tiempo en meses o semanas, durante los cuales se ha hecho seguimiento del paciente mediante las distintas escalas y cuestionarios citados anteriormente.
- ❖ Resultados de los estudios.
- ❖ Conclusión: conclusión de cada estudio.

Autores y país	Título	Diseño	Tamaño de la muestra (n)	Edad media	Intervenciones	Principales medidas de resultados	Calidad metodológica (riesgo de sesgo)	Evidencia	Tiempo de seguimiento	Resultados	Conclusión
Kumon H, Sasaki K, Ariyoshi Y, Sadahira T, Araki M, Ebara S, et al. JAPAN	Feasibility of Neoadjuvant Ad-REIC Gene Therapy in Patients with High-Risk Localized Prostate Cancer Undergoing Radical Prostatectomy.	Ensayo clínico aleatorizado no controlado en fase I/IIa	18	65.5 años	Todos los pacientes recibieron dos inyecciones intraprostáticas guiadas mediante ultrasonido a las dos semanas, seguidas de prostatectomía radical 6 semanas después de la inyección.	» Histopatología » Citoquinas » PSA » Linfocitos periféricos en sangre » Fiebre y transaminasas (efectos adversos) » DNA » Adenoviral » Efectos clínicos generales	Moderada (falta de cegamiento)	II-1	→ No hay diferencias significativas en las características de los pacientes. → No se observan ni complicaciones ni efectos adversos. → A más dosis más efectos citopáticos y declinación de PSA. → Existe apoptosis causada por linfocitos CD8. Desde los 17,7 meses hasta los 60,1 meses.	El estudio es factible con perfiles de ad-REIC seguros que alcanza la dosis máxima tolerada.	
Kumon H, Ariyoshi Y, Sasaki K, Sadahira T, Araki M, Ebara S, et al. JAPAN	Adenovirus vector carrying REIC/DKK-3 gene: neoadjuvant intraprostatic injection for high-risk localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy.	Ensayo clínico aleatorizado no controlado en fase I/IIa	18	65.5 años	Todos los pacientes recibieron dos inyecciones intraprostáticas guiadas mediante ultrasonido a las dos semanas, seguidas de prostatectomía radical 6 semanas después de la inyección.	» Histopatología » Citoquinas » PSA » Linfocitos periféricos en sangre » Fiebre y transaminasas (efectos adversos) » DNA » Adenoviral » Efectos clínicos generales	Moderada (falta de cegamiento)	II-1	→ No hubo efectos adversos destacables. → No se detectó ADN adenoviral en sangre. → Los cambios en el PSA fueron evaluados como un parámetro no fiable al igual que las citoquinas y otras células excepto los linfocitos CD8. → La histopatología es la medida más fiable. → La dosis más alta fue la más favorable en cuanto a la supervivencia ante el alto riesgo de recidiva tumoral.	El conjunto de inyecciones a dosis semejantes a 3 x 10 ¹² vp. (DL-4) son efectivas para el éxito de la terapia adyuvante.	

Tabla 5. Tabla resumen de los artículos no excluidos en la revisión

Características de los pacientes

Ambos estudios contienen el mismo grupo de pacientes: dieciocho pacientes con una edad media de 65.5 (rango 57-74) años. *Kumon H, Sasaki et al* reportó que no hay diferencias significativas entre las características de los pacientes (*Tabla 6*), es decir, los p_{valores} muestran que la diferencia entre los 18 pacientes con respecto a las diversas características clínicas y patológicas que presentan es inexistente, lo cual nos lleva a asumir la factibilidad del estudio.

En la *tabla 7* podemos observar las características clínicas y patológicas de todos estos e incluso su tiempo de seguimiento después de la prostatectomía radical.

		Dose Level 1+2 (n = 6)	Dose Level 3 (n = 6)	Dose level 4 (N = 6)	p Value	
Age		62.5 (59–74)	68 (63–71)	66 (57–74)	0.533	
Clinical T stage	T2a	1	0	2	0.485	
	T2b	0	0	0		
	T2c	2	2	2		
	T3a	3	4	2		
Biopsy Gleason score	7	0	2	1	0.392	
	8	2	3	3		
	9	3	1	2		
	10	1	0	0		
PSA		13.425 (5.02–26.62)	13.775 (9.82–16.18)	19.5 (10.87–33.60)	0.309	
Kattan's nomogram score		140.5 (124–176)	140 (118–167)	137 (122–173)	0.894	
Pathological stage	pT2b	0	0	0	0.148	
	pT2c	1	3	4		
	pT3a	0	1	1		
	pT3b	5	2	1		
	Margin+	4	4	4		1
	Node+	2	0	0		0.085

Tabla 6. Resultados en las diferencias entre las características de los pacientes ³².

