



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**USO ALOGÉNICO DE LAS CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMALES EN EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE  
LA FÍSTULA RECTOVAGINAL ASOCIADA A LA  
ENFERMEDAD DE CROHN. ANÁLISIS DE RESULTADOS  
DE UN ENSAYO CLÍNICO FASE I-IIa**

**TESIS DOCTORAL**

**CAROLINA DE CARLOS GONZÁLEZ GÓMEZ**

**MADRID, 2013**



# **USO ALOGÉNICO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA FÍSTULA RECTOVAGINAL ASOCIADA A LA ENFERMEDAD DE CROHN. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE UN ENSAYO CLÍNICO FASE I-IIa**

Esta memoria se presenta para optar al grado de Doctor en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Cirugía, por:

**CAROLINA DE CARLOS GONZÁLEZ GÓMEZ**

**DIRECTOR DE LA TESIS:**

**PROFESOR D. DAMIÁN GARCÍA OLMO**

**CATEDRÁTICO DE CIRUGÍA**

**JEFE DE SECCIÓN DE CIRUGÍA COLORRECTAL**

**HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ.**



## AGRADECIMIENTOS

Después de tantos cambios, de tantos meses de trabajo, en la consulta, en el ordenador intentando organizar toda esta información, cuando este trabajo ya está prácticamente acabado, me gustaría pararme un momento para agradecer a todos los que habéis formado parte de este camino.

Gracias a las pacientes, que me enseñan cada día, gracias por ponerlos en nuestras manos, por venir algunas desde muy lejos y no faltar a ninguna consulta durante el año y medio de seguimiento, aun cuando las cosas no fueron fáciles.

Al Dr. García Olmo, por animarnos a estudiar, a aprender, a intentar ser mejores médicos y mejores profesionales cada día aún cuando las cosas no siempre son como nos gustaría, tanto en el quirófano como fuera del mismo. Gracias por tu paciencia y tus correcciones, en medio de una guardia loca, en el despacho o entre sesiones y quirófanos.

Gracias Jacobo, por tu ayuda todos estos meses. Por colarme en el grupo de investigación y animarme a formar parte del mismo. Por tus consejos durante la residencia y por leer cada palabra de este trabajo. Espero poder ayudarte pronto con el tuyo!

Gracias a Paloma por todo tu apoyo, por tu sonrisa, por tu paciencia en las consultas y por enseñarme a mimar a los pacientes. Gracias por organizar las visitas, los cuadernos, por clasificar todo el material y enseñarme a ser meticulosa.

Gracias a todo el equipo de investigación, a Mariano por todo el trabajo de diseño del ensayo, por gestionar todos los permisos y papeleos, por estar pendiente de que todo llegue a buen puerto. Gracias a Tiho y a Héctor, por animarme a participar en los ensayos, por escucharme, por rescatarme cuando hay problemas, por estar siempre ahí. Gracias Loles por ayudarme a escribir, por enseñarme el camino para plasmar en papel estos meses de trabajo. Gracias a Jose Luis, a Juan Antonio, a Luis y a Alberto por recordarme lo importante que es escribir la tesis durante la residencia y por animarme a ello.

Gracias a todos los facultativos del Servicio, por enseñarme no sólo a operar sino a cuidar a los pacientes. Gracias por tener paciencia en quirófano, de día o de noche, en la planta o en las guardias. Por recordarme que lo primero son los pacientes y el resto de cosas del hospital son secundarias.

Gracias a mis compañeros, a mis mayores a Mario, a Bea, por cuidarme cada día. Gracias todos los residentes, por escucharme y por hacerme reír cuando las cosas son diferentes a lo que nos gustaría, a las “madrotas”, por estar ahí cada día, chicas, ¿qué voy a hacer sin vosotras?

Gracias a mis padres, Carlos e Isabel, por animarme a ser médico y por poner en ello todos los medios. Gracias por aguantar las malas caras y las malas contestaciones cuando estoy cansada o agobiada. Gracias a mi abuelo Gregorio, y a María, por enseñarme su amor a la Universidad. Gracias a mis hermanos por su paciencia y por interesarse por este trabajo.

A Paula, Aurora, Elvira, María por estar pendientes y animarme a llegar hasta el final con este trabajo, por sacarme por ahí y llenarme la cabeza de cosas locas, por esas llamadas de desahogo y esos mensajitos de ánimo. Os quiero mucho!

Por último, gracias Pablo. Gracias por cuidarme cada día, a pesar de guardias y cansancios; por aguantar las horas de estudio o de ordenador. Gracias por ayudarme con este trabajo y por plasmar en maravillosos dibujos lo que intentaba transmitir. Gracias por estar a mi lado cada día.

**A Pablo, que prometió hacerme reír cada día. Gracias por cuidarme  
siempre.**

**A mis padres, Isabel y Carlos, por animarme en este camino.**





**“Curar a veces, aliviar a menudo, consolar siempre”**

Dr. Bérard y Dr. Gubler



# ÍNDICE

Agradecimientos	5
Índice de abreviaturas	15
Índice de tablas, figuras y anexos	16
1. Introducción	21
1.1. Preámbulo	23
1.2. Revisión bibliográfica	26
1.2.1. Fístula rectovaginal	26
1.2.1.1. Clasificación	27
1.2.1.2. Fisiopatología	28
1.2.1.3. Etiología y factores de riesgo	30
1.2.1.4. Clínica y diagnóstico	37
1.2.1.5. Complicaciones	38
1.2.1.6. Pronóstico	39
1.2.1.7. Tratamiento	40
1.2.2. Enfermedad de Crohn perianal	55
1.2.2.1. Lesiones perianales en la enfermedad de Crohn	58
1.2.2.2. Diagnóstico y estudio	64
1.2.2.3. Tratamiento de las fístulas de la enfermedad de Crohn perianal	68
1.2.2.3.1 Tratamiento médico	68
1.2.2.3.1.1 Antibióticos	69
1.2.2.3.1.2 Antiinflamatorios	71

1.2.2.3.1.3 Inmunosupresores	74
1.2.2.3.2 Tratamiento quirúrgico	83
1.2.3. Terapia celular con células madre. Medicina regenerativa	90
1.2.3.1. Células madre adultas y embrionarias	93
1.2.3.2. Obtención y cultivo de células madre derivadas de tejido adiposo	96
1.2.3.3. Mecanismo de acción	98
1.2.3.4. Aplicación de la terapia celular en pacientes con enfermedad de Crohn	100
1.2.4. Tratamiento de la fístula perianal con terapia celular	102
1.3. Justificación, hipótesis y objetivos	105
1.3.1. Justificación	105
1.3.2. Hipótesis	106
1.3.3. Objetivos	106
2. Pacientes y métodos	109
2.1. Diseño del ensayo	111
2.2. Selección de pacientes	114
2.3. Aspectos éticos	116
2.4. Descripción de la serie	117
2.5. Desarrollo del estudio	119
2.6. Descripción del tratamiento	122
2.7. Evaluación de la respuesta	129
2.8. Desviaciones del protocolo	132

2.9. Acontecimientos adversos	134
2.10. Estudio de citocinas circulantes	136
3. Resultados	139
3.1. Análisis de factibilidad	141
3.2. Análisis de seguridad	141
3.1.1. Acontecimientos adversos	141
3.1.2. Pacientes que finalizaron el estudio	142
3.2.3. Análisis de citocinas	142
3.3. Análisis de eficacia	145
3.3.1. Resultados clínicos	145
3.3.2. Resultados de los diferentes test aplicados	152
4. Discusión	159
4.1. Ensayos clínicos realizados con terapia celular en el tratamiento de la fístula rectovaginal en enfermedad de Crohn	161
4.2. Análisis de resultados	163
4.3. La fístula rectovaginal en pacientes con enfermedad de Crohn ¿Puede la terapia celular ayudar a su curación?	166
4.3.1. Tratamiento médico de la FRV en la enfermedad de Crohn	167
4.3.2. Tratamiento quirúrgico de la FRV en la enfermedad de Crohn	168
4.3.3. La terapia celular en el tratamiento de la fístula rectovaginal secundaria a enfermedad de Crohn	170
4.4. Sobre la mejor fuente celular	174

4.5. Una mirada al futuro.	176
5. Conclusiones	179
6. Resumen	183
7. Anexos	189
8. Bibliografía	215

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AA	Acontecimiento adverso.
AEM	Agencia Española del Medicamento.
APC	Células presentadoras de antígeno.
eASCs	Células madre adultas derivadas de tejido adiposo expandidas.
BCP	Bancos Productores de células.
BPC	Buena Práctica Clínica.
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica.
CRD	Cuaderno de recogida de datos.
CRO	Clinical Research Organization.
EC	Enfermedad de Crohn.
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal.
FRV	Fístula Rectovaginal.
IF	Interferón.
IL	Interleucina.
iPS	Célula madre pluripotente inducida
OE	Orificio Externo.
OI	Orificio Interno.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
SBF	Suero bovino fetal.
TGB-B	Factor de Crecimiento Transformante.
TNF	Factor de Necrosis Tumoral.

# ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS

## Índice de tablas

Tabla 1.: Evolución de los colgajos transanales.

Tabla 2.: Resultados de las diferentes técnicas de reparación en fistulas rectovaginales en pacientes con Enfermedad de Crohn.

Tabla 3.: Tipos de lesiones perianales.

Tabla 4.: Metabolismo de la Azatioprina.

Tabla 5.: Resultados de las diferentes técnicas empleadas en pacientes con enfermedad de Crohn y fistula perianal.

Tabla 6.: Resultados de las diferentes técnicas empleadas en fistula rectovaginal secundaria a enfermedad de Crohn.

Tabla 7.: Características de las pacientes incluidas en el estudio.

Tabla 8.: Interleucina 2. Valores de referencia < 1.20 U/mL.

Tabla 9.: Interleucina 6. Valores de referencia < 14 pg/mL.

Tabla 10.: Interleucina 10. Valores de referencia < 19 pg/mL.

Tabla 11.: Interleucina 12. Valores de referencia 24-369 pg /mL.

Tabla 12.: Factor de necrosis tumoral alfa. Valores de referencia <16pg / mL.

Tabla 13.: Interferón gamma. Valores de referencia < 0.77 UI/mL.

Tabla 14.: Análisis de citocinas.

Tabla 15.: Resultados de las diferentes técnicas empleadas en fistula rectovaginal secundaria a enfermedad de Crohn.



## Índice de figuras

Fig. 1.: Fístula rectovaginal congénita.

Fig. 2.: Fístula rectovaginal.

Fig. 3.: Colgajo de avance.

Fig. 4.: Obturador en trayecto esfinteriano de fistula rectovaginal.

Fig. 5.: Técnica de Martius.

Fig. 6.: Interposición de gracilis.

Fig. 7.: Interposición de gracilis.

Fig. 8.: Interposición de gracilis.

Fig. 9.: Clasificación de Parks de las fístulas perianales.

Fig. 10.: Dr. Friedenstein y Dr. Gimble.

Fig. 11.: Tratamiento del producto celular.

Fig. 12.: Paciente A02.

Fig. 13.: Paciente A03.

Fig. 14.: Paciente A04.

Fig. 15.: Esquema de tratamiento y desviaciones del protocolo.

Fig. 16.: Resultados clínicos.

Fig. 17.: Sintomatología durante el seguimiento.

Fig. 18.: Test de CDAI. Valores medios e IC en las visitas V-1 a V4.

Fig. 19.: Test de CDAI. Valores medios e IV en las visitas V1bis a V6bis.

Fig. 20.: Valores medios de CDAI en pacientes sin brote de EC.

Fig. 21.: Valores medios del CDAI en pacientes con brote de EC.

Fig. 22.: Test de PDAI. Valores medios e IC de V-1 a V4.

Fig. 23.: Test de PDAI. Valores medios e IC de V1bis a V6bis.

Fig. 24.: Valores medios de PDAI en pacientes que logran cierre.

Fig. 25.: Valores medios de PDAI en pacientes que no logran cierre.

Fig. 26.: Test de Wexner. Valores medios e IC de V-1 a V4.

Fig. 27.: Test de Wexner. Valores medios e IC de V1bis a V6bis.

Fig. 28.: Media SF 36 en pacientes con fístula cerrada.

Fig. 29.: Media SF 36 en pacientes con fístula abierta.

## **Índice de anexos**

Anexo 1.: Clasificación de los hallazgos de las fístulas perianales en la RMN.

Anexo 2.: Índice CDAI (Crohn Disease Activity Index).

Anexo 3.: Índice PDAI (Perineal Disease Activity Index).

Anexo 4.: Fistula Drainage Assessment Measure.

Anexo 5.: Clasificación de Montreal de la enfermedad de Crohn.

Anexo 6.: Escala de Wexner.

Anexo 7.: Informe del Comité Ético I.

Anexo 8.: Informe del Comité Ético II.

Anexo 9.: Hoja de información a los pacientes y consentimiento informado.

Anexo 10.: Presupuesto solicitado para el ensayo clínico.

Anexo 11.: Declaración de Helsinki.

Anexo 12.: Cuestionario SF 36.



## **1. INTRODUCCIÓN**



### 1.1. PREAMBULO

Las fistulas rectovaginales suponen una comunicación anómala epitelizada entre recto y vagina, siendo una condición infrecuente y de etiología diversa, que provoca grandes trastornos sociales, emocionales y sexuales para las pacientes que se ven afectadas. La principal causa en conjunto es obstétrica, si bien en el mundo desarrollado priman las etiología neoplásica y secundaria a enfermedad de Crohn.

Las fístulas rectovaginales suponen hoy en día una de las manifestaciones de la enfermedad de Crohn de mayor complejidad terapéutica, siendo un auténtico reto para Gastroenterólogos y Coloproctólogos experimentados. Por lo general afectan a pacientes jóvenes, pudiendo ser en ocasiones la primera manifestación de esta enfermedad. Suponen una merma importante en la calidad de vida de las pacientes afectadas y según la localización y tamaño del orificio fistuloso la sintomatología puede ser variable, con la emisión de gas, heces o pus en vagina, secreciones malolientes, presencia de infecciones de repetición del trato genitourinario y dolor e irritación a nivel vulvar y perianal.

La principal causa de fistula rectovaginal supone un traumatismo obstétrico, principalmente por un parto prolongado o tras desgarros vaginales importantes. Si bien esta es la etiología principal a nivel mundial, en el mundo desarrollado poseen una mayor prevalencia aquellas desarrolladas de forma secundaria a enfermedad de Crohn. Esta enfermedad inflamatoria se caracteriza por la afectación parcheada y transmural, con una importante afectación de la región perianal. Según las diferentes series, el riesgo de desarrollar una fístula perianal en pacientes con enfermedad de Crohn es del 33% tras 10 años de diagnóstico y del 50% tras 20 años, siendo las manifestaciones perianales la primera manifestación clínica de esta enfermedad hasta en el 45% de las pacientes (37).

Hoy en día se considera que la curación espontánea o medicamentosa es tan improbable que el tratamiento definitivo es principalmente quirúrgico, si bien los resultados obtenidos con las diferentes técnicas descritas resultan en ocasiones desalentadoras, precisando varias intervenciones para lograr el cierre completo del trayecto fistuloso.

En toda intervención quirúrgica de estas pacientes los objetivos buscados son lograr el éxito completo y duradero, evitando un daño del aparato esfinteriano y previniendo la formación de abscesos.

En cada paciente deberemos individualizar el mejor momento para dicha intervención quirúrgica, así como la técnica a aplicar, dado que si en el momento de la cirugía la paciente presenta mal control de la enfermedad de base, las posibilidades de conseguir un cierre fistuloso completo y permanente disminuyen considerablemente. El tratamiento quirúrgico debe acompañarse por tanto de una correcta terapia médica.

Este complicado rompecabezas llevó a nuestro grupo de Investigación al estudio y desarrollo de la terapia celular con células madre derivadas de la grasa. Tras años de experimentación y diferentes ensayos clínicos, ha quedado ampliamente documentado el papel inmunomodulador de esta terapia a nivel local e incluso sistémico, resultando por tanto de gran valía en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, en la cual los mediadores pro y anti inflamatorios se encuentran descontrolados y descompensados, provocando las diferentes manifestaciones.

Este marco conceptual nos llevó a plantear el uso de una terapia alogénica con células madre derivadas de la grasa, con el fin de poder aplicarse a pacientes en las que la obtención de grasa mediante liposucción ofrecía problemas (principalmente debido al carácter malabsortivo de la enfermedad).



Así, se diseñó un ensayo clínico I-IIa para valorar la seguridad y factibilidad de las e-ASC alogénicas en el tratamiento de las fístulas rectovaginales secundarias a enfermedad de Crohn, cuyo desarrollo y resultados se detallarán a continuación.

## 1.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1. FÍSTULA RECTOVAGINAL

Las fístulas perianales criptoglandulares se originan en la inflamación de una cripta anal, en la desembocadura de las glándulas anales de Hermann y Desfosses. Cuando esta inflamación se cronifica da lugar a una comunicación con los tejidos circundantes, por lo general la piel perianal y en ocasiones la vagina. Suponen por tanto una comunicación anómala y epitelizada.

Dicho trastorno data desde la Antigüedad, comenzando la historia de la proctología en de las Antiguas Civilizaciones, siendo ya descritos en el Código de Hammurabi, en torno a 2.200 años A.d.C. los honorarios de los proctólogos, y en el papiro de Chester Beatty del año 1.250 A.d.C., se detalla el tratamiento de las afecciones anales más frecuentes. Las primeras civilizaciones hindúes (400 años A.d.C) describen en las tablillas Akádikas la patología hemorroidal así como las fístulas perianales. Hipócrates (460-365 A.d.C) describe en su *Peeri Siryggon* los procedimientos más frecuentes en el tratamiento de la fístula perianal: La incisión, la cauterización y la ligadura del trayecto fistuloso. Pablo de Egina describe en su tratado de Cirugía las fístulas perianales, en el siglo VII. (75)(76)(77).

La curación del Rey Louis XIV en el año 1686 supone un hito en la cirugía de la fístula perianal. Dicha intervención fue llevada a cabo el 18 de Noviembre de 1686 por el Cirujano Félix Tassy, quien tras cinco intervenciones perianal consiguió curar al monarca. Años después, y a raíz de este acontecimiento, el nieto del monarca decretó el incluir la enseñanza de las técnicas quirúrgicas en las Escuelas de Medicina de Francia, hecho que dio lugar a la posterior creación del Colegio Real de Cirujanos de Inglaterra, fundado en el año 1800. Posteriormente, la fundación del Hospital Sant Mark's en Londres supuso un importante desarrollo en el conocimiento de la patología fistulosa. (78)(79).