	Vector dose level (vp)																	
	DL-1 (1×10^{10})				DL-2 (1×10^{11})				DL-3 (1×10^{12})				DL-4 (3×10^{12})					
	Patient no.																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Age (years)	74	67	59	63	62	61	70	65	70	66	71	63	74	57	71	62	60	70
PSA before Tx (day 0)	25.2	9.44	15.75	33.41	11.84	5.34	16.18	9.82	13.41	14.23	10.81	13.36	13.32	25.51	33.36	17.18	10.87	21.82
Clinical stage	T2c	T3a	T2a	T3a	T2c	T3a	T3a	T2c	T3a	T2c	T3a	T3a	T2c	T3a	T3a	T2c	T2a	T2a
Gleason score (biopsy)	4+5	4+5	4+4	4+4	5+5	4+5	4+5	4+4	4+4	4+4	4+3	4+3	4+5	4+4	4+4	3+4	4+4	4+5
Nomogram score	148	141	124	176	140	133	167	127	161	137	143	118	137	172	173	137	122	123
Follow-up (months)	60.1	59.2	59.2	59	57.8	57.6	57.1	55.5	52	48.5	46.9	45.2	42.2	27.5	27.5	24.2	18.1	17.7

Abbreviations: DL, dose level; PSA, prostate-specific antigen; vp, viral particles.

Tabla 7. Características de los pacientes con tiempo de seguimiento ³³.

Seguridad y factibilidad

Todos los niveles de dosis (las DLs), incluida la última dosis adicional, resultaron fiables sin alcanzar la dosis máxima-tolerada. Respecto a los efectos adversos solo se

observó cierto grado de fiebre transitoria en algunas dosis (*Tabla 8*) que pudo ser tratada con antipiréticos. Por otro lado, con respecto a la toxicidad se observó cierto grado de elevación de las transaminasas en 4 pacientes (*Tabla 8*).

	Vector dose level (vp)																	
	DL-1 (1×10^{10})				DL-2 (1×10^{11})				DL-3 (1×10^{12})				DL-4 (3×10^{12})					
	Patient no.																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Fever	—	—	—	—	Grade 1	Grade 1	Grade 2	Grade 1	Grade 2	—	Grade 1	Grade 2	Grade 2	Grade 2	Grade 2	Grade 2	Grade 2	Grade 2
TA elevation	—	—	—	—	—	—	—	Grade 1	—	Grade 1	—	—	Grade 2	—	—	—	Grade 2	—
Others (possibly related)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Abbreviations: ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; DL, dose level; TA, transaminases (alanine transaminase and aspartate transaminase); vp, viral particles.

Tabla 8. Efectos adversos ³³.

Tampoco se observaron complicaciones intraoperatorias ni postoperatorias, al igual que no se observó DNA adenoviral en sangre mediante PCR en la mayoría de los casos.

Evaluación Histopatológica

En términos de efectos antitumorales, la evaluación histopatológica de los pacientes prostatectomizados de modo radical fue la forma más fiable de medida. La mitad de los pacientes que recibieron DL-3 y todos los que recibieron DL-4 mostraron efecto citopático significativo y elevación de los linfocitos T.

Como se observa en el resultado de la *Figura 11* la zona indicada por la flecha en la resonancia magnética nuclear muestra el antes y el después del tratamiento en uno de los pacientes que recibe la dosis DL-4. Demostrándose, como se observa, un resultado favorable de desaparición de la zona tumoral.

Como se muestra en la *Tabla 9*, todos los efectos patológicos se evalúan como grado 1 (+) o grado 2 (++), produciendo, así, un resultado dependiente de la dosis.

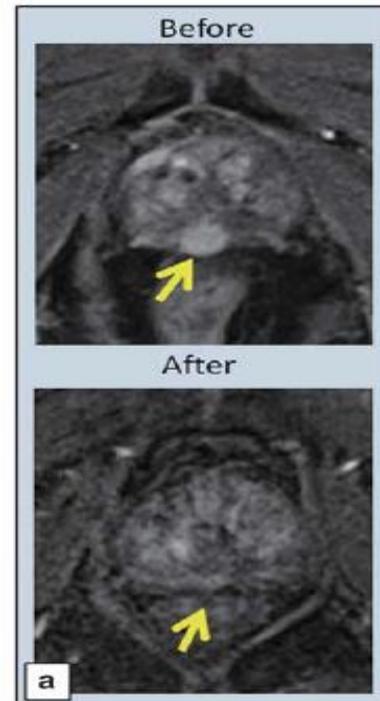


Figura 11. RMN de próstata antes y después de ad-REIC ³³.

	Patient no.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pathological stage	pT3bpN1	pT3bpN0	pT2cpN0	pT3bpN0	pT3bpN0	pT3bpN1	pT3bpN0	pT2cpN0	pT3apN0
Gleason score (resected specimen)	4+5	4+5	4+3	4+5	5+4	4+5	4+5	4+5	3+4
PSA before RP (day 56)	30.13	9.12	14.94	22.49	12.34	4.16	14.52	8.34	11.32
PSA changing rate (%) ^a	120	97	95	67	104	78	90	85	84
<i>Evaluation of pathological effects</i>									
Cytopathic effects	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Lymphocytic infiltration	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Overall effects	-	-	-	-	+	+	++	++	+
Evaluation of MRI findings	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	PR
PSA recurrence after RP (months)	-	9.3	-	0	0	6	0	9.2	16.1

	Patient no.								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Pathological stage	pT2cpN0	pT3bpN0	pT2cpN0	pT2cpN0	pT3bpN0	pT3apN0	pT2cpN0	pT2cpN0	pT2cpN0
Gleason score (resected specimen)	4+3	3+5	4+3	4+5	4+3	4+4	3+3	4+3	4+5
PSA before RP (day 56)	13	9.04	12.2	9.74	28.78	29.39	14.09	9.51	25.32
PSA changing rate (%) ^a	91%	84%	91%	73%	113%	88%	82%	87%	116%
<i>Evaluation of pathological effects</i>									
Cytopathic effects	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Lymphocytic infiltration	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Overall effects	++	+	+	++	++	++	++	++	++
Evaluation of MRI findings	SD	SD	SD	PR	SD	PR	SD	-	SD
PSA recurrence after RP (months)	22.4	-	0	-	-	-	-	-	9.2

Abbreviations: MRI, magnetic resonance imaging; PR, partial response; PSA, prostate-specific antigen; RP, radical prostatectomy; SD, stable disease. ^aPSA changing rate (%): PAS on day 56/PSA on day 0×100.

Tabla 9. Resultados clínicos post-terapéuticos ³³.

Parámetros a evaluar

PSA (Antígeno prostático de superficie)

Cuando las dosis fueron bajas (DL-1 y DL-2) no se observaron cambios antes y después del tratamiento con ad-REIC. Cierta declinación se observó conforme se aumentó la dosis pero se concluyó que los cambios en el PSA no son un parámetro fiable para la evaluación de los resultados en este estudio neoadyuvante.

Células B, Células T, Células NK, linfocitos CD4⁺ y linfocitos CD8⁺

Según *Kumon H, Sasaki et al*, los linfocitos periféricos en sangre fueron analizados mediante citometría de flujo después del tratamiento con ad-REIC. En estos resultados no se observó ninguna tendencia de aumento ni de las células B, ni de las células T, ni de las células NK ni de los linfocitos CD4⁺, sin embargo sí que se mostró una tendencia a aumentar, después del tratamiento con ad-REIC, en los linfocitos CD8⁺, en este caso también dependiente de la dosis. En los resultados de la *Figura 12* se observaron los cambios en los ratios de CD8⁺ en tres grupos de pacientes según la dosis y se vio que DL-4 producía un mayor aumento de CD8⁺.

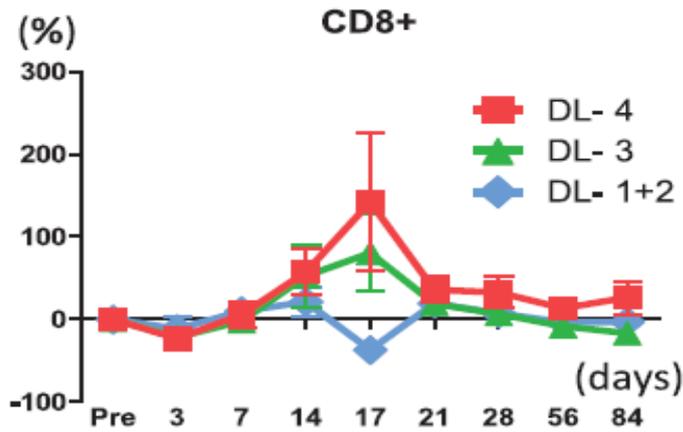


Figura 12. Citometría de flujo de los linfocitos en sangre periféricos ³².

Citoquinas

En comparación con las citoquinas interferón- γ , factor de necrosis tumoral α (TNF α) e IL-6, que aumentaron solo un día después de la inyección de ad-REIC, IL-7 mostró cambios y aumentos no constantes a lo largo del tratamiento como se puede contemplar en la *Figura 13*.

Por ello, en ningún caso, las citoquinas se comportan como un parámetro fiable para la evaluación de los resultados clínicos.