Las fistulas rectovaginales suponen una comunicación anómala entre recto y vagina de etiología diversa y difícil manejo clínico y quirúrgico con resultados variables y en ocasiones desesperanzadores. Según o comunicado en la literatura científica, las fístulas rectovaginales tienen una baja incidencia y afectan principalmente a mujeres entre 25 y 65 años de edad. Suponen un problema social y emocional importante, limitando en gran medida la calidad de vida de nuestras pacientes. Su etiología es diversa y su incidencia varía siendo considerablemente superior en los países en vías de desarrollo. En el mundo desarrollado la principal causa es la Enfermedad de Crohn, añadiendo a lo complejo de esta patología la gran variación en su forma de presentación y la variabilidad de la respuesta terapéutica, lo que dificulta su manejo. Los resultados quirúrgicos resultan a menudo desalentadores, con una tasa de éxito inferior al 50%, si bien existe una amplia variabilidad en los diferentes trabajos publicados (74).

Las fistulas rectovaginales continúan siendo la manifestación de la Enfermedad de Crohn más compleja de tratar, a pesar de todos los avances producidos en este tipo de patología, por lo que continúa siendo un reto tanto para los Cirujanos Coloproctólogos como para los Gastroenterólogos. Se han descrito múltiples tratamientos, tanto médicos como quirúrgicos, la mayor parte de ellos con escasa tasa de éxito a largo plazo, por lo que en este momento no existe una técnica de elección para el tratamiento de la fistula rectovaginal en pacientes con Enfermedad de Crohn.

### 1.2.1.1. CLASIFICACIÓN

Las fistulas rectovaginales se clasifican según diferentes criterios siendo los más empleados su tamaño, localización y complejidad (74).

Respecto a su **localización**, las fistulas rectovaginales altas son aquellas comunicaciones entre la pared anterior del recto y la cara posterior de la vagina, en su límite con el cuello uterino, estando por tanto situadas por

encima del aparato esfinteriano anal. Las fistulas desde un reservorio (pouch) a recto estarían incluidas en este grupo.

Las fistulas rectovaginales bajas son aquellas en las que el orificio rectal se encuentra aproximadamente a nivel o ligeramente por encima de la línea pectínea, y el orificio vaginal se encuentra dentro del vestíbulo vaginal. Algunos autores consideran estas fístulas anovaginales, mientras que otros reservan este concepto a aquellas en las que se comunica el canal anal distal a la línea pectínea con la vagina. Estas son las fístulas más frecuentes en los pacientes con Enfermedad de Crohn.

Según su **tamaño**, la mayor parte de las fístulas son menores a 2 cm, clasificándose en grandes si miden más de 2,5, medianas si miden entre 2,5 y 0,5cm y pequeñas si miden menos de 0,5cm de diámetro. Existen pocas fístulas mayores a 2,5cm descritas en la literatura (74).

Según su **complejidad** se clasifican en simples o complejas. El término complejo resulta bastante impreciso, y en ocasiones se considera como tal a aquella fístula cuyo tratamiento conlleva mayor número de recidivas o trastornos de la continencia. Así, consideraríamos una fístula simple a aquella de localización media o baja, de pequeño tamaño, de trayecto único y de etiología traumática u obstétrica y por el contrario consideramos complejas las fístulas recidivadas, las que aparecen tras cirugías perianales y aquellas producidas por enfermedades que tienden a recidivar, como enfermedad inflamatoria intestinal, irradiación pélvica o neoplasias (74).

### 1.2.1.2. FIOSIOPATOLOGÍA

El tabique rectovaginal está conformado por un potente tejido conectivo. Posee fibras elásticas, fibras musculares lisas, y fibras nerviosas autónomas procedentes del plexo hipogástrico, así como un gran número de pequeños vasos. El grosor del tabique rectovaginal es mayor en su parte craneal y menor

en la caudal (1.75 y 1.70 vs 0.2 mm,  $p<0.05$ ), y menor en el centro y mayor hacia sus extremos (2.67 y 2.64 vs 0.17 mm,  $p<0.05$ ) (2).

En las fístulas rectovaginales adquiridas, la reducción del aporte sanguíneo asociada a un aumento de la actividad inflamatoria da lugar a la aparición de isquemia y posterior formación de una úlcera, que posteriormente evoluciona hacia una solución de continuidad, que pone en contacto vagina y recto. La posterior granulación y epitelización da lugar a un trayecto fistuloso.

### 1.2.1.3. ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

#### Fístulas rectovaginales congénitas

Las malformaciones anorrectales suponen un defecto congénito con incidencia y prevalencia variables, y aproximadamente el 50% de los nacidos vivos con malformaciones anorrectales presentan otros defectos congénitos asociados. Las atresias y fístulas rectoanales se producen en uno de cada 5.000 nacidos vivos y son provocadas por anomalías en la formación de la cloaca. (3)(4).

Embriológicamente, la individualización del canal anal y del recto se produce por la tabicación de la cloaca, seguidos por la atrofia y la desaparición del botón cloacal, del canal neuroentérico y del intestino postnatal. En la séptima semana de desarrollo embrionario la porción anterior de la cloaca forma el seno urogenital y la porción posterior se continúa con la abertura del intestino posterior (122). La membrana cloacal cierra la cloaca y se extiende posteriormente cerca del intestino posterior.

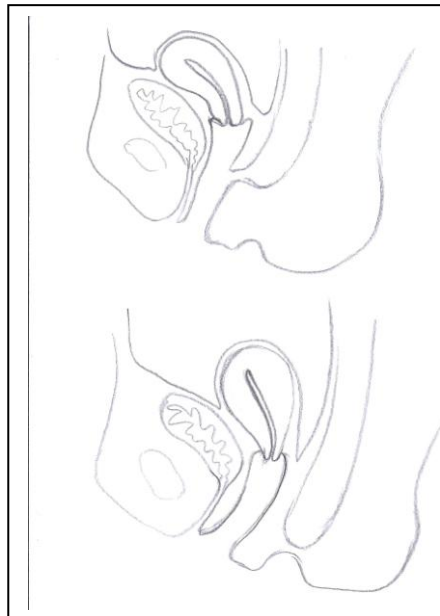


Fig. 1.: Fístula rectovaginal congénita.

Las atresias y fístulas rectoanales son provocadas por anomalías en el tamaño de la región posterior de la cloaca. Si la porción posterior de la cloaca es demasiado pequeña y por ende la membrana posterior de la cloaca es corta, el orificio del intestino posterior se desplaza hacia delante. Si el defecto de la cloaca es pequeño, el desplazamiento es mínimo y genera una abertura baja del intestino posterior en la vagina. Si la región posterior de la cloaca es muy pequeña, la localización del orificio del intestino posterior tiene un mayor desplazamiento anterior con una localización más alta. Así, las atresias y fístulas rectoanales se deben a la posición ectópica del orificio anal. Las lesiones bajas son dos veces más frecuentes que las altas, siendo las intermedias las menos frecuentes de todas (5).

### **Fistulas rectovaginales adquiridas**

La mayor parte de las fistulas rectovaginales resultan condiciones adquiridas. Las diferentes series publicadas en la literatura reflejan que la causa más frecuente son los traumatismos obstétricos, situándose entre un 20 y un 80% de los casos, con una incidencia superior en países en vías de desarrollo. Podemos clasificar las fistulas rectovaginales adquiridas según su etiología, de esta forma:

1. Origen obstétrico.
2. Iatrogénica.
3. Enfermedad inflamatoria intestinal.
4. Infecciosa.
5. Neoplasia.
6. Irradiación pélvica.
7. Miscelánea.

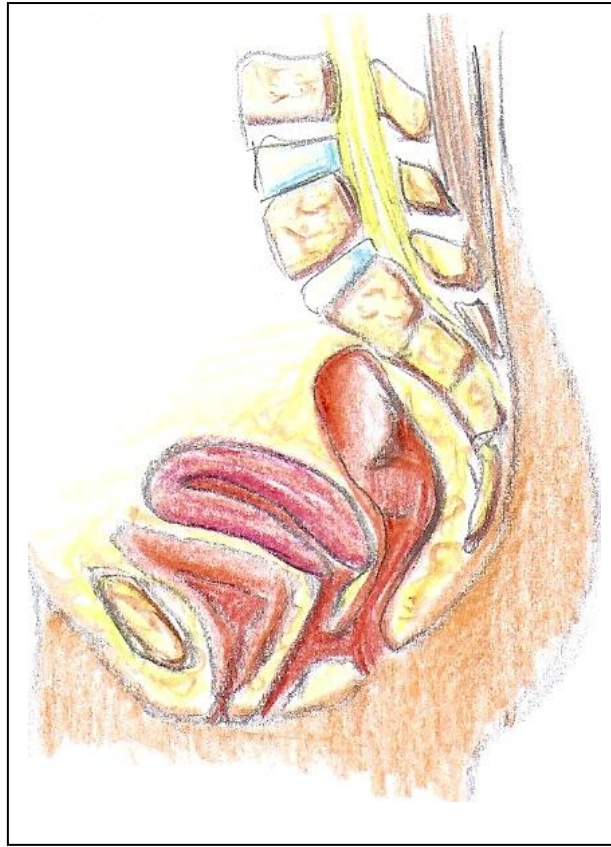


Fig. 2.: Fistula rectovaginal

### Origen obstétrico

Suponen la causa más frecuente de fistulas rectovaginales adquiridas. Su incidencia varía, suponiendo un problema sociosanitario importante en países en vías de desarrollo. En algunas series, las fistulas rectovaginales tienen una incidencia de 23,1 por 100.000 partos (CI 95% 20,8-25,7). Afectan a más de dos millones de mujeres de países en vías de desarrollo y se describen 75.000 nuevos casos al año(6).

Por lo general, las mujeres que las presentan son mujeres jóvenes, con bajo nivel económico y social. Suelen pertenecer a zonas rurales con difícil asistencia sanitaria y no tienen acceso a cuidados prenatales. Suelen ser mujeres de baja estatura (6)(7).



La mayoría de ellas (del 93 al 97%, en algunas series) presentan historia de distocia durante el parto, habiendo tenido partos prolongados. La presión mantenida en el tiempo que provoca el feto en el canal anal de lugar a la aparición de isquemia y muerte tisular. Ello conlleva la formación de un defecto a nivel del tabique rectovaginal.

Asimismo los desgarros vaginales durante el parto pueden ser causa de fistula rectovaginal (7). Se clasifican en varios grados:

- Grado I: Contusión o hematoma.
- Grado II: Laceración superficial (solo mucosa).
- Grado III: Laceración profunda (hasta grasa o músculo).
- Grado IV: Laceración compleja (hasta cuello uterino o peritoneo).
- Grado V: Lesión de órganos adyacentes (ano, recto, uretra, vejiga).

Así, las laceraciones grado IV o V, así como las episiotomías, pueden provocar la aparición de una fistula rectovaginal por sí mismos, por una reparación inadecuada o por la aparición de infección o hematoma tras su resolución. Así, la incidencia de fistula rectovaginal puede llegar a ser del 0,1% de los partos vaginales en los países desarrollados. Esta incidencia es dramáticamente superior en los países en vías de desarrollo (7).

### Origen Iatrogénico

Los traumatismos quirúrgicos, por cirugías rectales, vaginales o pélvicas pueden ser también responsables de la aparición de fistula rectovaginal. Las causas suelen ser lesión quirúrgica directa, isquemia o infección postquirúrgica, especialmente la presencia de abscesos.

Existen múltiples descripciones de casos de fistula rectovaginal tras la realización de hemorroidectomía, cirugía del prolapso rectal, resecciones

transanales y tras resecciones anteriores bajas o ultrabajas. La realización de una anastomosis mecánica ultrabaja puede dar lugar a la aparición, tanto precoz como tardía, de una fistula rectovaginal. Puede ser secundaria un fallo anastomótico y formación de un hematoma o absceso perianastomótico que drena espontáneamente hacia vagina. Algunas resultan de aparición precoz tras la cirugía y otras están descritas como complicaciones tardías. Existen descritos casos de aparición tras la resección mecánica transanal en pacientes con estenosis rectal previa (8)(9).

La histerectomía por vía vaginal, especialmente en los casos que asocia radioterapia pélvica, puede resultar en la formación de una fístula alta.

### Enfermedad inflamatoria intestinal.

Las fistulas rectovaginal pueden presentarse tanto en pacientes con enfermedad de Crohn como en Colitis Ulcerosa, suponiendo una complicación atípica en esta última, si bien están descritas. Debido a la afectación transmural presente en la enfermedad de Crohn, existe en esta mayor prevalencia de FRV frente a la colitis ulcerosa. De esta forma, aproximadamente un tercio de los pacientes con enfermedad de Crohn desarrollan fístulas perianales, ulceraciones y abscesos. En este tipo de pacientes las fistulas rectovaginales pueden encontrarse asociadas a fístulas perianales complejas. La incidencia es superior en aquellas pacientes con mal control de la enfermedad. Asimismo existen descritas fístulas “reservorio-vaginales” en pacientes con colectomía subtotal y anastomosis ileorrectal (24)(37).

Con bastante frecuencia, la presencia de enfermedad perianal puede ser el debut de una enfermedad inflamatoria intestinal, por lo que ante el diagnóstico de una fístula rectovaginal de origen desconocido, debemos realizar una correcta anamnesis y las pruebas complementarios necesarias con el fin de descartar una enfermedad de Crohn incipiente. Por lo general los

pacientes con enfermedad de Crohn presentan difícil tratamiento e importantes recidivas tras el mismo, debido a la inflamación crónica subyacente (51) (74).

### Origen infeccioso

Cualquier proceso infeccioso localizado en continuidad con el tabique rectovaginal, como un absceso de Bartholino o un absceso criptoglandular puede ser el origen de una fistula rectovaginal baja (8).

Por otro lado, las infecciones en el fondo de saco de Douglas, como las derivadas de una enfermedad pélvica inflamatoria o tras una diverticulitis, pueden dar lugar a la aparición de una fistula rectovaginal de localización alta (74).

Otras causas infecciosas descritas, aunque más infrecuentes, pueden ser el linfogranuloma venéreo, tuberculosis con absceso perirrectal o la amebiasis intestinal.

### Secundarias a neoplasia

Una neoplasia primaria, recurrente o metastásica, puede ser la causa de una fistula rectovaginal. Habitualmente se originan por extensión de neoplasias malignas a nivel colorrectal, del cuello uterino, útero o vagina, especialmente en aquellos casos en los que existe extensión locorregional o en casos asociados a tratamiento radioterápico (74).

Existen asimismo descritos casos de fistula rectovaginal secundarias a la presencia de implantes de endometriosis que se extienden desde vagina fistulizando a mucosa rectal.

### Secundarias a irradiación pélvica

La radioterapia para el tratamiento de tumores rectales y ginecológicos puede ser también causa de fistula rectovaginal. La incidencia comunicada tras

irradiación varía entre un 0,3% y un 6%, apareciendo la mayoría entre 6 meses y 2 años después de finalizar la radioterapia. El riesgo de aparición es proporcional a la dosis administrada y a la extensión de la región radiada. Asimismo, el riesgo de aparición de fistula rectovaginal aumenta en pacientes en las que se asocian cirugía y radioterapia. Inicialmente se produce una proctitis seguida de ulceración de la pared rectal anterior. Entre un tercio y la mitad de dichas úlceras progresarán a una fístula rectovaginal (10) (74).

### Miscelánea

Existen varias descripciones de fistula rectovaginal asociadas a síndrome de Behçet. El síndrome de Behçet es un trastorno crónico, que se caracteriza por una vasculitis inespecífica de vasos de todo tamaño, y que típicamente se manifiesta con la presencia de úlceras orales, genitales, oculares y lesiones cutáneas inespecíficas. El correlato a nivel microscópico es de una vasculitis que produce inflamación y necrosis de los tejidos adyacentes (11)(12).

Ocasionalmente, algunos procesos hematológicos, como leucemia, anemia aplásica y agranulocitosis se han relacionado con la aparición de fistula rectovaginal, debido a la isquemia tisular que pueden producir.

La impactación fecal puede producir una úlcera rectal por necrosis isquémica de la pared rectal y posteriormente una fistula rectovaginal.

Se ha descrito en la literatura, su aparición tras la administración de supositorios de ergotamia. Asimismo, existen descritos dos casos de fistula rectovaginal durante y tras la administración de bevacizumab (avastina)(13)(14).

### 1.2.1.4. CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO

Para su identificación, se requiere una exploración meticulosa y una correcta historia clínica, y así poder identificar el tamaño y localización de la fístula, así como su posible causa (37)(55).

Los síntomas dependen del tamaño de la fístula y de la localización de la misma, siendo los más frecuentes la expulsión de aire y heces a través de la vagina. Las fístulas de pequeño tamaño se manifestarán con la expulsión ocasional de aire o moco, o de forma más sutil con una secreción vaginal maloliente o como vaginitis crónica o recurrente (74).

Puede asociarse a incontinencia fecal por lesión esfinteriana anal, aunque a menudo resulta difícil diferenciarlo de la expulsión involuntaria por vagina. Por este motivo es fundamental una correcta exploración para confirmar la integridad de los tejidos circundantes.

Asimismo puede aparecer sintomatología asociada a la enfermedad subyacente, como diarrea, rectorragia, tenesmo o dolor abdominal, lo que nos orientaría hacia una posible enfermedad de Crohn (37)(55).

A la exploración identificaremos restos de heces en vagina. Si la fístula es baja se podrán palpar ambos orificios fistulosos durante la exploración rectovaginal bimanual. Podemos ayudarnos de un rectoscopio para dicha exploración (74).

En muchos casos, a pesar de una clínica sugerente, en la exploración no confirmaremos la presencia de una fístula rectovaginal, puesto que no siempre es fácil localizar los orificios vaginal o rectal si éstos son de pequeño tamaño. Así, puede resultar de ayuda, la instilación de azul de metileno a nivel rectal o de contraste, o de agua oxigenada y realización de fistulografía (15).