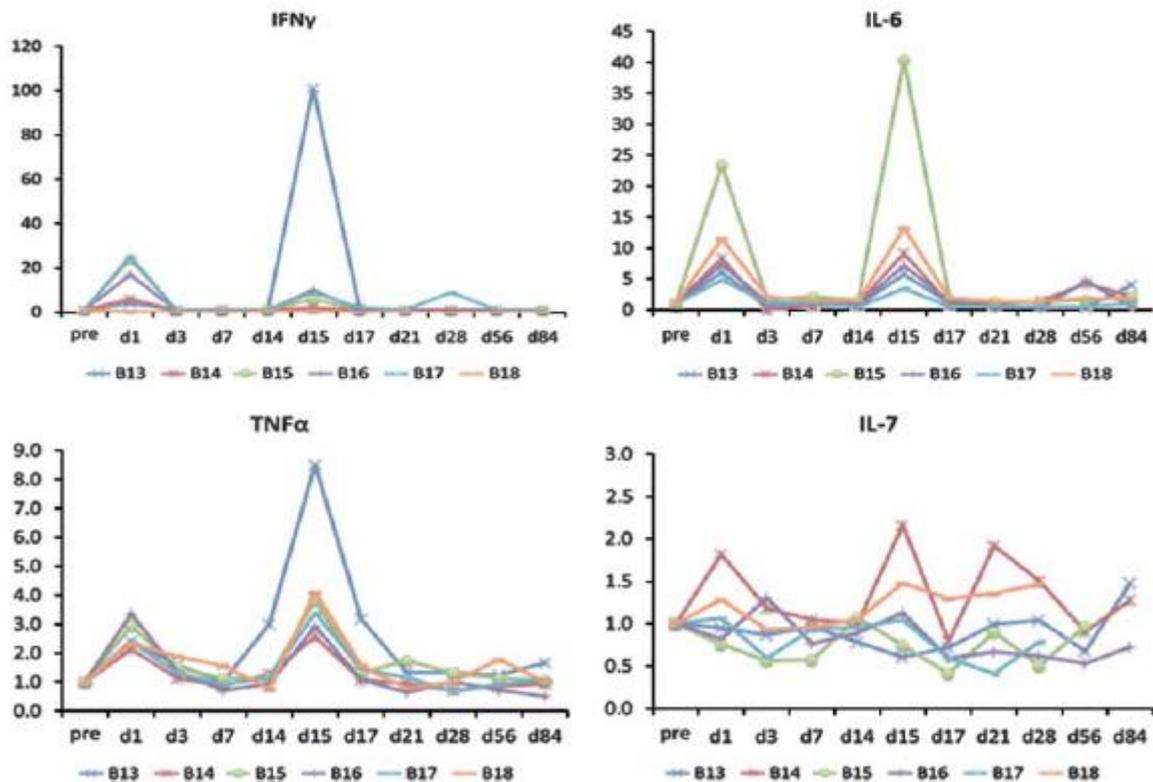


Figura 13. Cambios en las citoquinas en relación a dos inyecciones de tratamiento ad-REIC de dosis DL-4 ³³.

Supervivencia en relación a la recidiva bioquímica (BRFS)

Utilizando el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier se demostró que la supervivencia ante la recidiva bioquímica del cáncer de próstata en pacientes prostatectomizados de manera radical con tratamiento ad-REIC a dosis mayores (DL-4) fue significativamente más favorable que en el conjunto de los otros pacientes con menores dosis (DL-1, DL-2 y DL-3).

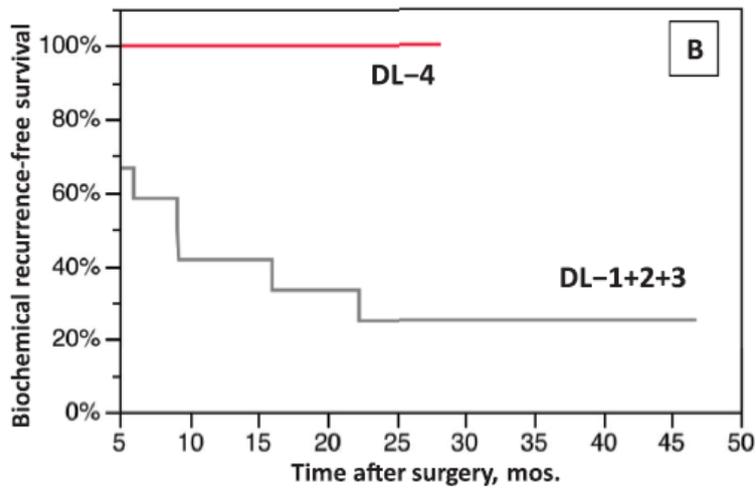


Figura 14. Curva Kaplan-Meier representando lo supervivencia a la recidiva bioquímica del cáncer de próstata en pacientes de alto riesgo tras prostatectomía radical. La diferencia entre un pool de las tres dosis más bajas y DL-4 fue significativa ($p_{\text{valor}} < 0,05$ mediante prueba Mantel-Cox)^{32, 33}.

DISCUSIÓN

La terapia neoadyuvante está ampliamente aceptada en el tratamiento de pacientes con cáncer de alto riesgo localizado o localmente avanzado. Aquí es donde, en el cáncer de próstata, los efectos beneficiosos dentro de los resultados patológicos en terapias neoadyuvantes basadas en la castración y la quimioterapia con o sin castración bioquímica no han mostrado ninguna mejora en la supervivencia del paciente. Es por eso que la terapia neoadyuvante con castración química y/o quimioterapia no es recomendada en pacientes con alto riesgo de recidiva bioquímica de cáncer de próstata tras prostatectomía radical. Consecuentemente, la terapia génica *in situ* ofrece una nueva opción terapéutica para la terapia neoadyuvante generando efectos sistémicos antitumorales indirectos.

El último objetivo de la terapia génica *in situ* de ad-REIC es desarrollar una nueva generación de vacunas contra el cáncer basada en el concepto de una inducción simultánea de células destructoras del cáncer y un aumento de la inmunidad antitumoral. Ya en los estudios preclínicos ¹⁹⁻²⁹, ad-REIC se presentó como una nueva y sofisticada manera de inducir apoptosis selectiva de las células cancerígenas a través de respuestas de estrés en el retículo endoplasmático. El aumento de la proteína REIC en el sitio del tumor también crea un medio óptimo para los antígenos específicos de los linfocitos T citotóxicos. Además, la sobreproducción de IL-7 asociada a los fibroblastos relacionados con el cáncer activa el sistema inmunitario innato envolviendo las células NK.

En la presente revisión, se demuestra la creencia en el concepto dual de inducción de células destructoras del cáncer y aumento de la inmunidad antitumoral mediante el tratamiento con ad-REIC que, por el momento, en las fases que se encuentra ha sido exitosamente establecido. Se observó que en pacientes prostatectomizados después de dos inyecciones intratumorales de ad-REIC se produjo degeneración tumoral con citolisis y picnosis; y un aumento de linfocitos T citotóxicos en áreas significantes del cáncer viéndose, así, una clara dependencia de la dosis utilizada a través del tratamiento con ad-REIC.