La ecografía endorrectal y la resonancia magnética pélvica, puede identificar el trayecto fistuloso, así como informarnos de otras alteraciones,

como la presencia de abscesos en el tabique rectovaginal y el grosor de este, tractos secundarios o daños en el esfínter, con una alta sensibilidad y especificidad. La resonancia puede describir la presencia de fístulas rectovaginales como hallazgo incidental, si bien su sensibilidad disminuye en fístulas de pequeño tamaño, o puede dar lugar a falsos positivos en aquellos casos en los que se ha resuelto el cuadro. Nos aportará asimismo información sobre el grado de actividad en la enfermedad Inflamatoria (16)(37)(55)(74).

La rectoscopia puede permitirnos la visualización del orificio rectal y nos aportará información sobre el grado de actividad en la enfermedad de Crohn, así como de la presencia de lesiones concomitantes, por lo que es obligada como parte del estudio preoperatorio en pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (55).

Es importante conocer el estado del esfínter anal cara al planteamiento quirúrgico, ya que la incontinencia anal concomitante puede alterar la decisión en la técnica quirúrgica a emplear. Esto resulta importante en las fístulas secundarias a traumatismos, reparaciones previas fallidas y en casos de incontinencia anal preoperatoria. Para ello pueden ayudarnos la ecografía endoanal y la manometría (74).

### **1.2.1.5. COMPLICACIONES**

Las complicaciones más frecuentes que afectan a estas pacientes son aquellas relacionadas con la esfera social y emocional. La mayor parte de las pacientes padecen depresión, y muchas de ellas poseen ideaciones suicidas. La mayoría de las pacientes padecen problemas sexuales y, algunas son rechazadas por su pareja e incluso por sus familias o su comunidad, especialmente es países en vías de desarrollo (17).

Muchas de estas pacientes padecen urgencia miccional, infecciones del tracto urinario de repetición, dispareunia, prurito vaginal o amenorrea. Por otro lado, los diferentes procedimientos quirúrgicos presentan un riesgo potencial de dispareunia y de incontinencia anal.

Asimismo, se han descrito algunos casos de malignización con subsiguiente aparición de adenocarcinoma o de adenocarcinoma mucinoso en las fistulas de larga evolución, especialmente en las asociadas a enfermedad de Crohn (18) (126).

### **1.2.1.6. PRONÓSTICO**

Las fistulas rectovaginales poseen una recurrencia superior a las fístulas perianales simples. Algunas series describen recurrencias del 30% a los 7 años del tratamiento quirúrgico. El éxito tras un solo procedimiento quirúrgico está en 58% según los metaanálisis publicados, siendo esta cifra variable. El cierre de la fístula se logra en la mayor parte de las pacientes, pero es necesaria más de una intervención. En la mayor parte de los casos, no se ve alterada la función esfinteriana tras la intervención (1)(37).

Podemos definir el éxito quirúrgico, como el cierre de los orificios interno y externo (perianal y vaginal), la epitelización del trayecto fistuloso, la ausencia de drenaje sin necesidad de requerir intervenciones posteriores y la no formación de abscesos a nivel del tabique rectovaginal.

La tasa de éxito depende no solo del tratamiento quirúrgico, sino también, y especialmente de la etiología de la misma. Otro factor a tener en cuenta para la curación es que la fístula sea simple o compleja. En las fístulas en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, la colitis ulcerosa presenta mejor pronóstico que la enfermedad de Crohn. Algunos autores consideran que los pacientes con colitis ulcerosa y fistula rectovaginal pueden ser tratados con

éxito mediante proctocolectomía restauradora, sin embargo están expuestos a riesgo de recurrencia tardía de la fístula. La tasa de éxito para las fístulas relacionadas con la enfermedad de Crohn suele ser peor. La presencia de colitis y enfermedad activa, edad al comienzo de la enfermedad inferior a los 20 años, y fístulas altas son indicadores de mal pronóstico (19)(20)(21)(37).

Por lo general las fistulas derivadas de problemas obstétricos tienen una buena respuesta al tratamiento quirúrgico y altas tasas de curación, en un alto porcentaje curan con manejo conservador (6)(7).

En pacientes fumadoras la recurrencia parece ser mayor, dado que se ve alterado el proceso de cicatrización, observándose una tasa de cierre menor un 15%, muy inferior inferior que en el grupo de no fumadores. Asimismo, se encontró una relación estadísticamente significativa entre el número de cigarrillos fumados y la tasa de recurrencia, especialmente en pacientes jóvenes (11)(22)(23).

Respecto a las diferentes técnicas quirúrgicas, ninguna ha demostrado una clara superioridad. Una reparación quirúrgica precoz (en los tres primeros meses) parece mejorar los resultados quirúrgicos (24)(25)(26).

A pesar del tratamiento quirúrgico apropiado, las fistulas producidas por el cáncer de cérvix tienen el peor pronóstico, al igual que las secundarias a otras neoplasias localmente avanzadas, con una tasa de curación desalentadora especialmente si asocian radioterapia (74).

### **1.2.1.7. TRATAMIENTO**

En este momento no existe un tratamiento estandarizado para las fistulas rectovaginales. Cada paciente requerirá de un completo estudio preoperatorio en función del cual se decidirá con carácter individualizado el mejor tratamiento a aplicar (55).



Otro factor a tener en cuenta es el mejor momento para el tratamiento de la misma. En primer lugar deberemos tratar la causa de la fístula, por tanto, en casos de Enfermedad Inflamatoria Intestinal será fundamental el control de la enfermedad de base, con normalización de los parámetros inflamatorios y control de la infección en los casos en los que esté presente, así como el estado nutricional de la paciente y el control de las diferentes comorbilidades que pueden influir en el proceso cicatricial (37)(74).

### **Tratamiento medico**

Aunque los procedimientos quirúrgicos sean la base en el tratamiento de las FRV, no podemos perder de vista aquellos cuidados y tratamientos que pueden beneficiar a nuestras pacientes (55).

Es fundamental asegurar una correcta nutrición e hidratación, control de infección y sepsis en caso de que existieren, así como el control de las diferentes patologías asociadas, previamente al tratamiento quirúrgico. Se emplearán de manera selectiva antibióticos, inmunomoduladores y agentes biológicos. La correcta higiene y control de las deposiciones mediante técnicas higiénicas, dietéticas e incluso farmacológicas supone medidas simples y baratas, que pueden hacer mejorar la sintomatología de nuestras pacientes(24)(25).

No existe ningún fármaco específico para el tratamiento de las fístulas rectovaginales. Se usan principalmente fármacos inmunosupresores e inmunomoduladores, como la Azatioprina, 6 Mercaptopurina, Mycofenolato Mofetil, Ciclosporina A, Tacrolimus e Infliximab en el cierre de los orificios fistulosos, especialmente en pacientes afectadas de enfermedad inflamatoria intestinal, aunque su éxito es menor que en el cierre de fístulas perianales, como desarrollaremos más adelante. Concretamente, el Infliximab ha demostrado el cierre en el 30% de las FRV simples de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, según algunas series. Otras series sin

embargo describen que esta tasa de éxitos se mantiene tan sólo a corto plazo (26)(27).

### **Tratamiento quirúrgico**

La elección del momento de la intervención puede verse retrasada por dos motivos: En primer lugar por la posibilidad del cierre espontáneo de la misma, ya que se ha evidenciado en determinadas series hasta un 52% de cierre espontáneo de las fístulas, especialmente en las secundarias a trauma obstétrico. En el caso de fístulas secundarias a irradiación o neoplasia, raramente curan de forma espontánea, y en casos de Enfermedad de Crohn, la cifra es casi inexistente. Y en segundo lugar, la presencia de fenómenos inflamatorios o infecciosos pueden retrasar la cirugía, ya ésta se debe aplicar cuando los tejidos circundantes sean flexibles y estén en buen estado (37)(74).

La elección de la técnica quirúrgica depende principalmente de su localización, tamaño, cirugías previas y del estado del esfínter anal, precisando por tanto un tratamiento individualizado. Por lo general, las fístulas rectovaginales altas precisarán de un abordaje abdominal, mientras que las bajas se beneficiarán de un abordaje perineal. El objetivo del tratamiento es eliminar la fístula sin alterar la función esfinteriana. No existe ninguna técnica que haya demostrado superioridad en el momento actual, por lo que debemos individualizar el tratamiento en cada caso (54).

Podemos dividir las opciones quirúrgicas en varios grupos:

1. Reparaciones locales: Por vía transanal, transvaginal o transperineal.
2. Procedimientos abdominales.
3. Procedimientos con trasposición de tejidos.

### **1. Reparaciones locales.**

1.A. Fistulotomía: El empleo de fistulotomía simple mediante acceso perineal no debe ser empleado en el tratamiento de las fístulas rectovaginales, ya que obliga a la sección esfinteriana anterior, que generará una alta tasa de de incontinencia postoperatoria. Únicamente en el caso de fístula anovaginales o fistulas bajas, cuyo trayecto se encuentre infraesfinteriano, ésta es una opción válida.

1.B. Fistulectomía y cierre por planos: Se puede realizar por vía transanal, transvaginal o transperineal. Se realiza exéresis completa del trayecto fistuloso y sutura muscular y de la mucosa rectal. El orificio vaginal puede permanecer abierto con el fin de favorecer el drenaje de la herida quirúrgica. Es fundamental conservar el máximo tejido rectal y realizar una hemostasia perfecta antes de realizar la sutura, ante el riesgo de una dehiscencia precoz de la reparación por evacuación de un hematoma en el tabique. En las fístulas altas ha demostrado ser de utilidad el abordaje mediante microcirugía endoscópica transanal o TEM, especialmente en aquellas pacientes en las que el abordaje abdominal no es posible (36).

1.C. Colgajos de descenso: A grandes rasgos, existen dos tipos, pudiéndose realizar a expensas del recto o a expensas de la vagina. En ambos casos, la amplitud del despegamiento y el grosor del colgajo deben ser importantes para evitar cualquier tracción de la sutura, cualquier desgarró del colgajo y permitir desplazar las diferentes reparaciones y mantener asimismo una correcta vascularización. Los colgajos deben ser completos, incluyendo mucosa, submucosa y muscular y su tallado debe ser extremadamente meticuloso, realizando una hemostasia exquisita con el fin de evitar la posterior formación de hematomas y abscesos. Esta técnica no está recomendada en pacientes con fístula alta con presencia de enfermedad inflamatoria activa dada la alta tasa de fracaso, ni tampoco en pacientes que presentan estenosis rectales, por el riesgo de empeorar la estenosis (74).

El colgajo o flap más comúnmente empleado es el rectal. Tras la localización de los orificios rectal y vaginal se canaliza el trayecto fistuloso. Se realiza escisión del orificio rectal y legrado del trayecto, cerrándose el mismo con una sutura reabsorbible de 2/0 o 3/0. El colgajo se realizará con morfología con forma de “U”, con una base ancha que permita una correcta vascularización, debe cubrir ampliamente el orificio fistulosos rectal y su espesor abarcará la mucosa, submucosa y parcialmente el esfínter anal interno. Se realiza fijación del mismo siempre con puntos sueltos intentando minimizar al máximo la tensión del mismo para disminuir el riesgo de dehiscencias, pudiendo utilizarse sutura monofilamento o trenzada, preferiblemente de materiales reabsorbibles. Puede asociarse a un legrado del trayecto fistuloso o a la exéresis del trayecto, mejorando de esta forma los resultados.

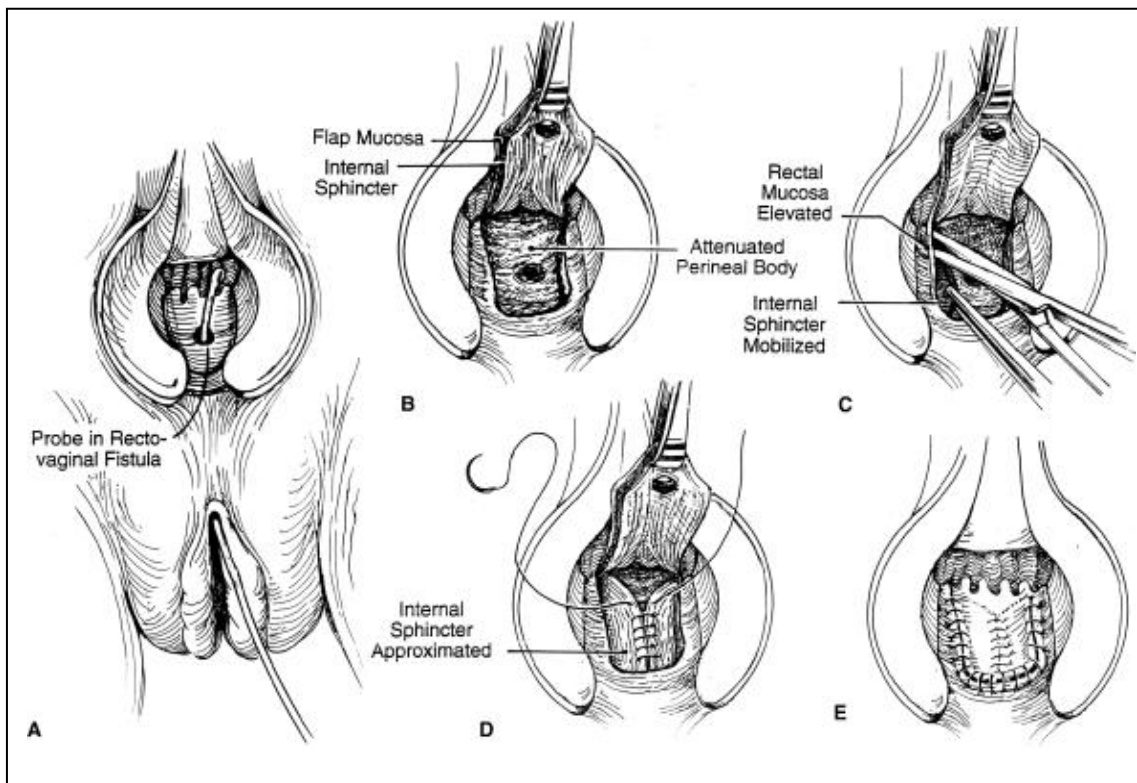


Fig. 3.: Colgajo de avance. Tomado de (74)

La tasa de éxito varía entre el 29 y el 100% de los casos, en función de las series (como puede verse en las tablas 1 y 2), esta amplia discrepancia se debe tanto a las diferencias técnicas como a la selección de las pacientes y los periodos de seguimiento. Las complicaciones más frecuentes son la formación de hematomas en el tabique rectovaginal, abscesos o la dehiscencia de la sutura y otras con menor frecuencia como fiebre, dolor o infección urinaria (54)(74).

Autor	Año	Número de pacientes	Éxito (%)
Mengert y Fish	1955	9	100
Belt y Belt	1969	8	100
Russel y Gallgher	1977	21	78
Hilsabeck	1980	9	100
Hoexrter et al	1985	35	100
Jones et al	1987	12	75
Stern y Drezink	1987	8	87,5
Lowry y Goldberg	1991	85	78
Wise et al	1991	34	96

Tabla 1.: Evolución de los colgajos transanales (74)

En algunos pacientes pueden asociarse ambos colgajos (anal y vaginal), especialmente en pacientes con el grosor del tabique rectovaginal conservado y que no presenten otras lesiones asociadas ni zonas de debilidad ni inflamación del mismo. Como decimos, los resultados son muy similares con ambos colgajos. Por lo general existe más experiencia en la realización de colgajos rectales, dado que este tipo de reparaciones por lo general la realizan cirujanos Coloproctólogos (28)(29)(37).

Autores	Pacientes/ Reparacion	Procedimiento	Curación (%) inicial/final	Recurrencia (%)
Joo et al 1998	20	Flap rectal	-/75	
Windsor et al 2000	13/21	Cierre simple	40/77	54
Athanasiadis et al 2007	37/56	Varios	51/73	30
	-/20	Abordaje transanal	70	
	-/15		73	
	-/14	Cierre simple	86	
	-/7	Flap anocutáneo	29	
		Flap de avance		
Ruffolo et al 2009	52/71	Varios	56/81	10
	-/36	Flap rectal	56	
	-/23	Flap vaginal	57	

Tabla 2.: Resultados de las diferentes técnicas de reparación en fistulas rectovaginales en pacientes con Enfermedad de Crohn: (54)

1.D.Obturación: En los últimos años ha aparecido un nuevo tratamiento gracias al desarrollo de colágeno y fibrina de origen humano. La ventaja del mismo es que no conlleva grandes daños, al no researse los tejidos, y que puede emplearse varias veces, sin riesgo de dejar de lado otras opciones terapéuticas. En aquellas FRV de trayectos largos, finos, tortuosos y ramificados, en las que no existe infección ni inflamación de los tejidos subyacentes, puede resultar beneficioso. El éxito de esta técnica por lo general es bajo, en torno al 15%, a pesar de todo, dada la baja morbilidad y la simplicidad del procedimiento, éste se sigue utilizando.(32)(33)

1.E.:Plug: Otra opción terapéutica descrita supone la colocación de una prótesis tipo plug sobre el orificio fistuloso rectal, para lograr su cierre a largo plazo. Puede emplearse una prótesis de origen porcino (mucosa intestinal), que se introduce en el trayecto fistuloso una vez drenado el material purulento y legrado el trayecto. Este cono se fija con una sutura reabsorbible de 2-0, pudiendo colocarse a través del orificio rectal o vaginal. La experiencia con esta técnica es limitada y los resultados variables, siendo relevante asimismo el incremento de los costes derivados de la fabricación de la malla.(34)

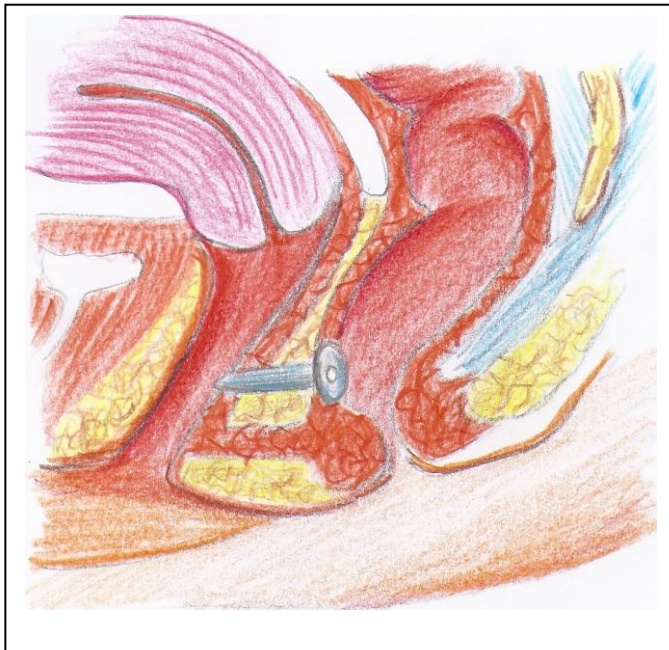


Fig. 4.: Plug en trayecto esfinteriano de fistula rectovaginal

1.F. Esfinteroplastia transperineal: Permite tratar defectos esfinterianos asociados, empleándose en casos muy seleccionados, en fístulas simples y bajas.