Mientras *Kumon H, Sasaki et al* demostró, mediante tinción inmunohistoquímica en muestras de pacientes tratados con ad-REIC, la existencia de infiltraciones de linfocitos CD8⁺ y células dendríticas en el área de células apoptóticas del cáncer de próstata además de determinar que estos mismos pacientes no presentaban diferencias significativas entre ellos haciendo factible la continuación del estudio, *Kumon H, Ariyoshi et al* corrobora la seguridad del ensayo y su factibilidad, además de determinar que ni el

PSA ni las diferentes citoquinas al igual que otras células inmunitarias tales como los linfocitos B, las células NK o los linfocitos CD4+ son parámetros fiables para proporcionar resultados clínicos. A parte, *Kumon H, Ariyoshi et al* sí que mostró como forma de medida de confianza la evaluación histopatológica.

En esta revisión de ensayos clínicos en fases prematuras, se utilizaron inyecciones de ad-REIC de cuatro tipos, según su dosis, en crecimiento. Consecuentemente, la supervivencia ante la recidiva bioquímica fue significativamente más favorable en aquellos pacientes que recibieron un tratamiento de ad-REIC con una dosis mayor (DL-4), demostrando, a partir de ello, la dependencia de la dosis en los resultados y, obviamente, la eficacia de la terapia neoadyuvante que se está aplicando en pacientes con cáncer de próstata prostatectomizados con alto riesgo de recidiva.

A pesar de que, históricamente, el cáncer de próstata no ha sido denominado como un cáncer inmunogénico, recientes estudios ³⁰⁻³³ demuestran lo contrario. Ad-REIC como nueva clase de vacuna terapéutica contra el cáncer, está empezando a ser una evidencia aplicable en el mundo de la urología, genética y/u oncología. Está claro que el conjunto de inyecciones en múltiples zonas afectas por el cáncer de próstata a una dosis suficiente de ad-REIC, a pesar de que su perfecta optimización aún está por determinar, son esenciales para el éxito de esta terapia neoadyuvante, pero la investigación se encuentra aún en fases prematuras (I/IIa).

Por otra parte, la alta morbilidad de los diferentes subtipos de cáncer de próstata que pueden llegar a contemplar metástasis en muchos casos e incluso después de un tratamiento determinado que no llega a ser del todo eficiente es un problema prioritario. Los ensayos clínicos revisados proponen un tratamiento alternativo, con el que se puede observar que los beneficios o efectos deseables son abundantes mientras que los riesgos o efectos no deseables son muy escasos. Sin embargo, la evidencia resulta ser moderada y además, existe cierta incertidumbre acerca de unos resultados de supervivencia a lo largo de los años ya que los ensayos se encuentran aún en fases prematuras (Fase I/IIa). Si hacemos un balance de todo lo anterior podemos decir, sin lugar a duda, que se favorece la intervención a estudio. Por otro lado, no se habla de costes pero si existe una notable equidad y resulta muy factible implantar la intervención, por ello, se recomendaría aumentar la población de estudio, es decir, de la muestra y pasar a una plena fase IIb en la que ya muestra señales de inicio.

Finalmente, ante una fuerza de recomendación clínica tan alta (A) basada en los niveles de evidencia que poseemos de estos ensayos clínicos aleatorizados pero no controlados que revisamos, cuya validez externa de sus resultados nos reduce la

probabilidad de poseer sesgos potenciales, podemos decir que existe un nivel adecuado de evidencia científica para adoptar la práctica, es decir, que sería deseable la realización de ensayos clínicos en fases ya más avanzadas lo antes posible.

CONCLUSIÓN DE LOS AUTORES

Los autores de los ensayos clínicos revisados concuerdan en una conclusión clara: la terapia génica ad-REIC es un prometedor tratamiento, en relación con la inmunoterapia, de pacientes con alto riesgo de recidiva bioquímica en el cáncer de próstata tras ser sometidos a prostatectomía radical. Todo ello gracias al resultado de la obiedad de que un conjunto de inyecciones del tratamiento de ad-REIC en múltiples áreas determinadas donde se presentan células prostáticas cancerígenas con una suficiente dosis es claramente efectivo como terapia neoadyuvante.

Comparado con el tratamiento de castración bioquímica y/o quimioterapia ha mostrado resultados favorables en la supervivencia del paciente con cáncer de próstata con alto riesgo de recidiva bioquímica tras prostatectomía radical.

Por otra parte, en cuanto a la seguridad y factibilidad de los ensayos, los resultados han sido favorables en términos finales pero, para poder realizar recomendaciones más fiables es necesaria la realización de más ensayos y en fases más avanzadas del ensayo clínico presentando algunas mejoras metodológicas como podrían ser el aumento de la muestra y la introducción de un grupo control. Por último, debido a las limitaciones surgidas en la búsqueda de artículos ante la escasa cantidad de resultados utilizando los diferentes criterios de inclusión y de exclusión se puede concluir que esta terapia genética denominada ad-REIC se encuentra en fases un poco tempranas del proceso de ensayo clínico y que aún queda un largo camino en sus líneas de investigación.