1.G.:Resección mecánica transanal: Existen casos descritos de resección fistulosa mediante una resección mecánica transanal que incluye el orificio fistuloso. La recurrencia postoperatoria es elevada y la experiencia escasa. (30)

1.H.:Clip: Asimismo, existen descripciones de cierre fistuloso tras la colocación endoscópica de un clip sobre el orificio rectal de la fístula.(31)

1.I.:TEM: Diversos artículos apelan a la utilidad de la microcirugía endoscópica transanal en cualquiera de las técnicas transanales.(35)(36)

### **2. Procedimientos abdominales.**

Están indicados para las fistulas rectovaginales altas, las complejas secundarias a radioterapia, neoplasia y, en ocasiones, en enfermedad inflamatoria intestinal. También resultan de utilidad en fistulas de tamaño mayor a 2,5cm. Los procedimientos abdominales pueden permitir el abordaje y la resección de todo el tejido enfermo, así como la interposición de tejido bien vascularizados y, siempre que sea posible, la preservación de la integridad del esfínter anal (54).

Estas intervenciones consisten en realizar una sutura directa con interposición de un fragmento de epiplón mayor, una rectoplastia o una resección rectal. Puede realizarse bien por vía abierta o por vía laparoscópica.

2.A. Sutura directa e interposición del epiplón mayor por vía de acceso mixta: Se realiza una disección completa del recto con liberación del tabique rectovaginal, bien por vía abierta o por vía laparoscópica. Se realiza cierre con puntos sueltos del orificio rectal y finalmente se interpone epiplón liberado entre vagina y recto (54).

2.B. Rectoplastias: En la actualidad no están indicadas para las fístulas, aunque históricamente se han realizado.(38)

2.C. Resecciones rectales: Pueden llevarse a cabo por laparotomía o por laparoscopia. Se realizan especialmente en aquellas fístulas secundarias a



enfermedades que conllevan una afectación importante del recto, como las derivadas de neoplasias o de enfermedad inflamatoria intestinal(54).

### **3. Procedimientos con transposición de tejidos**

La finalidad de los diferentes procedimientos con transposición de tejidos es evitar el contacto entre dos líneas de sutura mediante la interposición de tejido bien vascularizado que permita una cicatrización adecuada. Así, se ha empleado como tejido de interposición el músculo bulbocavernosos, gracilis (recto interno), sartorio, glúteo mayor y recto anterior del abdomen (54).

3.1. La técnica de Martius, descrita inicialmente en 1928, realiza interposición del músculo bulbocavernoso entre recto y vagina, a partir de una incisión vaginal. Se realiza en casos muy seleccionados, en fistulas rectovaginales bajas y las complicaciones más frecuentes son incontinencia fecal recurrente y dispareunia. (39)(40)

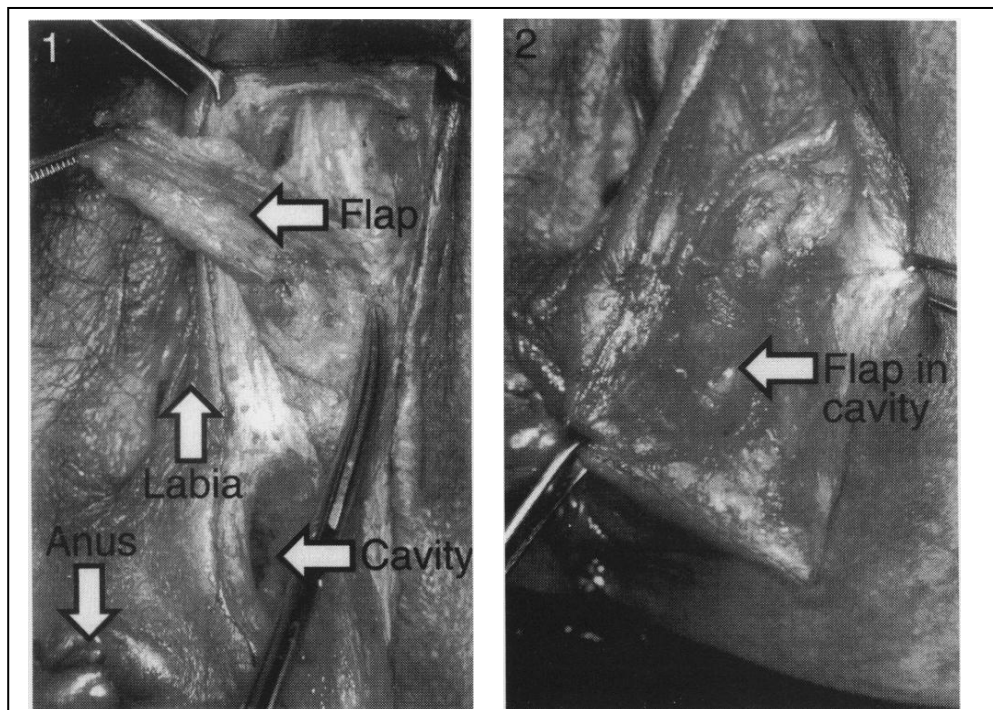


Fig. 5.: Técnica de Martius. Tomado de (39)

3.2. La interposición del músculo gracilis fue descrita por Pickerell en 1952, inicialmente empleada para sustituir el esfínter anal en niños con incontinencia anal. Una vez colocado al paciente en posición de litotomía se realiza una incisión perineal identificando el plano entre el esfínter anal externo y la vagina, resecaando el trayecto fistuloso. Se realiza una incisión longitudinal a lo largo de la cara interna del muslo identificando el músculo gracilis. El tendón es desinsertado y liberado, creando un túnel subcutáneo y conduciéndolo hacia el periné, donde se coloca entre recto y vagina. Al interponer tejido sano se evita la aparición de recidivas, resultando por tanto una técnica útil en aquellos casos de recidiva fistulosa. Puede realizarse con la colaboración de un cirujano plástico, con el fin de garantizar la correcta colocación y fijación del colgajo. (20)(41)(42)



Fig. 6.: Interposición de gracilis. Tomado de (66)

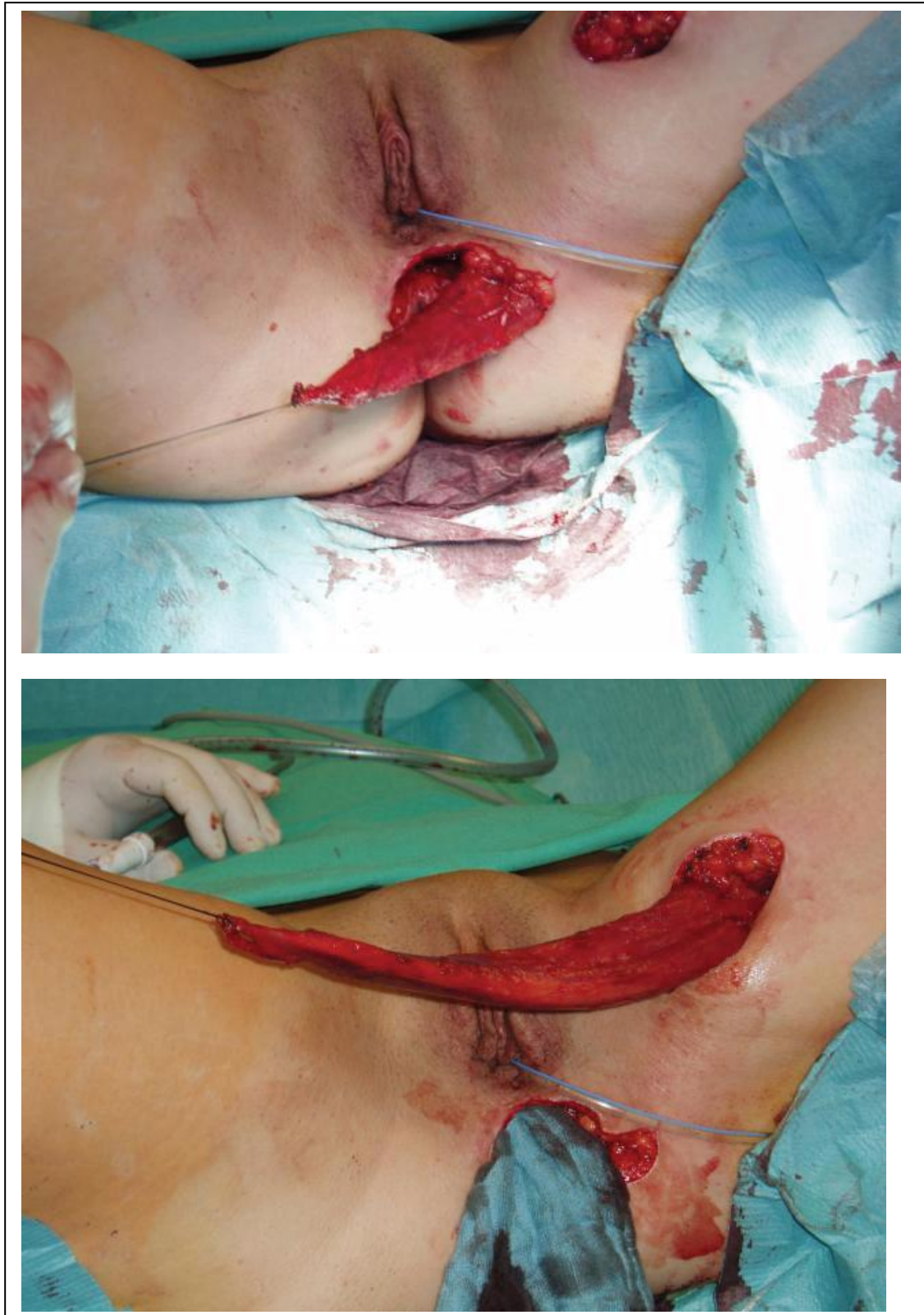


Fig. 7.: Interposición de gracilis. Tomado de (66)





Fig. 8.: Interposición de gracilis. Tomado de (66).

3.3. Asimismo se han descrito éxitos terapéuticos tras la realización de colgajos miocutáneos del recto abdominal vertical (VRAM) y transverso (TRAM) (43)

Existen también descritas procedimientos de interposición de materiales protésicos, tanto tapones como mallas de diferentes materiales (ác. Poliglicólico o Dexon, Surgisistrade, mallas de origen porcino), entre recto y vagina, con el fin de separar las líneas de sutura e inducir fibrosis.(44)(45)(46)(47)(48)(49)(50)

Finalmente, podemos decir que existen múltiples técnicas descritas, sin que ninguna de ellas muestre una clara superioridad, por lo que deberemos individualizar el tratamiento en cada una de las pacientes y aplicar aquellas técnicas con las que esté más familiarizado el equipo quirúrgico correspondiente.

### **El papel de los estomas en el tratamiento quirúrgico de las FRV**

El tratamiento de una FRV alta, sea cual sea su etiología es a menudo largo y dificultoso y la calidad de vida de las pacientes está, a menudo, afectada. La repercusión psicológica, familiar y socioprofesional es muy importante, siendo los costes directos e indirectos derivados de la misma muy elevados. Todos estos factores hacen que en ocasiones se plantee desde el principio la realización de una estoma temporal o definitivamente, especialmente en pacientes de edad avanzada, con incontinencia anal irreversible y con función anorrectal muy comprometida (51)(52)(53)

Los casos de fístulas rectovaginales que asocien sepsis de origen pélvico pueden plantear la realización de una colostomía de derivación urgente, con el fin de aislar la pelvis y derivar las heces.

Ha sido motivo de controversia la necesidad de practicar una colostomía derivativa temporal en la reparación de fístulas rectovaginales complejas. Para

muchos grupos, la actitud más segura es la de asociar una colostomía derivativa en los casos de fístulas rectovaginales complejas, recurrentes y secundarias fundamentalmente a enfermedad inflamatoria intestinal o radioterapia, así como en las que se realizan procedimientos complejos o que implican movilización de tejidos, aunque no se ha demostrado un beneficio real de dichas derivaciones fecales. Tras la realización de la misma pueden intentarse un nuevo abordaje fistuloso, encontrando mayores tasas de éxito (51).

En nuestro grupo, intentamos evitar la realización de colostomías exceptuando los casos de sepsis perianal que puedan poner en peligro la vida de la paciente. A pesar del complicado abordaje de esta patología, abogamos por el abordaje perianal de la misma, intentando evitar realizar estomas, tanto temporales como definitivos, y en la medida de lo posibles evitar las intervenciones sobre la cavidad abdominal en un intento de disminuir la agresividad del tratamiento así como sus potenciales complicaciones.

### 1.2.2. ENFERMEDAD DE CROHN PERIANAL

La enfermedad de Crohn supone una patología crónica inflamatoria con múltiples manifestaciones clínicas, la mayor parte de las cuales se manifiestan en el tracto digestivo, con tendencia a la formación de abscesos y fístulas hacia estructuras adyacentes. La enfermedad inflamatoria intestinal representa un cuadro multisistémico, de distribución mundial y origen idiopático (123). En 1859 Wilks realiza la primera descripción de la colitis ulcerosa, mientras que es en 1932 cuando los Dres. Crohn, Ginzburg y Oppenheimer caracterizaron la enfermedad de Crohn. Aunque la etiopatogenia de la misma aún permanece poco clara, la teoría más aceptada actualmente supone un grupo heterogéneo de enfermedades con una manifestación final común en la que están implicados diversos factores genéticos y ambientales. La incidencia y prevalencia de la Enfermedad de Crohn en los Estados Unidos es similar a la europea, suponiendo 5/100.000 y 50/100.000 y los costes anuales directos e indirectos derivados de dicha enfermedad rondan los 826 millones de dólares en Estados Unidos (37)(123).

La incidencia de la enfermedad de Crohn difiere topográficamente, siendo más frecuentes en blancos que en negros, en mujeres que en hombres, y en la sociedad judía frente a la no judía. Los factores ambientales pueden desempeñar un papel en el desarrollo de la enfermedad de Crohn, ya que mientras que la enfermedad es poco común en negros africanos, negros de Estados Unidos poseen una incidencia similar a la de los blancos. Además, existe una asociación con la dieta, la enfermedad afecta más a los fumadores frente a los no fumadores. Si bien puede manifestarse a cualquier edad, la incidencia es principalmente bimodal, con un pico de aparición en la tercera década de la vida y otro pico menos acusado, en la quinta década (37).

La etiología de la enfermedad de Crohn se desconoce, si bien se postula una triple influencia: Genética, medioambiental e infecciosa. Fisiopatológicamente, la enfermedad provoca una disfunción del sistema

inmune, con un desequilibrio entre la producción local de citoquinas pro-inflamatorias a nivel de la mucosa, en detrimento de la producción de aquellas anti-inflamatorias, con lo que se produce a nivel local, una inflamación transmural discontinua de la tracto digestivo (37).

Es importante diferenciar la enfermedad de Crohn de otro tipo de patologías intestinales, dado que en este momento supone un trastorno inflamatorio crónico incurable desde el punto de vista médico o quirúrgico, precisando un abordaje multidisciplinar con el fin de mantener al paciente asintomático con la mejor calidad de vida posible, así como minimizar al máximo las complicaciones a largo plazo y los efectos secundarios de los diferentes tratamientos. A pesar de la menor incidencia de la enfermedad de Crohn respecto a otras patologías gastrointestinales, el coste médico y quirúrgico de la misma supone 2 billones de dólares anuales en los Estados Unidos, que se ve en aumento dados los recientes tratamientos, especialmente el uso de biológicos, que han supuesto un aumento considerable de los costes terapéuticos. Las tasas de hospitalización suponen 27/100.000 habitantes según un reciente estudio realizado en Canadá, con una media de estancia hospitalaria de 9 días, requiriendo hasta la mitad de los pacientes hospitalizados tratamiento quirúrgico (37)(123).

El estudio de los diferentes fenómenos inflamatorios en los últimos años, así como de los diferentes mediadores implicados ha supuesto un mejor conocimiento de la enfermedad inflamatoria intestinal así como el desarrollo de múltiples tratamientos para la misma. La terapia farmacológica de la enfermedad inflamatoria intestinal incluye un amplio grupo de fármacos, que van desde los más clásicos como los corticoesteroides o los aminosalicilatos, hasta los inmunomoduladores, como la azatioprina, el metotrexato o la ciclosporina, pasando por ciertos antibióticos. La aparición de la terapia biológica ha supuesto una auténtica revolución, que tiene como máximo exponente a los anticuerpos anti-TNF-alfa. Salvo en situaciones de urgencia por sepsis perianal, el tratamiento médico es el primer escalón en el manejo de la



enfermedad de Crohn perianal, y en muchas ocasiones controlará la enfermedad haciendo innecesaria la cirugía. Cuando se precisa ésta, a propósito del tratamiento definitivo de la lesión perianal, ha de contraponerse el riesgo de desarrollar complicaciones, especialmente la incontinencia (37)(54).

### **Inmunidad en la enfermedad de Crohn**

La teoría más aceptada en la actualidad aboga por una respuesta inflamatoria generada en individuos genéticamente susceptibles ante estímulos ambientales que en personas normales son inocuos. El factor iniciador de esta respuesta inflamatoria parece ser la pérdida de tolerancia inmune a proteínas de la pared bacteriana de cepas saprofitas presentes de manera normal en el intestino humano, que son procesadas y reconocidas como patógenas por las células de la mucosa intestinal con capacidad de presentación de antígenos (APC) y desencadenan una respuesta inmune presentando estos antígenos a los leucocitos. Aunque el proceso no se conoce en su totalidad, parece dominar una respuesta Th1, con predominio de TNF-alfa como mediador de la inflamación.

La importancia que se atribuye a la respuesta inmune en el desarrollo de la enfermedad ha aumentado en los últimos años. Desafortunadamente la enfermedad cursa por lo general en brotes, siendo una de sus complicaciones la aparición de trayectos fistulosos en todo lo largo del tracto digestivo y de una forma especialmente acusada a nivel perianal.

### **Clasificación de la enfermedad de Crohn**

A raíz del Working Party for the World Congresses of Gastroenterology que tuvo lugar en Viena en 1998 se estandarizó la clasificación de los diferentes tipos de enfermedad de Crohn. Dicho grupo diseñó de forma prospectiva un sencillo sistema de clasificación fenotípico, basado en variables objetivas y reproducibles que incluyen edad en el momento del diagnóstico,

localización anatómica y comportamiento biológico. Según la edad en el momento del diagnóstico podemos dividir a los pacientes entre menores a 40 años y mayores a dicha edad. En función de su localización podemos estadificar la enfermedad de Crohn en íleon terminal, cólica, ileocólica o aquella que afecta exclusivamente al tracto gastrointestinal alto. La enfermedad de Crohn perianal supone una entidad aparte (37).

### 1.2.2.1. LESIONES PERIANALES EN LA ENFERMEDAD DE CROHN

La patología perianal puede ser en ocasiones la primera manifestación de la enfermedad de Crohn, lo que puede dificultar el diagnóstico. La presencia de lesiones de repetición, ulceradas, o lesiones coexistentes de diferentes tipos pueden ponernos en alerta ante una posible enfermedad de Crohn perianal. (55)

<b>Lesión</b>	<b>Frecuencia</b>
Colgajos	30-40%
Fisuras	21-35%
Abscesos perianales	23-62%
Fístulas perianales	6-34%
Fístulas rectovaginales	5-10%
Estenosis anorrectales	5-10%
Úlceras cavitadas	2-12%
Hemorroides	2-7%
Carcinomas anales	0-1%

Tabla. 3.: Tipos de lesiones perianales (55)

Las lesiones perianales más frecuentes que podemos encontrar en pacientes con enfermedad de Crohn son las siguientes:

- Colgajos cutáneos: Con una incidencia del 30-40% suponen las lesiones perianales más frecuentemente encontradas en los pacientes con Enfermedad de Crohn consiste en el agrandamiento, congestión y desplazamiento hacia el exterior del revestimiento interno del canal anal. Su origen es un linfedema secundario a obstrucción linfática. Suelen ser reflejo de la actividad de la enfermedad, apareciendo en las fases agudas con ulceraciones y edema (55).
- Fisuras: La mayoría son indoloras y no están relacionadas con aumento de la presión esfinteriana. Pueden localizarse anterior o posteriormente, siendo más frecuente esta última localización (55)(124)(125).
- Úlceras cavitadas: Aparecen en pacientes con mal control de la enfermedad de base, especialmente en fases de mayor actividad. Suponen lesiones profundas, muy dolorosas (especialmente aquellas que penetran el esfínter anal) y destructivas, pudiendo llegar a destruir el esfínter (55)(124)(125).
- Abscesos y fístulas: Los abscesos perianales suponen la causa más frecuente de dolor perianal en los pacientes con enfermedad de Crohn, siendo la antesala a la aparición de una fístula perianal. Pueden ser de origen criptoglandular o secundarios a complicaciones derivadas de fisuras o úlceras cavitadas. Hughes postuló en 1978 que las fistulas perianales en esta enfermedad son secundarias a la aparición de una úlcera perianal (125). La enfermedad de Crohn supone la segunda causa de fistula rectovaginal tras la patología gineco-obstétrica. En general, la incidencia acumulada de fistula perianal en pacientes con Enfermedad de Crohn es del 50% a partir de los 20 años, de las cuales, un 9% suponen fistulas rectovaginales, aumentando su incidencia cuanto más distal es la afectación intestinal: entre el 14 y el 76% cuando sólo está afectado el intestino delgado y entre el 43 y el 94% cuando está afectado el colon. En un 20-30%

de los casos la clínica perianal supone la manifestación inicial de la enfermedad de Crohn. Aunque la mayoría de las fistulas son simples, existe una tendencia a desarrollar fistulas complejas: transesfinterianas altas, supraesfinterianas o extraesfinterianas. Con frecuencia existe un único orificio interno, asociado a múltiples trayectos fistulosos con orificios externos diversos, distanciados del margen anal (55)(65).

Globalmente la fistula rectovaginal supone menos del 10% de las fistulas perianales, siendo la más compleja en su manejo médico, quirúrgico y social. Los síntomas clínicos asociados más frecuentes son dispareunia, dolor perianal, irritación vaginal, cambios en el flujo vaginal e infecciones genitourinarias de repetición. La mayoría de estas fístulas son anovaginales, y en el 85% de los casos el orificio fistuloso se origina en la pared anterior del recto-ano.

Las fistulas suponen además una complicación frecuente de los pacientes con reservorio ileoanal, pudiendo aparecer hasta en el 60% de los pacientes portadores del mismo, siendo de manejo complicado con alta tasa de fracaso terapéutico.

- Estenosis: Secundaria a la fibrosis extramucosa tras abscesos de repetición, fístulas o úlceras cavitadas. Resulta interesante el hecho de que la estenosis rectal no está relacionada con el grado de afectación cólica de la enfermedad. La aparición de la sintomatología derivada de la misma (alteraciones en la defecación) no se produce hasta que el paciente no presenta una intensa fibrosis con desestructuración importante de la pared rectal y siempre debe descartarse la presencia de un carcinoma anal (125).
- Hemorroides: Escasa frecuencia y por lo general asintomáticas, por lo que conviene evitar el tratamiento quirúrgico de las mismas.
- Neoplasia anal: Se han descrito carcinomas epidermoides, de células basales y adenocarcinomas. Su origen es principalmente fistuloso, su

incidencia supone menos del 1% y el tratamiento sigue los principios oncológicos convencionales (55)(126).

Todas las lesiones anteriormente citadas pueden coexistir en el tiempo. Asimismo, pueden aparecer sobre un foco inflamatorio local o ser la traducción de un estado inflamatorio sistémico, dado que cualquier afectación perineal en la esta enfermedad puede verse asociada a una lesión del tracto digestivo subyacente. Además, no podemos olvidar que cualquier lesión proctológica banal (hemorroides, fisuras, desgarros obstétricos) pueden coexistir con lesiones perineales propias dificultando el diagnóstico y tratamiento de base (65)(125). Además, muchos pacientes pueden presentar afectaciones inflamatorias difusas (cutáneas, osteoarticulares, oculares,...) de mayor o menor gravedad que pueden modificar las prioridades terapéuticas.

## Clasificación de las fístulas perianales

Existen múltiples sistemas de clasificación de las fístulas perianales según diversos criterios. Las clasificaciones más sencillas emplean criterios puramente anatómicos, dividiéndolas en altas o bajas, en función de su relación con la línea dentada.

Una de las más empleadas es la clasificación de Parks, que emplea el esfínter anal externo como punto de referencia, describiendo cinco tipos de fístulas: interesfintérica, transesfinteriana, supraesfinteriana, extraesfinteriana y superficial.

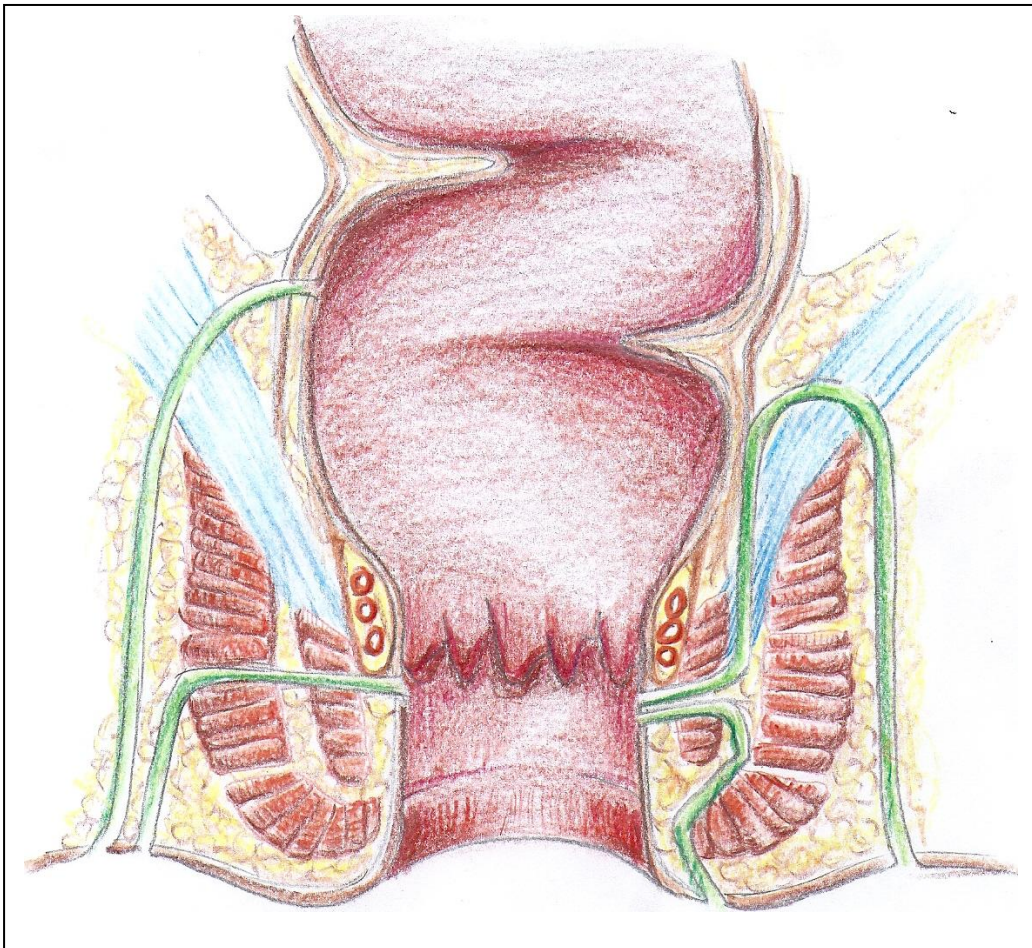


Fig.9.: Clasificación de Parks de las fístulas perianales (65)(127).

- A. La fístula superficial nace por debajo del esfínter anal externo e interno.
- B. La fistula interesfinteriana tiene un tracto entre el esfínter anal interno y el esfínter anal externo, en el espacio interesfinteriano.
- C. La transesfinterica tiene un tracto desde el espacio interesfinteriano a través del esfínter anal externo.
- D. La supraesfinteriana sale del espacio interesfinteriano atravesando el elevador del ano antes de salir a piel.
- E. La extraesfinteriana nace por encima del aparato esfinteriano, penetrando el elevador del ano, por fuera del esfínter anal externo.

Centrándonos más en las clasificaciones de las fístulas en la enfermedad de Crohn, encontramos la clasificación de Cardiff, inicialmente descrita por Hughes en 1978 (133) y modificada posteriormente en 1992, emplea la clasificación TNM, en la que cada manifestación de la enfermedad se gradúa entre 0-2 (0 ausente, 2 grave). La modificación del año 1992 añade una descripción de las condiciones asociadas, así como la localización intestinal de la enfermedad de Crohn (65).

Recientemente, la Asociación Americana de Gastroenterólogos ha realizado una revisión sistematizada de la enfermedad de Crohn perianal proponiendo una nueva clasificación que incluye las manifestaciones perianales. Los autores recomiendan la división de las fístulas en simples o complejas (65).

Un fístula simple por lo general es superficial, interesfinteriana o transesfinteriana baja, posee un solo orificio externo y no asocia la presencia de abscesos, ni está relacionada con estructuras adyacentes.

Por el contrario, una fistula compleja incluye una parte importante del esfínter anal (transesfinteriana alta, extraesfinteriana o supraesfinteriana),



posee varios orificios externos, posee un trayecto en herradura (atraviesa la línea media anterior o posteriormente), se asocia a absceso perianal y puede conectarse con estructuras adyacentes como vagina o vejiga. Dada la relevancia clínica, esta es la clasificación más frecuentemente empleada.

### 1.2.2.2. DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO

El diagnóstico de las lesiones perianales es principalmente clínico, siendo fundamental una correcta anamnesis y una exploración meticulosa. Dado que las manifestaciones perineales pueden suponer la primera sintomatología de la enfermedad de Crohn, debemos tenerla siempre en mente. Asimismo, una correcta anamnesis nos puede poner alerta sobre la coexistencia de manifestaciones digestivas o extraintestinales (37)(55).

La realización de una colonoscopia o rectoscopia es imprescindible, dado que permite describir lesiones asintomáticas así como informarnos de la presencia de enfermedad endoluminal activa. La afectación rectal condicionará el tratamiento de la enfermedad perianal, de igual modo que es importante conocer la extensión y actividad del resto del intestino, puesto que el primer paso del tratamiento de la Enfermedad de Crohn perianal consiste el control de la actividad inflamatoria a nivel sistémico (55)(128).

En ocasiones, una exploración bajo anestesia en quirófano puede tener una alta rentabilidad diagnóstica, dada la complejidad de estos pacientes, pudiendo aportar información sobre las características de las diferentes lesiones, además de permitirnos tratar algunos tipos de lesiones. Puede realizarse de forma conjunta a una ecoendoscopia intraoperatoria (37)(55)(74).

Las pruebas de imagen, como la Resonancia Magnética Nuclear pélvica resultan de gran utilidad, aunque a mayor complejidad de las lesiones, menor resulta su especificidad. Visualiza la presencia de abscesos pélvico y puede describir la existencia de trayectos fistulosos, así como aportarnos información



sobre el grado de actividad de la Enfermedad de Crohn y sobre la integridad del aparato esfinteriano. Recientemente Van Assche et al. ha propuesto una escala de puntuación en función de los hallazgos detectados en la Resonancia Magnética (Anexo 1) (16)(37)(56)(65)(74)(128).

La ecoendoscopia anal puede aportar información sobre la presencia de trayectos fistulosos, así como su complejidad y su relación con el aparato esfinteriano. Localiza el orificio interno de una fístula y ofrece datos indirectos de la enfermedad inflamatoria como son el engrosamiento de la pared del canal anal a expensas de la mucosa, submucosa y esfínter interno, o la pérdida de las capas de la pared. Puede proporcionarnos información acerca de la asimetría del esfínter anal en casos de incontinencia. El dolor o la presencia de estenosis pueden dificultar su realización, por lo que en ocasiones es precisa la realización de esta técnica bajo anestesia, o bien sustituirla en mujeres por una ecografía transvaginal (37)(55)(74).

### **Índices de actividad**

En la práctica, todas las técnicas de imagen deben complementarse y su uso se individualizará en cada paciente. Dada la variedad de las lesiones y su frecuente coexistencia, existen asimismo múltiples escalas e índices de actividad (55)(65).

- El índice más frecuentemente empleado es el Fistula Drainage Assessment Measure, que básicamente diferencia aquellas fístulas en abiertas (drenaje activo) y cerradas. Se considera una fistula abierta si en la exploración presenta emisión de material purulento o heces a la presión manual (Anexo 4)(65).
- Índice de CDAI (Crohn Disease Activity Index): Elaborado por el National Cooperative Crohn's Disease Study Group en Septiembre de 1975 a partir de 18 variables predictivas, y mediante una ecuación de regresión múltiple, simplificada en 8 variables, el CDAI es el instrumento medidor

de la actividad de Enfermedad de Crohn más frecuentemente utilizado (Anexo 2).

Para calcular en CDAI se debe multiplicar cada variable por el factor de corrección indicado a la derecha, y posteriormente las ocho variables son sumadas. Los valores oscilan entre 0 y 600, y según los mismos podemos clasificar a los pacientes de la siguiente forma:

- Valores inferiores a 150: Remisión de la enfermedad.
- Valores entre 151 y 220: Actividad leve.
- Valores entre 221 y 450: Actividad moderada.
- Valores superiores a 451: Actividad grave.

Está descrita una elevada asociación entre escores altos de CDAI y la impresión subjetiva de gravedad por parte del facultativo, lo que convierte el CDAI en el índice clínico más frecuentemente utilizado, habiendo sido rigurosamente desarrollado y validado, permitiéndonos describir la eficacia de los tratamientos tanto médicos como quirúrgicos. A pesar de todo, la necesidad de una correcta exploración y de una analítica pueden dar lugar a un manejo laborioso y su eficacia en la valoración de la enfermedad perianal es baja (65).

- Índice de PDAI (Perineal Disease Activity Index): Fue elaborado en 1995 por Irvine et al, con el fin de medir la severidad de la enfermedad de Crohn perianal, dado que las escalas convencionales no reflejaban dicha actividad. Consta de 5 variables, cada una de las cuales está graduada en 5 puntos, en función de la presencia de los síntomas y su severidad, de forma que un PDAI elevado implica una enfermedad perineal severa. Es un índice simple y de fácil manejo, capaz de detectar cambios importantes en el estado de actividad de la enfermedad. Además de las

lesiones valora la repercusión de éstas sobre la calidad de vida del paciente (Anexo 3).