REFERENCIAS

Estudios excluidos que no cumplen los criterios de inclusión pero se utilizan como referencia:

1. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe 2004. *Ann Oncol* 2005 Mar; 16 (3): 481-8.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008 Mar; 58(2): 71-96.
3. A. Heidenreich (presidente), M. Bolla, S. Joniau, M.D. Mason, V. Matveev, N. Mottet, H-P. Schmid, T.H. van der Kwast, T. Wiegel, F. Zattoni. Guía clínica sobre el cáncer de próstata. European Association of Urology 2010. 2010 abril.
4. Korets R, Motamedinia P, Yeshchina O, Desai M, McKiernan JM. Accuracy of the Kattan nomogram across prostate cancer risk-groups. *BJU International*. 2011 Jul 1; 108(1):56–60.
5. Borque Fernando Á, Sanz G, Esteban LM, Sanz G, Jesús M, Gil Martínez P, et al. Vigencia actual de los nomogramas en la estadificación del cáncer de próstata. *Archivos Españoles de Urología (Ed impresa)*. 2006 Dec; 59(10):989–1000.
6. Garnick MB: Prostate cancer: screening, diagnosis, and management. *Ann Intern Med* 118 (10): 804-18, 1993.
7. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2012. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2012. Available online. Last accessed October 13, 2017.
8. Kirby M, Hirst C, Crawford ED. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *Int J Clin Pract*. 2011; 65: 1180–92.
9. Sonpavde G, Chi KN, Powles T, Sweeney CJ, Hahn N, Hutson TE, et al. Neoadjuvant therapy followed by prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *Cancer*. 2007 Dec 15; 110 (12): 2628–39.
10. C. L. RONCHERA-OMS, J. M^a. GONZÁLEZ. Terapia génica. *BibliotecaVirtual*. 920–7
11. Dr. Brian M. Cavagnari. Gene therapy: a therapeutic option for neoplasias, infections and monogenic diseases. *Arch Argent Pediatr*. 2011; 109(4):326–332 / 326.
12. Escrig E, Aliño SF. Terapia génica del cáncer. *Farm Clin* 1997; 14:259-269
13. Curiel DT, Gerritsen WR, Krul MR. Progress in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther*. 2000; 7:1197-1199.
14. Wadhwa PD, Zielske SP, Roth JC y Cols. Cancer genetherapy: scientific basis. *Annu Rev Med* 2002; 53: 437-452.

15. NCI Drug Dictionary [Internet]. National Cancer Institute. Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug>
16. Muruve DA. The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther.* 2004 Dec; 15(12):1157–66.
17. Takara-bio. Adenovirus Dual Expression Kit [Internet]. Available from: <http://www.takara-bio.com>
18. Narvaiza I, Mazzolini G, Qian C, Prieto J, Melero I. Vectores adenovirales de primera generación, el vector por excelencia en inmunoterapia génica del cáncer. *Inmunología (1987).* 200304; 22(2):225–42.
19. Djavan B, Nasu Y. Prostate Cancer Gene Therapy—What Have We Learned and Where Are We Going? *Reviews in Urology.* 2001; 3(4):179–86.
20. Sakaguchi M, Huh NH and Namba M: A novel tumor suppressor, REIC/Dkk-3 gene identified by our in vitro transformation model of normal human fibroblasts works as a potent therapeutic anti-tumor agent. *Adv Exp Med Biol* 720: 209-215, 2011.
21. Edamura K, Nasu Y, Takaishi M, Kobayashi T, Abarzua F, Sakaguchi M, et al. Adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene transfer inhibits tumor growth and metastasis in an orthotopic prostate cancer model. *Cancer Gene Therapy.* 2007 Jun 29; 14:765.
22. Tanimoto, R., Sakaguchi, M., Abarzua, F., Kataoka, K., Kurose, K., Murata, H., Nasu, Y., Kumon, H. and Huh, N.-H. (2010), Down-regulation of BiP/GRP78 sensitizes resistant prostate cancer cells to gene-therapeutic overexpression of REIC/Dkk-3. *Int. J. Cancer*, 126: 1562–1569. doi:10.1002/ijc.24764
23. Zhang K, Watanabe M, Kashiwakura Y, Li S-A, Edamura K, Huang P, et al. Expression pattern of REIC/Dkk-3 in various cell types and the implications of the soluble form in prostatic acinar development. *International Journal of Oncology.* 2010 Dec 1; 37(6):1495–501.
24. Watanabe M, Nasu Y, Kumon H. Adenovirus mediated REIC/Dkk 3 gene therapy: Development of an autologous cancer vaccination therapy (Review). *Oncology Letters.* 2014 Mar 1; 7(3):595–601.
25. Kawauchi K, Watanabe M, Kaku H, Huang P, Sasaki K, Sakaguchi M, et al. Preclinical Safety and Efficacy of in Situ REIC/Dkk-3 Gene Therapy for Prostate Cancer [Internet]. *Acta Medica Okayama.* 2012
26. Sugimoto M, Watanabe M, Kaku H, Li S-A, Noguchi H, Ueki H, et al. Preclinical biodistribution and safety study of reduced expression in immortalized cells/Dickkopf-3-encoding adenoviral vector for prostate cancer gene therapy. *Oncology Reports.* 2012 Nov 1; 28(5):1645–52.
27. Sakaguchi M, Huh N, Namba M. A Novel Tumor Suppressor, REIC/Dkk-3 Gene Identified by Our In Vitro Transformation Model of Normal Human Fibroblasts Works as a Potent Therapeutic Anti-tumor Agent. *SpringerLink.* 2011; 209–15.