Los valores oscilan entre 0 y 20, considerándose peor clínicamente aquellos pacientes con mayor puntuación. Podemos clasificarles de la siguiente forma:

- Puntuación de 0: Ausencia de síntomas.
  - Valores entre 1 y 6: Enfermedad de novo.
  - Valores entre 7 y 14: Enfermedad crónica.
  - Valores superiores a 15: Enfermedad recurrente.
- Escala de Wexner: Es una de las más utilizadas para valorar la gravedad de la incontinencia fecal. La incontinencia fecal se define como la pérdida involuntaria, continua o recurrente de materia fecal (>10ml) durante al menos un mes en una persona con una edad superior a los tres años. Puede aparecer en pacientes con enfermedad de Crohn de larga evolución a consecuencia de la afectación perianal o a consecuencia de los tratamientos aplicados. Su uso es importante con el fin de clasificar a los pacientes en función de la misma y de determinar la eficacia de los tratamientos aplicados. La escala de Wexner gradúa la incontinencia para heces sólidas, heces líquidas, gas, el uso de medidas de contención y el impacto en la calidad de vida, en una escala de 0 (nunca incontinencia) a 4 (siempre incontinencia), obteniéndose una puntuación entre 0 y 20. Una puntuación superior a 9 estima una pérdida importante de la calidad de vida (Anexo 6).
  - Medical outcome study short form-36 (SF 36) es una escala genérica que proporciona un perfil del estado de salud aplicable a los pacientes y a la población general. Contiene 36 items que cubren 8 dimensiones del estado de salud: Función física, rol físico, dolor corporal, salud general,

vitalidad, rol emocional y salud mental. El cuestionario permite el cálculo de dos puntuaciones sumario, el componente sumario físico (CSF) y el mental (CSM), mediante la combinación de las puntuaciones de cada dimensión. Este instrumento ha sido adaptado y validado para obtener una versión española definitiva, el cuestionario de salud SE-36 y se han publicado los valores de referencia en la población sana.

### **1.2.2.3. TRATAMIENTO DE LAS FISTULAS EN LA ENFERMEDAD DE CROHN PERIANAL**

El tratamiento de las fistulas perianales en pacientes con enfermedad de Crohn continua siendo controvertido y un auténtico reto, pudiendo oscilar entre la abstención quirúrgica hasta un tratamiento quirúrgico agresivo y radical. Actualmente las opciones terapéuticas se decidirán en función de la severidad de los síntomas, la localización anatómica, el número y complejidad de los trayectos fistulosos (55)(65)(123). En el momento actual no existe una cura para la enfermedad de Crohn, y los diferentes tratamientos están destinados a disminuir la sintomatología, tratar las complicaciones e intentar controlar la enfermedad a nivel sistémico (128).

#### **1.2.2.3.1 TRATAMIENTO MÉDICO DE LA ENFERMEDAD DE CROHN PERIANAL**

Existen múltiples opciones terapéuticas en la enfermedad de Crohn perianal, que globalmente podemos dividir en antibióticos, antiinflamatorios e inmunosupresores (128).

- Antibióticos: Metronidazol y Ciprofloxacino.
- Antiinflamatorios: Corticoesteroides.
- Inmunosupresores: Azatioprina, Ciclosporina, Tacrolimus, Infliximab, Adalidumab, Certolizumab, Natalizumab.

La mayor parte de estos tratamientos poseen un papel limitado en la enfermedad de Crohn fistulosa, especialmente en los casos de fistula rectovaginal. Su uso debe valorarse combinadamente con las diferentes opciones quirúrgicas, con el fin de optimizar los resultados y lograr un mejor control de la enfermedad de base, para evitar la sepsis perianal y lograr resultados positivos a largo plazo (65)(128).

La mayoría de los pacientes consigue la remisión clínica de la enfermedad de Crohn digestiva con los llamados fármacos de primera línea, entre los que se incluyen los antibióticos (57)(58)(59)(60)(61), los aminosalicilatos y los esteroides (62)(63).

Sin embargo, existen determinadas situaciones que requieren fármacos de segunda línea, como los inmunosupresores (64)(90-111). Estas situaciones engloban la refractariedad al tratamiento de primera línea, la corticodependencia o, lo que es lo mismo, la necesidad prácticamente continuada de esteroides para mantener la remisión (62)(63).

### **1.2.2.3.1.1 Antibióticos**

Son empleados con frecuencia en la enfermedad de Crohn perianal. Por lo general, los Gastroenterólogos emplean el Metronidazol con dosis de 750-1.000 mg/ día (57)(58) o Ciprofloxacino con dosis de 1.000-1.500 mg/día (60).

El primer trabajo que demostró la eficacia de estos agentes fue el de Ursing y Kamme (57), que describen el cierre de fístulas perianales con el uso de Metronidazol en tres pacientes. Posteriormente Bernstein et al (85) realiza un estudio abierto aleatorizado con Metronidazol (dosis de 20mg/ Kg de peso al día) en 21 pacientes consecutivos con fistulas perianales secundarias a enfermedad de Crohn. La tasa de cierre descrita fue del 83% (65). Posteriormente varios estudios abiertos aleatorizados apoyan el cese del débito fistuloso en el 34-50% de los pacientes con el uso de Metronidazol, con tasas de éxito del 34-50% (55)(57)(58)(60)(61).

Por lo general la mejoría clínica se observa a partir de las 6-8 semanas de tratamiento, pero en la mayor parte de los casos se vuelven a abrir una vez interrumpido el tratamiento antibiótico (65). Los efectos adversos más frecuentes derivados de su uso son sabor metálico, glositis, náuseas y neuropatía sensitiva distal (57)(58).

Debido a los múltiples efectos adversos derivados del uso de Metronidazol los Gastroenterólogos comenzaron a emplear el Ciprofloxacino en la década de los 1990 (65). A pesar de que es ampliamente empleado, su eficacia en el tratamiento de la enfermedad de Crohn fistulosa es anecdótica. Turner et al describe el tratamiento de 8 pacientes con enfermedad de Crohn activa y un paciente con fístula enterocutánea con dosis diarias de Ciprofloxacino de 1.000-1.500 mg /día durante 3-12 meses. A pesar de que todos los pacientes mejoraron con este tratamiento, cuatro de los ocho pacientes presentaron débito mantenido por la fístula y la mayoría precisaron manejo quirúrgico. Por tanto, al igual que con la Azatioprina, las fístulas que cierran con Ciprofloxacino, presentan una alta tasa de recurrencia al abandonar su uso. Los efectos adversos derivados de su uso son infrecuentes e incluyen cefalea, náuseas, diarrea y rash cutáneo (59)(60)(65).

Un estudio reciente, prospectivo abierto, que incluye 52 pacientes con fístulas perianales secundarias a enfermedad de Crohn, ha valorado el uso de antibióticos asociados a Azatioprina como un puente a la terapia inmunomoduladora. Se administró a los pacientes Metronidazol o Ciprofloxacino durante 8 semanas, comenzando posteriormente con Azatioprina 2-2,5 mg /Kg al día. Un tercio de los pacientes se encontraban previamente con dosis estables de Azatioprina en el momento de ser incluidos en el ensayo y posteriormente se añadió el tratamiento antibiótico. A largo plazo se encontró una respuesta superior en aquellos pacientes en los que se asoció el uso de antibióticos a la Azatioprina (61).

### 1.2.2.3.1.2. Antiinflamatorios

#### Corticoides

Los corticoides se han empleado ampliamente desde su introducción en los años 1940 en el tratamiento de los brotes de la enfermedad inflamatoria intestinal. Su eficacia, rapidez de acción y bajo coste justifican que, aún hoy que disponemos de nuevos fármacos, sigan siendo un tratamiento ampliamente utilizado (65)(123)(128). Su eficacia es debida a su efecto antiinflamatorio, pero han de utilizarse con cautela debido a su elevada toxicidad, que puede aparecer hasta en la mitad de los pacientes, así como por la corticodependencia y corticorretractariedad que desarrollan hasta un tercio de los pacientes tratados. Ya hace más de dos décadas que se generalizó el uso de nuevos corticoides con efectos predominantemente locales en el tratamiento de enfermedades crónicas como el asma, pero su eficacia a nivel tópico en la enfermedad inflamatoria intestinal no ha sido la esperada. Lo ideal sería disponer de un fármaco cuya liberación se produjese en el lugar a tratar, con una disolución óptima y una distribución adecuada en la mucosa y con escasa afectación sistémica (55)(62)(63).

Los corticoides convencionales se administran por vía oral (prednisona, prednisolona), intravenosa (metilprednisolona, hidrocortisona) o intrarrectal (hemisuccinato o acetato de prednisona). Con cualquiera de las vías de administración aparecen efectos adversos, por supresión del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal con disminución de los niveles de cortisol plasmático. La finalidad de los corticoides de liberación local es ejercer sus efectos antiinflamatorios sobre la zona afectada, minimizando al máximo los efectos sistémicos y con esta idea nace el Tixocortol o Fluticasona, dada su escasa absorción mucosa y su escasa acción sistémica dado el elevado metabolismo hepático. Sin embargo, hasta el momento, tan solo la budesonida ha superado las fases experimentales y los ensayos clínicos para poder ser utilizada de manera universal (62).

La eficacia de los corticoesteroides sistémicos en el tratamiento de mantenimiento de la enfermedad de Crohn nunca ha sido demostrada, aunque está claramente descrito su importante papel en los brotes agudos de la misma. El uso sistemático de los corticoides para el mantenimiento de la remisión en la enfermedad de Crohn no puede recomendarse a partir de la evidencia disponible (63).

Es importante tener en cuenta que los efectos secundarios derivados del uso sistémico de corticoesteroides son una de las principales causas de iatrogenia en los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. La toxicidad está en relación con la dosis administrada y la duración del tratamiento (63). Los efectos secundarios más frecuentes derivados del uso de corticoides son los siguientes:

- Osteoporosis, osteopenia, necrosis avascular.
- Infecciones.
- Cataratas.
- Alteraciones metabólicas: Hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, aumento de la síntesis hepática de lipoproteínas de muy baja densidad.
- Dermatológicas: Obesidad, hirsutismo y alopecia.
- Gastrointestinales: Pancreatitis, gastritis, hepatitis.
- Cardiovasculares: Dislipemia, arterioesclerosis así como hipertensión arterial.

Los corticoesteroides más empleados en la enfermedad de Crohn son los siguientes:

- Prednisona: En pacientes con enfermedad de Crohn, la principal evidencia disponible se basa en dos ensayos clínicos controlados, publicados en 1979 y 1984, por el National Cooperative Crohn Disease Study (NCCDS) y por el European Cooperative Crohn Disease Study (ECCDS) respectivamente, en los que se demostró una amplia remisión



frente a los pacientes tratados con placebo. Los pacientes incluidos en estos estudios presentaban enfermedad leve o moderada. No existen ensayos clínicos aleatorizados controlados con placebo en pacientes con enfermedad de Crohn grave. Respecto a las dosis, en estudios poblacionales, una dosis de 40-60 mg o de 1mg /kg de prednisona al día consigue una remisión de aproximadamente el 50%. Por lo general la duración del tratamiento está relacionada con la eficacia de respuesta al mismo.

- Budesonida: Los diferentes ensayos clínicos muestran que la administración oral de una dosis única de Budesonida de 9 mg una vez al día, posee similar eficacia a una dosis de 40mg al día de Prednisona, con tasas similares de remisión en brotes agudos de enfermedad de Crohn, pero con menor número de efectos secundarios, junto con un menor efecto sobre el cortisol plasmático. A pesar de todo, su eficacia es menor a la Prednisona en brotes severos (CDAI superior a 300), por lo que su uso se limita a brotes leves (CDAI menor a 150) o moderados (CDAI entre 150 y 300) (123).
- Beclometasona: La beclometasona se comercializa en forma de enemas y por vía oral. Para su uso por vía oral se libera con un pH menor a 6, a nivel por tanto de íleon terminal y colon. Posee una baja absorción y circula a nivel sistémico unido a la albúmina. Los estudios desarrollados hasta ahora no muestran una eficacia clara frente a placebo (123).
- Fluticasona: Por el momento este corticoide no está comercializado para su uso en enfermedad de Crohn y por ahora los estudios desarrollados muestran resultados desalentadores. Posee una baja biodisponibilidad (5-15%) y una pobre absorción a nivel del tracto intestinal, con una alta actividad intrínseca (123).

### 1.2.2.3.1.3 Inmunosupresores

#### Azatioprina y Mercaptopurina

Desde que se conoce que en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal está implicado el sistema inmunitario de la mucosa intestinal, se ha propuesto la utilización de fármacos inmunosupresores e inmunomoduladores. En la década de 1970 en el Hospital Mount Sinai de Nueva York Korelitz y Present describen algunos de los mecanismos inmunológicos implicados así como la terapia inmunomoduladora de esta enfermedad. En 1980 estos mismos autores comunicaron sus resultados del uso de 6-mercaptopurina en pacientes con enfermedad de Crohn. Posteriormente, en 1987 Alder y Korelitz demostraron su eficacia a largo plazo (61)(90)(91).

El tratamiento con Azatioprina o 6-mercaptopurina en la enfermedad perianal se indica tras el fracaso, la recidiva o la toxicidad del tratamiento antibiótico. Los pacientes mayores de 40 años con enfermedad perianal de corta evolución parecen ser los que mejor responden a este tratamiento (55).

Los diferentes autores emplean indistintamente la 6-mercaptopurina y su profármaco la azatioprina. Ambos son análogos purínicos que actúan inhibiendo la síntesis de ribonucleótidos purínicos y la proliferación celular. Son capaces de alterar la respuesta inmunitaria mediante la inhibición de las células Natural Killer y la supresión citotóxica de los linfocitos T.

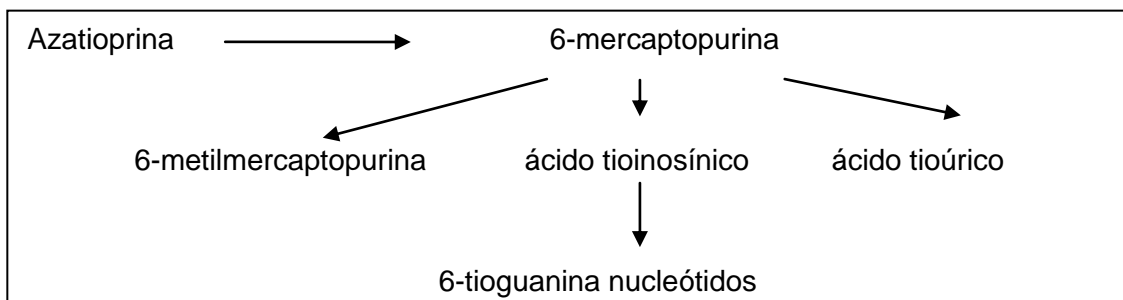


Tabla 4.: Metabolismo de la Azatioprina

Tras su absorción la Azatioprina se transforma rápidamente en 6-mercaptopurina por un mecanismo no enzimático y ésta, a su vez, en 6-tioguanina nucleótidos, que son los metabolitos activos. La vida media de estos metabolitos es larga y hacen falta semanas para lograr la concentración adecuada, hecho que contribuye a explicar la latencia de su respuesta clínica. Por otra parte, la 6-mercaptopurina, se transforma en dos metabolitos inactivos, 6-metilmercaptopurina y el ácido tiúrico, por dos vías enzimáticas diferentes. El tiempo medio de respuesta al tratamiento es de 3-6 meses, pasados 6 meses se puede abandonar o mantener de forma indefinida dependiendo de la respuesta obtenida. Los pacientes mayores de 40 años con enfermedad perianal de corta evolución y sin fístulas parecen ser los que mejor responden a este tratamiento (123).

Se desconoce el mecanismo exacto por el cual la 6-mercaptopurina disminuye la inflamación de la mucosa intestinal, pero está demostrada su eficacia en pacientes con enfermedad de Crohn en sus formas refractarias (90).

La dosis inicial empleada es de 50mg/ día, aumentando de forma progresiva según tolerancia y realizando controles analíticos periódicos.

Actualmente sus principales indicaciones son:

- Corticodependencia y corticorresistencia
- Enfermedad de Crohn perianal fistulizante
- Enfermedad de Crohn de localizaciones atípicas
- Mantenimiento de pacientes en remisión
- Enfermedad activa grave
- Prevención postcirugía

Los efectos adversos pueden clasificarse en alérgicos o idiosincráticos (poco frecuentes, de aparición a las dos o tres semanas de inicio del tratamiento) o no alérgicos (son más frecuentes y dosis dependientes, tardando

en aparecer meses o años). Por otro lado, hay dos efectos adversos que no debemos perder de vista que son la teratogenicidad y el mayor riesgo de desarrollar neoplasias (123).

Las causas más frecuentes de retirada actualmente son fracaso del tratamiento, alteraciones de la función hepática (transaminemia 5 veces el valor normal), deseo de embarazo, autoabandono, leucocitopenia grave, anemia grave, pancreatitis aguda e infecciones concomitantes.

Diversos estudios han demostrado su eficacia en el cierre de fístulas perianales, siendo la eficacia dosis dependiente.

### **Ciclosporina A**

No existen estudios controlados que evalúen la Ciclosporina en el tratamiento de la enfermedad de Crohn perianal. Los estudios controlados en enfermedad luminal, ofrecen una tasa de respuesta inicial en torno al 80% y una respuesta mantenida del 45-55%. (55)(92)(93)(94).

La Ciclosporina es un polipéptido cíclico formado por 11 aminoácidos de carácter hiofólico extraído del hongo *Tolupocladium inftum gams*. Se trata de un potente inhibidor relativamente selectivo del sistema inmunocompetente celular al actuar principalmente inhibiendo la producción de interleucina 2 (IL-2) y su receptor por los linfocitos T helper (65)(123).

El tratamiento debe iniciarse de forma intravenosa a dosis de 4mg/kg/día. Si existe respuesta puede pasarse a la administración oral, debiendo ajustar la dosis para alcanzar niveles séricos terapéuticos de 100-200ng/mL. Su pico máximo de absorción ocurre a las cuatro horas y presenta una biodisponibilidad variable que oscila entre 12-35%. La absorción depende del tiempo de contacto con la mucosa, de la integridad de ésta así como de la presencia de sales biliares. En la enfermedad de Crohn fistulizante y refractaria a otros tratamiento, la ciclosporina tiene una actuación eficaz y

rápida cuando se utiliza por vía intravenosa y a dosis altas. En la enfermedad de Crohn activa que no responde al tratamiento intravenoso esteroideo durante 7-10 días y a esteroides orales a dosis altas durante cuatro semanas, la Ciclosporina puede ser una alternativa eficaz (93)(94).

Los pacientes que reciben Ciclosporina deben ser monitorizados para evaluar las concentraciones en sangre, de forma diaria si el tratamiento es intravenoso y semanal si el tratamiento es por vía oral. Las concentraciones en sangre se sitúan entre 250 y 350 ng/ml para conseguir una buena respuesta terapéutica (123).

La mejoría clínica suele presentarse de forma rápida, habitualmente en la primera semana. Las recaídas son frecuentes si se interrumpe el tratamiento. La hipertensión y la nefrotoxicidad son los efectos secundarios principales, siendo otros menos frecuentes las parestesias, cefalea, temblor, gingivitis, hepatotoxicidad, y el aumento de la tasa de infecciones, especialmente si la empleamos en combinación con otros inmunosupresores (55).

### **Tacrolimus**

El mecanismo de acción del Tacrolimus (FK-506) es similar al de la Ciclosporina, con la diferencia de que el Tacrolimus tiene la ventaja de poseer una mejor absorción mucosa, con lo que puede emplearse por vía oral sin problemas en pacientes con afectación mucosa del tracto digestivo (65)(95).

Tacrolimus es un macrólido derivado del *Streptomyces tsukubaensis*. Sus propiedades inmunomoduladoras derivan de su acción sobre los linfocitos T y la expresión de citocinas alterando la expresión de la proteína intracelular FKBP (FK binding protein). A través de una complicada secuencia bloquea la acción de la fosfatasa calcineurina, que da lugar a una supresión de la transcripción genética de citocinas, especialmente IL 3, IL 4 y TNF. Esto da

lugar a una supresión de los linfocitos T e indirectamente altera la función de los linfocitos B (123).

Tacrolimus ha sido ampliamente utilizado en el trasplante de órganos sólidos e incidentalmente se ha demostrado su eficacia en la colangitis esclerosante primaria, y en el pioderma gangrenoso.

Actualmente se están publicando diversos estudios en la enfermedad de Crohn fistulizante, con importante disminución del débito fistuloso y mejoría de la clínica de la fístula. Estos efectos están descritos con dosis de 0.1 mg/ kg/ día durante un periodo de 4 semanas. La dosis de mantenimiento así como la duración del tratamiento influyen en la respuesta terapéutica. Su eficacia fue inicialmente demostrada en un ensayo clínico multicéntrico (95) en el que 48 pacientes fueron aleatorizados para recibir placebo o Tacrolimus por vía oral en dosis de 0.2mg/ Kg/ día durante 10 semanas. Aunque la mejoría fue significativamente mayor en el grupo de Tacrolimus (43% en pacientes con Tacrolimus frente al 8% en aquellos con placebo), no hubo diferencias en la curación completa, definida esta como el cierre de todos los orificios fistulosos durante al menos 4 semanas (55)(65)(95).

Los efectos adversos son infrecuentes, siendo ésta una droga bien tolerada por la mayor parte de los pacientes. Los efectos adversos más frecuentes son nefrotoxicidad, neurotoxicidad, cambios cutáneos e intolerancia a la glucosa (95).

### **Infliximab (Remicade)**

El Infliximab es el primer anticuerpo monoclonal aprobado para ser empleado en el tratamiento de la enfermedad de Crohn. Es un anticuerpo monoclonal quimérico (humano 75%- murino 25%) dirigido de forma específica a los receptores celulares del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) así como

al TNF-  $\alpha$  circulante, una citocina de respuesta tipo TH-1, que posee una intensa acción pro-inflamatoria (64)(96).

La aparición del Infliximab en el arsenal terapéutico ha supuesto una revolución, como un tercer escalón terapéutico para el control de la enfermedad de Crohn, ya que consigue disminuir por un lado la actividad inflamatoria intestinal de forma rápida y eficaz y por otro lado, supone en este momento el tratamiento médico más eficaz en el cierre de las fístulas en pacientes con enfermedad de Crohn fistulosa, y a diferencia del resto de tratamientos farmacológicos, consiguiéndolo de forma más persistente en un amplio número de pacientes (96-111).

El primer ensayo clínico controlado con Infliximab fue publicado por Targan et al en 1997, en pacientes con brote moderado-severo de enfermedad de Crohn y su uso fue aprobado por la FDA en 1998. Su uso está contraindicado de forma relativa en pacientes con estenosis fibrosa y de forma absoluta en pacientes con infección extraintestinal presente ya sea vírica, bacteriana o fúngica.

En el tratamiento de la enfermedad de Crohn fistulosa se administra de forma intravenosa en dosis de 5mg/kg en las semanas de inicio, a la 2ª y la 6ª. Los resultados iniciales suelen ser excelentes, con tasas de cierre cercanas al 60%, pero la recurrencia a las 8-12 semanas de finalizar el tratamiento es alta, por lo que actualmente se propone la administración de dosis de recuerdo cada 8 semanas (96)(104).

Respecto a su mecanismo de acción, el Infliximab bloquea de forma selectiva tanto el TNF circulante (TNF-s) como aquel que se encuentra ligado a la membrana celular (TNF-m), siendo capaz de inducir, mediante la activación de las caspasas, la apoptosis de los monocitos presentes en sangre periférica. Asimismo, provoca la apoptosis de los linfocitos CD 4+ de la lámina propia intestinal, lo que le convierte en el anticuerpo monoclonal estrella en la

enfermedad de Crohn, frente a otros que no presentan éste efecto, como el Ertanercept (123).

En general, en la enfermedad perianal, se indica el tratamiento con Infliximab en los pacientes que no responden al tratamiento con antibióticos ni con inmunosupresores (55). No obstante, posee una alta recurrencia tras el cese del tratamiento (103).

Existe una tasa de pacientes no respondedores al tratamiento, situada entre el 20 y 30%, por mecanismos no del todo conocidos. Se sospecha que el efecto del Infliximab es superior en aquellos pacientes que presentan una importante actividad inflamatoria, directamente relacionada con elevación de la proteína C reactiva (96)(104)(105)(123).

Respecto a los efectos secundarios, éstos pueden aparecer de forma precoz o tardía, siendo variables, desde enrojecimiento facial hasta reacciones anafilácticas. Los más frecuentes son enrojecimiento facial, dolor o hinchazón articular (especialmente tras su uso a largo plazo), que por lo general remiten tras la administración de antiinflamatorios (96). Existen asimismo descritos casos de aparición de anticuerpos anti-Infliximab así como casos de aparición de Lupus tras la administración (65).

Conviene dedicar una especial atención a la relación entre el uso de Infliximab y la reactivación de la tuberculosis latente así como de otras infecciones. Por lo general dicha reactivación se produce en afectaciones extraintestinales y apareciendo generalmente a las 12 semanas de tratamiento, siendo una reactivación de una enfermedad tuberculosa preexistente por lo que conviene descartar su infección previamente al inicio del tratamiento (98)(99)(100)(101)(102).

En cuanto a la aparición de neoplasias, especialmente leucemias y linfomas, se desconoce la relación que pueda existir en pacientes con



administración de Infliximab a largo plazo, dado sus efectos inmunosupresores, aunque no parece estar relacionado con un aumento en su incidencia (96).

Por el momento podemos concluir que los datos existentes afirman que se trata de un fármaco seguro y eficaz, con buenos resultados en el cierre de fístulas en pacientes con enfermedad de Crohn, aunque posee una alta tasa de recidiva tras la interrupción del mismo (96)(97)(103)(104)(105).

### **Adalimumab (Humira)**

El Adalimumab, conocido como Humira en nuestro medio, posee un mecanismo de acción similar al Infliximab, al bloquear los TNF en pacientes con enfermedad de Crohn moderada o grave. Reduce de forma significativa la sintomatología derivada de dicha enfermedad, aunque, al igual que el Infliximab, posee alto riesgo de infecciones, incluyendo reactivación de tuberculosis latente o infecciones fúngicas oportunistas. Los efectos secundarios más frecuentes son la irritación cutánea en el punto de aplicación, náusea, rinitis o infecciones respiratorias (128).

### **Certolizumab pegol (Cimzia)**

Recientemente aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en el tratamiento de la enfermedad de Crohn moderada o grave, el Certolizumab puede ser utilizado como el Infliximab y el Adalidumab, o bien cuando estos últimos pierden eficacia. También produce alteraciones en el sistema inmune con los consiguientes efectos secundarios (128).

### **Natalizumab (Tysabril)**

Su mecanismo de acción deriva de la inhibición de las integrinas localizadas en la pared intestinal, produciendo una inhibición de la inflamación local. Se ha propuesto su uso en pacientes con enfermedad de Crohn grave no respondedores a otros tratamientos. Puede dar lugar (si bien con escasa

frecuencia, pero de importante gravedad) a la aparición de leucoencefalopatía que conduce a incapacidad grave o muerte (128).

### **1.2.2.3.2. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA ENFERMEDAD DE CROHN FISTULIZANTE**

Dado que la Enfermedad de Crohn supone un trastorno crónico y recidivante, hasta el 80% de los pacientes precisarán cirugía en algún momento de su vida, a pesar de los importantes avances médicos de los últimos años, siendo muy frecuente la cirugía perineal en estos pacientes. Por supuesto el tratamiento quirúrgico debe estar siempre acompañado de la correspondiente y adecuada terapia médica, excepto en aquellos casos que precisen de una cirugía de urgencia. El control médico de los pacientes con Crohn es fundamental para la obtención de mejores resultados terapéuticos, de hecho, la presencia de proctitis activa en el momento de la cirugía es un indicador de mal pronóstico en el tratamiento de la enfermedad fistulosa, condicionando altas tasas de recidiva (55)(65)(128).

Los objetivos del tratamiento quirúrgico de la enfermedad de Crohn fistulizante perianal son el cierre de la fístula a corto y largo plazo, reducir el número de infecciones y procesos sépticos de origen perianal, evitar el daño esfinteriano y la consiguiente incontinencia y realizar el mínimo indispensable número de cirugías. Por lo general la fistulotomía no suele estar indicada, puesto que en su mayor parte se trata de trayectos fistulosos complejos, altos y ramificados. Existen multitud de técnicas descritas, si bien ninguna ha demostrado una clara superioridad (20)(32)(33)(34)(30)(31)(35)(36)(38-50)(54)(65)(66).

#### **Principios generales de la cirugía en pacientes con Enfermedad de Crohn**

Previa a cualquier intervención es fundamental una correcta planificación preoperatoria, con un estudio completo del paciente con el fin de valorar correctamente el mejor momento de la misma, así como la técnica que debemos aplicar (55)(65).

Exceptuando los casos de cirugía urgente deben tenerse en cuenta dos factores preoperatorios. El primero es retirar el tratamiento corticoideo cuando su dosis supera los 20mg/día de Cortisona, dado que su uso altera la cicatrización postoperatoria, aumentando el riesgo de aparición de fístulas. Respecto al tratamiento antibiótico o el uso de biológicos no existe evidencia de que alteren los resultados postoperatorios (104).

El segundo factor preoperatorio a tener en cuenta es la correcta nutrición del paciente. Muchos de los pacientes de larga evolución poseen alteraciones malabsortivas, que junto con la terapia médica de forma continuada puede dar lugar a alteraciones metabólicas e hipoalbuminemia. Las concentraciones de albúmina inferiores a 30 g/l se relacionan con un mayor índice de complicaciones postoperatorias, especialmente con la formación de fístulas post-anastomóticas. Se pueden administrar complementos nutricionales las dos o tres semanas previas a la cirugía, aunque su uso no ha demostrado disminuir las complicaciones, por lo que su uso debe ser individualizado (55)(65)(104)(123).

Cualquier cirujano que opere un paciente con enfermedad de Crohn debe considerar el carácter crónico de la misma, por lo que cualquier cirugía debe ser lo más conservadora posible con el fin de evitar causar más daño. Las resecciones y exéresis de tejidos deben ser mínimas, limitándose a las lesiones responsables de los síntomas (55)(65).

### **Elección del tratamiento quirúrgico**

La variedad de las lesiones perianal y su coexistencia, la diferente tasa de respuesta a los tratamientos y la afectación concomitante de intestino delgado, grueso, colon y recto, hace que resulte extremadamente difícil el establecer unos principios quirúrgicos aplicables de forma sistémica, por lo que por lo general deberemos individualizar el tratamiento, estableciendo en cada

paciente el momento ideal de la cirugía y la mejor técnica a realizar. El rango de opciones quirúrgicas varía y podemos clasificarlo de la siguiente forma (55):

1. Tratamiento quirúrgico urgente de la sepsis perianal.
  2. Tratamiento quirúrgico puente para el control de daños.
  3. Tratamiento quirúrgico definitivo.
- 
1. Tratamiento quirúrgico urgente de la sepsis perianal: El procedimiento quirúrgico más urgente es la incisión y drenaje de abscesos para controlar la sepsis perianal que puede complicarse con infecciones necrotizantes que podrían destruir el aparato esfinteriano y las estructuras adyacentes, dado lugar en ocasiones a un compromiso vital. En ocasiones el diagnóstico no es sencillo, pudiendo resultar de ayuda la realización de una ecografía endoanal o una resonancia magnética pélvica.

Durante la exploración bajo anestesia o la incisión y drenaje puede descubrirse una fístula perianal, pudiendo identificarse el orificio interno. En ese caso, y con más motivo si se trata de una fístula compleja, está indicada la colocación de un sedal o setón a lo largo del trayecto, que además de permitir un correcto drenaje del absceso y evitará la formación de nuevas colecciones. De esta forma, si posteriormente se decide el tratamiento definitivo del trayecto, el sedal nos ayudará a su correcta identificación y asimismo, mantiene permeable el trayecto fistuloso impidiendo la formación de nuevos abscesos. No siempre es posible identificar el orificio interno durante el drenaje de un absceso, por lo que el intentar tutorizar el trayecto puede en ocasiones dar lugar a una iatrogenia con la creación de nuevos trayectos. Por tanto, debemos realizar siempre maniobras suaves y cuidadosas.

Es recomendable asociar tratamiento antibiótico, especialmente en aquellos pacientes con medicación inmunosupresora o corticoides. La presencia de proctitis activa o abscesos múltiples y profundos puede en ocasiones condicionar una mala evolución, por lo que en ocasiones de sepsis importante deberemos plantearnos la realización de una ileostomía o colostomía derivativa de forma temporal, con el fin de control de la sepsis (51)(52)(53).

2. Tratamiento quirúrgico puente para el control de daños: Posterior al drenaje de abscesos perianales pueden quedar establecidos trayectos fistulosos, algunos de los cuales estaban ya presentes en el momento del drenaje. Un escaso número de estos trayectos puede responder, como ya hemos hablado, al tratamiento médico, pero en una parte importante de los mismos deberemos plantear la intervención quirúrgica. Previa a la misma podemos colocar setones o sedales laxos en el trayecto fistuloso, con el fin de mantener el drenaje de la fístula y que ésta no cierre en falso dando lugar a nuevos abscesos perianales. Existe controversia respecto al tiempo que debemos mantenerlos, dado que tras su retirada en un número importante de casos puede recaer la fístula o formarse nuevas colecciones. Por ello, en ocasiones se aconseja el mantenerlos de forma prolongada hasta la cirugía definitiva o incluso de forma indefinida (55).

Otro tratamiento puente en el control de la enfermedad rectal y perianal son los estomas derivativos. Debemos valorar el emplearlos en aquellos casos en los que esté presente una proctitis activa incontrolable, con mal control de la enfermedad de Crohn, recidiva y empeoramiento de los procesos perianales y en aquellos casos de sepsis de origen perianal que pongan en peligro la vida del paciente. La derivación fecal puede dar lugar al cierre de trayectos fistulosos, si bien la mayoría suelen recaer tras el restablecimiento del tránsito intestinal (51)(52)(53).

3. Tratamiento quirúrgico definitivo: No existen un tratamiento ideal aplicable en todas las situaciones y que garantice resultados óptimos. Debemos individualizar el tratamiento para cada paciente, en función del tipo de lesión y su localización así como del grado de actividad de la enfermedad. Para lesiones simples sin afectación esfinteriana, podemos realizar fistulotomía (abriendo toda la longitud del trayecto) fistulectomía o legrado del trayecto, pero en fistulas más complejas debemos plantear el mejor tratamiento preservando siempre la continencia anal. Conviene lograr un buen control de la enfermedad de Crohn con el arsenal médico de que disponemos mediante un tratamiento conjunto con el equipo de Gastroenterología, con el fin de mantener inactiva la proctitis que poseen estos pacientes.

Técnica	Estudio	Pacientes	Curación	Recidiva
Fistulotomía en fistulas perianales bajas	Marks y col	32	78%	---
	Hobbiss y col	20	90%	22%
	Levien y col	43	63%	41%
	Fuhrman y col	19	95%	---
	Morrison y col	17	94%	13%
	Williams y col	41	93%	---
	Winter y col	26	85%	14%
	Scott y col	26	27%	---
	McKee y col	34	62%	18%
	Scott y col	27	81%	---
	Platell y col	44	91%	5%
	Michelassl y col	33	82%	---
Sedal laxo en fistulas perianales complejas	Williams y col	23	13%	0
	Pearl y col	21	100%	0

	Sugita y col	21	38%	0
	Sctot y col	27	85%	15%
	Sangwan y col	24	92%	63%
	Faucheron y col	41	27%	---
Colgajo de avance transanal en fistulas perianales complejas	Makowlec y col	20	80%	20%
	Joo y col	26	73%	27%
	Robertson y col	6	50%	50%

Tabla 5.: Resultados de las diferentes técnicas empleadas en pacientes con enfermedad de Crohn y fistula perianal (55)

Para las fistulas rectovaginales en pacientes con enfermedad de Crohn no existe una técnica “gold standart” en este momento, y las tasas de curación a largo plazo, según las diferentes series, suelen ser bastante decepcionante. En aquellos casos de fístulas rectovaginales bajas sin afectación esfinteriana, puede intentarse la realización de una fistulotomía, aunque en ocasiones esto da lugar a la formación de heridas de cicatrización tórpida, con evolución poco satisfactoria. Para fistulas más alta o complejas tendremos que valorar la realización de un colgajo de avance rectal o vaginal, de espesor completo, base ancha y vascularización preservada. Los colgajos deben realizarse exclusivamente en aquellos casos sin afectación rectal, puesto que suelen fracasar en pacientes con proctitis activa (28)(29)(54)(55)(65)(91)(124)(125).

En fistulas recidivadas podemos realizar interposición de tejidos, como hemos explicado previamente en el capítulo 1.2.1.7. (Tratamiento de las fístulas rectovaginales) (20)(38)(39)(40)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48)(49) (50). Asimismo, existen casos descritos en la literatura del empleo de laser y el cierre con adhesivos de fibrina a lo largo del trayecto(28)(29)(32)(33), así como colocación de conos o mallas, cuyo uso no está especialmente extendido (34).