28. Abarzua F, Sakaguchi M, Takaishi M, Nasu Y, Kurose K, Ebara S, et al. Adenovirus-Mediated Overexpression of REIC/Dkk-3 Selectively Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells through Activation of c-Jun-NH2-Kinase. *Cancer Res.* 2005 Nov 1;65(21):9617.
29. Sakaguchi M, Kataoka K, Abarzua F, Tanimoto R, Watanabe M, Murata H, et al. Overexpression of REIC/Dkk-3 in Normal Fibroblasts Suppresses Tumor Growth via Induction of Interleukin-7. *J Biol Chem.* 2009 May 22; 284(21):14236–44.
30. Mori A, Watanabe M, Sadahira T, Kobayashi Y, Ariyoshi Y, Ueki H, et al. The Downregulation of the Expression of CD147 by Tumor Suppressor REIC/Dkk-3, and Its Implication in Human Prostate Cancer Cell Growth Inhibition [Internet]. *Acta Medica Okayama.* 2017
31. Kumon H, Sasaki K, Ariyoshi Y, Sadahira T, Ebara S, Hiraki T, et al. Ad-REIC Gene Therapy: Promising Results in a Patient with Metastatic CRPC Following Chemotherapy. *Clinical Medicine Insights Oncology.* 2015; 9:31.

Estudios incluidos en la revisión que sí que cumplen los diversos criterios de inclusión:

32. Kumon H, Sasaki K, Ariyoshi Y, Sadahira T, Araki M, Ebara S, et al. Feasibility of Neoadjuvant Ad-REIC Gene Therapy in Patients with High-Risk Localized Prostate Cancer Undergoing Radical Prostatectomy. *Clinical and Translational Science.* 2015 Dec;8(6):837.
33. Kumon H, Ariyoshi Y, Sasaki K, Sadahira T, Araki M, Ebara S, et al. Adenovirus vector carrying REIC/DKK-3 gene: neoadjuvant intraprostatic injection for high-risk localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *Cancer Gene Therapy.* 2016 Nov; 23(11):400–9.

Guías y estudios para la realización de la metodología de la revisión:

34. Cook, D. A., & West, C. P. (2012). Conducting systematic reviews in medical education: A stepwise approach. *Medical Education*, 46, 943-952.
35. Instrumentos para la lectura crítica | CASPe [Internet]. Available from: <http://www.redcaspe.org/herramientas/instrumentos>
36. Centro Cochrane Iberoamericano, traductores. Manual Cochrane de Revisiones Sistemáticas de Intervenciones, versión 5.1.0 [actualizada en marzo de 2011] [Internet]. Barcelona: Centro Cochrane Iberoamericano; 2012.
37. GRADE handbook [Internet]. Available from: http://gdt.guidelinedevelopment.org/app/handbook/handbook.html#ftnt_ref1

ANEXO 1

Declaración PRISMA. ITEMS PARA UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA.

Lista de comprobación de los ítems para incluir en la publicación de una revisión sistemática (con o sin metaanálisis). La declaración PRISMA

Sección/tema	Número	Ítem
<i>Título</i> Título	1	Identificar la publicación como revisión sistemática, metaanálisis o ambos
<i>Resumen</i> Resumen estructurado	2	Facilitar un resumen estructurado que incluya, según corresponda: antecedentes; objetivos; fuente de los datos; criterios de elegibilidad de los estudios, participantes e intervenciones; evaluación de los estudios y métodos de síntesis; resultados; limitaciones; conclusiones e implicaciones de los hallazgos principales; número de registro de la revisión sistemática
<i>Introducción</i> Justificación	3	Describir la justificación de la revisión en el contexto de lo que ya se conoce sobre el tema Plantear de forma explícita las preguntas que se desea contestar en relación con los participantes, las intervenciones, las comparaciones, los resultados y el diseño de los estudios (PICOS)*
Objetivos	4	
<i>Métodos</i> Protocolo y registro	5	Indicar si existe un protocolo de revisión al que se pueda acceder (por ej., dirección web) y, si está disponible, la información sobre el registro, incluyendo su número de registro
Criterios de elegibilidad	6	Especificar las características de los estudios (por ej., PICOS, duración del seguimiento) y de las características (por ej., años abarcados, idiomas o estatus de publicación) utilizadas como criterios de elegibilidad y su justificación
Fuentes de información	7	Describir todas las fuentes de información (por ej., bases de datos y períodos de búsqueda, contacto con los autores para identificar estudios adicionales, etc.) en la búsqueda y la fecha de la última búsqueda realizada
Búsqueda	8	Presentar la estrategia completa de búsqueda electrónica en, al menos, una base de datos, incluyendo los límites utilizados, de tal forma que pueda ser reproducible
Selección de los estudios	9	Especificar el proceso de selección de los estudios (por ej., el cribado y la elegibilidad incluidos en la revisión sistemática y, cuando sea pertinente, incluidos en el metaanálisis)
Proceso de extracción de datos	10	Describir los métodos para la extracción de datos de las publicaciones (por ej., formularios pilotado, por duplicado y de forma independiente) y cualquier proceso para obtener y confirmar datos por parte de los investigadores
Lista de datos	11	Listar y definir todas las variables para las que se buscaron datos (por ej., PICOS, fuente de financiación) y cualquier asunción y simplificación que se hayan hecho
Riesgo de sesgo en los estudios individuales	12	Describir los métodos utilizados para evaluar el riesgo de sesgo en los estudios individuales (especificar si se realizó al nivel de los estudios o de los resultados) y cómo esta información se ha utilizado en la síntesis de datos
Medidas de resumen	13	Especificar las principales medidas de resumen (por ej., razón de riesgos o diferencia de medias)
Síntesis de resultados	14	Describir los métodos para manejar los datos y combinar resultados de los estudios, cuando esto es posible, incluyendo medidas de consistencia (por ej., ítem 2) para cada metaanálisis
Riesgo de sesgo entre los estudios	15	Especificar cualquier evaluación del riesgo de sesgo que pueda afectar la evidencia acumulativa (por ej., sesgo de publicación o comunicación selectiva)
Análisis adicionales	16	Describir los métodos adicionales de análisis (por ej., análisis de sensibilidad o de subgrupos, metarregresión), en el caso de que se hiciera, indicar cuáles fueron preespecificados
<i>Resultados</i> Selección de estudios	17	Facilitar el número de estudios cribados, evaluados para su elegibilidad e incluidos en la revisión, y detallar las razones para su exclusión en cada etapa, idealmente mediante un diagrama de flujo
Características de los estudios	18	Para cada estudio presentar las características para las que se extrajeron los datos (por ej., tamaño, PICOS y duración del seguimiento) y proporcionar las citas bibliográficas
Riesgo de sesgo en los estudios	19	Presentar datos sobre el riesgo de sesgo en cada estudio y, si está disponible, cualquier evaluación del sesgo en los resultados (ver ítem 12)
Resultados de los estudios individuales	20	Para cada resultado considerado en cada estudio (beneficios o daños), presentar: a) el dato resumen para cada grupo de intervención y b) la estimación del efecto con su intervalo de confianza, idealmente de forma gráfica mediante un diagrama de bosque (forest plot)
Síntesis de los resultados	21	Presentar los resultados de todos los metaanálisis realizados, incluyendo los intervalos de confianza y las medidas de consistencia
Riesgo de sesgo entre los estudios	22	Presentar los resultados de cualquier evaluación del riesgo de sesgo entre los estudios (ver ítem 15)
Análisis adicionales	23	Facilitar los resultados de cualquier análisis adicional, en el caso de que se hayan realizado (por ej., análisis de sensibilidad o de subgrupos, metarregresión [ver ítem 16])
<i>Discusión</i> Resumen de la evidencia	24	Resumir los hallazgos principales, incluyendo la fortaleza de las evidencias para cada resultado principal; considerar su relevancia para grupos clave (por ej., proveedores de cuidados, usuarios y decisores en salud)
Limitaciones	25	Discutir las limitaciones de los estudios y de los resultados (por ej., riesgo de sesgo) y de la revisión (por ej., obtención incompleta de los estudios identificados o comunicación selectiva)
Conclusiones	26	Proporcionar una interpretación general de los resultados en el contexto de otras evidencias, así como las implicaciones para la futura investigación
<i>Financiación</i> Financiación	27	Describir las fuentes de financiación de la revisión sistemática y otro tipo de apoyos (por ej., aporte de los datos), así como el rol de los financiadores en la revisión sistemática

ANEXO 2

Evaluación de la calidad metodológica ³⁶

Kumon H, Sasaki et al 2015 JAPAN

SESGO	RIESGO	APOYO
DE SELECCIÓN: <i>Generación de la secuencia aleatoria</i>	RIESGO BAJO	Cita: "...Table 1. Although the number of patients is small there are no significant differences in patients' characteristics..." (838 CTS)
DE SELECCIÓN: <i>Ocultación de la secuencia de asignación</i>	RIESGO BAJO	Table 1 (838 CTS)
DE REALIZACIÓN: <i>Cegamiento de los participantes</i>	RIESGO INDEFINIDO/ ALTO	Falta de información a pesar de que en el siguiente ensayo explica que es abierto (<i>open-label</i>).
DE REALIZACIÓN: <i>Cegamiento del personal</i>	RIESGO ALTO	DL-4 es considerada como extra y añadida de forma secundaria.
DE DETECCIÓN: <i>Cegamiento de los evaluadores</i>	RIESGO INDEFINIDO	Falta de información
DE DESGASTE: <i>Manejo de los datos de resultado incompleto</i>	RIESGO BAJO	Número de participantes asignados a cada grupo sí que fueron descritos. No hubo pérdidas.

Kumon H, Ariyoshi et al 2016 JAPAN

SESGO	RIESGO	APOYO
DE SELECCIÓN: Generación de la secuencia aleatoria	RIESGO BAJO	Cita: "...Table 1. As reported previously, there were no significant differences in patients..." page 401
DE SELECCIÓN: Ocultación de la secuencia de asignación	RIESGO BAJO	Table 1. page 401
DE REALIZACIÓN: Cegamiento de los participantes	RIESGO ALTO	Cita: "This protocol was an open-label study..." page 401
DE REALIZACIÓN: Cegamiento del personal	RIESGO ALTO	
DE DETECCIÓN: Cegamiento de los evaluadores	RIESGO INDEFINIDO	Falta de información
DE DESGASTE: Manejo de los datos de resultado incompleto	RIESGO BAJO	Número de participantes asignados a cada grupo sí que fueron descritos. No hubo pérdidas.