## 1. INTRODUCCIÓN

---

Autores	Pacientes/ Reparación	Procedimiento	Curación (%) inicial/final	Recurrencia (%)
Joo et al 1998	20	Flap rectal	-/75	
Windsor et al 2000	13/21	Cierre simple	40/77	54
Athanasiadis et al 2007	37/56	Varios	51/73	
	-/20	Abordaje transanal	70	
	-/15	Cierre simple	73	
	-/14	Flap anocutáneo	86	
	-/7	Flap de avance	29	30
Ruffolo et al 2009	52/71	Varios	56/81	
	-/36	Flap rectal	56	
	-/23	Flap vaginal	57	10

Tabla 6.: Resultados de las diferentes técnicas empleadas en fistula rectovaginal secundaria a enfermedad de Crohn (54)

### **1.2.3. TERAPIA CELULAR CON CÉLULAS MADRE. MEDICINA REGENERATIVA**

En los últimos años ha surgido una nueva rama en la medicina y en la investigación denominada medicina regenerativa, basada en la aplicación de las células madre y su capacidad para diferenciarse en células adultas de los diferentes tejidos. Si bien actualmente esta rama de investigación se encuentra en pleno desarrollo, los avances obtenidos por el momento son mayores de lo esperado. Hasta hace poco se pensaba que las únicas células adultas con capacidad regenerativa y aplicabilidad clínica eran aquellas derivadas de células madre hematopoyética, sin embargo, recientes estudios han demostrado que este campo de aplicación es mucho mayor de lo esperado (67)(68)(69).

La terapia celular es el método que trata de curar enfermedades mediante el implante de células vivas. La medicina reparadora busca reparar un defecto tisular empleando un tejido (ej derivado de las células madre) que puede ser diferente al originario y actualmente se emplean en el tratamiento de múltiples enfermedades degenerativas.

Una célula madre o célula troncal es aquella que cumple las siguientes propiedades diferenciándola del resto: Capacidad de autorregeneración (es decir, dividirse y producir células idénticas a la original ) de forma indefinida; capacidad de, bajo determinadas condiciones fisiológicas y experimentales, para originar células que pueden dar lugar a diferentes líneas de células especializadas (características de un determinado órgano: hepatocito, miocito, neurona...); puede realizar divisiones simétricas o asimétricas, en las que generan una réplica exacta de sí mismas y otra célula predeterminada para diferenciarse. Algunos autores con Verfaillie (Verfaillie et al, 2002) consideran que aún debe cumplir una cuarta condición: producción in vivo de tejidos funcionales. Según su organismo de origen podemos diferenciarlas en adultas y embrionarias (67).

Los mecanismos de renovación, reparación y regeneración que posee el organismo son limitados, dependiendo en gran medida del grado e intensidad de la destrucción tisular acaecida.

En 1962 Gurdon descubrió en la Universidad de Cambridge tras experimentos realizados con ranas, que la especialización de las células maduras no tienen por qué quedar confinadas siempre a su estado especializado, lo que le valió el Premio Nobel de Medicina en el año 2012. Sus experimentos fueron claves en la clonación de la oveja Dolly y otros mamíferos posteriormente. En sus experimentos, extrajo el núcleo de un óvulo de rana sustituyéndolo por el núcleo de una célula intestinal, también de rana. Gourdon observó que a partir de éste óvulo se desarrolló un renacuajo completamente normal (116)(117).

En 1964 Rodbell *et al* describen el proceso de aislamiento de células madre, siendo posteriormente perfeccionador por diferentes grupos de investigación. En 1981 Evans y Kaufman publicaron el cultivo de células madre embrionarias en ratón. Posteriormente, en 1998 se logró el cultivo por parte de Thompson *et al*, de células madre de origen humano, demostrando que éstas eran capaces de dividirse de manera ilimitada, dando lugar a una producción que podía originar los diferentes tipos celulares del organismo, pudiendo por tanto emplearse en tejidos y órganos dañados, con efectos reparadores.

En 1976 Friedenstein describe en la médula ósea células estromales con capacidad clonogénica. Posteriormente se describió una población de células con capacidad proliferativa y de diferenciación a varios linajes celulares. Estas células se denominaron células madre mesenquimales, mesenquimatosas o mesenquimáticas (MSC). Por su procedencia de la médula ósea también han sido denominadas células estromales. Friedenstein las describe como células con capacidad de adherirse al plástico, capaces de ser cultivadas durante tiempo indefinido sin modificar su fenotipo y que se podían dar lugar a células óseas, cartílago, músculo, tendón, grasa y estroma medulas.



Fig. 10.: Dr. Friedenstein



Dr. Gimble

Las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo fueron descritas por Gimble en el año 2000, quien describe la capacidad de diferenciación *in vitro* de éstas células a tejidos.

En 2001 un grupo liderado por el Dr. Hedrick describió una población multipotencial de células homogéneas con aspecto fibroblástico, obtenidas a partir de la fracción vasculo-estromal del tejido adiposo y con capacidad de diferenciarse a osteocitos, condrocitos y adipocitos. Éstas células fueron llamadas PLA (Processed Lipoaspirated cells) y poseen capacidad de autorrenovación, siendo su fenotipo muy similar a las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. A partir de este momento surge una auténtica avalancha de publicaciones y trabajos que describen la obtención, tratamiento y posibles usos terapéuticos de las células madre adultas en el uso de diferentes patologías.

En el año 2004, el Congreso Internacional del IFATS (International Federation for Adipose Therapeutic and Science) decidió unificar las diferentes nomenclaturas a ASC (Adipose-Derived Stem Cells), acotando sus características (88).

En el año 2012 el Dr Shinya Yamanaka recibió el premio nobel por su trabajo y dedicación que le llevaron a descubrir como transformar células madre adultas en células capaces de dar lugar a cualquier linaje celular (115)(118). El Dr. Yamanaka, de la Universidad de Kioto, sentó las bases de las investigaciones actuales al demostrar en 2006 que se pueden obtener células madre multipotenciales a partir de células adultas. En una investigación que revolucionó el campo de la medicina regenerativa, el Dr. Yamanaka descubrió que cuatro genes son suficientes para transformar células madre adultas en células madre como las del embrión, a las que denominó células madre pluripotentes inducidas iPS. Añadiendo estos cuatro genes en células madre adultas de la piel de ratón podía obtener células similares a las células madre embrionarias. Publicó sus trabajos en ratón en el año 2006, anunciando en 2007 sus trabajos en humanos. En sus últimas publicaciones describe la diferenciación de células iPS a células epiteliales corneales (115)(118).

### **1.2.3.1. CÉLULAS MADRE ADULTAS Y EMBRIONARIAS**

Las células madre embrionarias son aquellas derivadas de la masa celular interna del blastocisto. Constituyen una fuente de progenitores de células de las tres capas embrionarias: endodermo, ectodermo y mesodermo (células pluripotentes). Las células madre adultas o somáticas son aquellas específicas de cada órgano y poseen la capacidad de autorrenovación y diferenciación en diferentes tipos celulares dando permitiendo la regeneración tisular en mayor o menor medida, así como una correcta cicatrización. Actualmente se ha descrito la presencia de dichas células en prácticamente todos los tejidos y órganos, incluso aquellos que se consideraban quiescentes, incluyendo médula ósea, sangre periférica, piel, grasa subcutánea, córnea, retina, hígado, páncreas, tejido gastrointestinal, pulmón, pulpa dentaria, tejido musculoesquelético y tejido conjuntivo (67)(88).

Existen por tanto en prácticamente todos los tejidos del cuerpo humano y muchas de ellas se han podido analizar y diferenciar, logrando en algunas su cultivo in vitro. Inicialmente, se consideraba que las células madre adultas estaban predeterminadas para generar exclusivamente el tipo celular del cual provenían, pero posteriormente se comprobó que dichas células tienen capacidad de regeneración y transdiferenciación al menos in vitro, pudiendo dar lugar en algunos casos a múltiples líneas celulares de cualquiera de las tres capas embrionarias y en algunos casos incluso in vivo. Un ejemplo prototípico de las células madre adultas con capacidad para originar células de las tres capas embrionarias son las MAPCs aisladas y caracterizadas en médula ósea y otras fuentes (67)(116)(129).

Actualmente existen cinco fuentes principales de células madre que se están empleando en modelos de terapia celular humano: El cordón umbilical, la sangre periférica, la médula ósea, el tejido musculoesquelético y la grasa subcutánea (67). Recientemente se está trabajando con células madre derivadas de la piel. Dichas investigaciones, lideradas por el Dr. Yamanaka se encuentran por el momento en fase experimental, y por ahora no tienen aplicabilidad clínica (115)(118).

El uso de células madre aisladas de cordón umbilical está siendo empleado en la práctica clínica actual, presentando las siguientes ventajas:

- Obtención ética y sencilla
- El donante no se ve afectado por su obtención
- Escasa posibilidad de transmisión de enfermedades infectocontagiosa
- Pocas posibilidades de dar lugar a una enfermedad injerto contra huésped

Su uso clínico por el momento es reducido y controlado por la legislación vigente, empleándose en el momento actual esencialmente en enfermedades hematológicas.

Respecto al uso de células madre derivadas de sangre periférica cabe destacar su fácil obtención, dado que pueden ser aisladas mediante plasmaféresis de una muestra de sangre periférica, lo que ha popularizado su uso desde la década de 1980, desarrollando de manera precoz el injerto de neutrófilos y plaquetas, minimizando el riesgo de infección o hemorragia (67).

La capacidad de diferenciación de las células madre procedentes del estroma de médula ósea hacia líneas celulares no hematopoyéticas ha sido ampliamente documentada, no solo in vitro, sino también in vivo. Asimismo cabe resaltar su capacidad de migración hacia los tejidos dañados e inflamados favoreciendo su cicatrización, mediante la acción de diferentes citocinas. El principal inconveniente de las mismas es su obtención, dado que precisa de una punción de médula ósea (67).

Respecto al uso de aquellas células madre derivadas de músculo cabe resaltar que esta vía aún se encuentra en fase de experimentación, si bien es conocida la gran capacidad de regeneración que posee este tejido, postulándose la implicación de precursores musculares en la miogénesis que se produce tras la destrucción tisular.

Respecto a las células madre derivadas de tejido adiposo, más adelante nos centraremos en su obtención y sus características, dado que son las empleadas en nuestra línea de investigación. Conviene resaltar que en el año 2004, el Congreso Internacional del IFATS (International Federation for Adipose Therapeutic and Science) decidió unificar las diferentes nomenclaturas a ASC (Adipose-Derived Stem Cells), describiéndose las siguientes características definitorias (88)(129):

- Morfología fusiforme que se aísla mediante digestión enzimática y capacidad de adhesión a plásticos.

- Capacidad de autorrenovación de forma indefinida, es decir, al dividirse una célula, al menos una de las células resultantes debe ser idéntica a la progenitora.
- Multipotenciales: Capacidad de diferenciación a tejidos diversos (osteoblastos, condroblastos, adipoblastos y mioblastos)
- Marcaje positivo para CD29, CD44, CD90, CD106.
- Marcaje negativo para CD34, CD45 Y CD133.

### **1.2.3.2. OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO**

Las células madre estromales obtenidas a partir de tejido adiposo son muy similares a aquellas obtenidas a partir de médula ósea, con las ventajas que aporta la fuente frente a la médula ósea. Se ha descrito la posible evolución de esta línea celular hacia líneas osteogénicas, miogénicas, condrogénicas e incluso células con características neuronales. Estas células muestran características similares a las derivadas de médula ósea desde el punto de vista inmunológico (CD29, CD44, CD71, CD13, CD105, SH-3 Y STRO-1), poseyendo por otro lado, ciertos marcadores específicos (CD49d, CD106, CD54, CD34). Respecto a las características de adherencia estromal, crecimiento y capacidad de diferenciación, resulta muy similar a la de las células procedentes de médula ósea (88)(129).

La gran ventaja del tejido adiposo es su disponibilidad y abundancia, por lo que basta la aplicación de un anestésico local (y raramente regional o sistémico) y la realización de una mínima liposucción que nos permite obtener una gran cantidad de tejido adiposo, con una mayor cuantía de células y menor morbilidad frente a las derivadas de médula ósea. Tras su procesado en un laboratorio, que resulta más sencillo y rentable frente a otras fuentes, la



muestra obtenida puede emplearse en el acto o ser criopreservada para su uso posterior. Esta fuente celular posee las siguientes ventajas:

- Es segura y fácil de obtener.
- Éticamente aceptada.
- Menor morbimortalidad que la obtención de células a partir de médula ósea.
- Bajo coste y mayor rentabilidad.
- Las células pueden emplearse en el momento o ser criopreservadas.

Una vez obtenida la muestra, se realiza un lavado con solución salina del tejido obtenido y posteriormente se separa la fracción vasculoestromal mediante centrifugado de la muestra. El tejido es digerido mediante la acción enzimática de la colagenasa con el fin de obtener células individuales. Se realiza un nuevo lavado para destruir los restos celulares hematopoyéticos y las células resultantes se añaden a placas de cultivo. Pasadas 4-8 horas se procede a retirar las células que no se han adherido al plástico mediante una aspiración del medio de cultivo. Las células resultantes se van replicando hasta alcanzar una densidad próxima al 80% de confluencia. El medio de cultivo empleado habitualmente es el DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium), al que se añade un 1% de antibiótico y entre un 10-20% de suero fetal bovino. El aspecto de las células obtenidas al mirarlas al microscopio es muy similar a los fibroblastos o a las células estromales de la médula ósea. Las células obtenidas pueden ser criopreservadas durante largos periodos de tiempo, manteniendo la viabilidad y conservando sus propiedades biológicas .

Dependiendo del cultivo y de los diferentes autores, se pueden obtener 3.000-5.000 células por cm<sup>2</sup>. Diferentes estudios describen la obtención de células positivas homogéneamente positivas para CD10, CD13, CD29, CD44,

CD49e, CD59, CD90 y HLA-ABC; y homogéneamente negativas para CD11b, CD45 y HLA-DR. La ausencia del marcador CD45 indica que las células no derivan de células madre circulantes. El hecho de obtener una población tan homogénea procedente de múltiples donantes refuerza la idea del potencial empleo alogénico de este tipo de células en un futuro (129).

### **1.2.3.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS ASC**

A pesar de todos los estudios realizados hasta ahora, los procesos biológicos sobre los que actúan las ASC no son completamente conocidos. Además de sus capacidades de diferenciación y proliferación, se ha comprobado que las ACS son capaces de estimular los mecanismos endógenos de reparación de los tejidos. El mecanismo de acción podría estar asociado a su capacidad inmunomoduladora, inhibiendo los procesos inflamatorios. Se ha señalado que las lesiones tisulares pueden originar cambios en el microambiente de un órgano determinado, y desempeñar una importante función en la atracción de las células madre circulantes mediante la producción de quimosinas en la zona dañada, las cuales atraerían a las células madre dotadas de receptores, que les permitirían unirse con ellas (129).

En los últimos años se ha descrito el concepto de plasticidad como la capacidad que adquieren estas células bajo determinados cambios microambientales, de diferenciarse en células de tejidos diferentes a aquel con el cual la célula madre adulta se encontraba teóricamente comprometida (67). Esta condición no es del todo bien conocida, siendo mucho más compleja de lo que aparentemente parece, y actualmente se han planteado diferentes posibilidades:

- Fusión de las células madre trasplantadas con las presentes en el órgano diana: Se ha descrito que el contacto intercelular podría tener una acción importante en la fusión de una célula incorporada a un nuevo microambiente. Este mecanismo daría lugar a células híbridas con

características y propiedades de ambas células, pero con menor capacidad proliferativa. Hasta el momento actual, aunque se considera un mecanismo poco probable, no se ha encontrado ningún estudio que permita desechar esta teoría (67)(68).

- Heterogeneidad de las células madre presentes en una población celular (69).
- Resultado de un proceso de desdiferenciación y rediferenciación celular: Por lo general una célula madre está programada para transformarse en una línea celular concreta, pudiendo modificar su destino bajo determinadas circunstancias ambientales, cambiando su destino y dando lugar a células de otros tejidos diferentes. De esta forma, una célula comprometida, puede sufrir un proceso de desdiferenciación mediante un salto atrás en su etapa de maduración, y adquirir una nueva capacidad regenerativa, pudiendo modificar su línea celular (67)(70)(129).
- Persistencia de las células madre adultas con capacidad multi o pluripotencial: Algunos estudios describen la existencia de células madre en los tejidos adultos con capacidad multi o pluripotencial, que dependiendo del medio en el que se sitúen pueden diferenciarse hacia células de diferentes estirpes, como es el caso de las mencionadas anteriormente MAPCs (67)(71).

Hasta el momento no se desecha ninguna de estas teorías, considerando que incluso puede ocurrir más de uno de estos procesos de forma simultánea. Aún persisten numerosas incógnitas que despejar al respecto del verdadero mecanismo de acción de esta terapia.

### **Ventajas y desventajas de las ASC**

A pesar de los numerosos avances en este campo, aún no se conoce con exactitud las condiciones necesarias para la diferenciación de las ASC

hacia líneas celulares específicas. Otra desventaja adicionales su potencial teratogenicidad, si bien hoy en día se ha demostrado que suponen un tratamiento seguro (129). Asimismo, otra desventaja es que la mayor parte de estas células poseen una autorrenovación limitada, y hasta hace poco, su manipulación y cultivo resultaban dificultosos y con elevado coste. La realización de nuevos estudios está abriendo actualmente la posibilidad de cultivos más factibles y económicos, con lo que se ampliarían considerablemente las posibilidades de investigación y terapéutica.

En cuanto a sus ventajas, dada la procedencia autóloga, las células madres adultas no producen trastornos inmunológicos ni presentan problemas éticos en cuanto a su obtención.

### **1.2.3.4. APLICACIÓN DE LA TERAPIA CELULAR EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN**

En 1993 se publica la realización de un trasplante de médula ósea a un paciente con enfermedad de Crohn y linfoma. Posterior al trasplante, el paciente experimentó una mejoría de la enfermedad de Crohn. Tras la publicación del caso, surgió un aumento del interés de la comunidad científica sobre la posible aplicación de esta terapia en pacientes con EII. Cinco años después se publican seis pacientes con enfermedad de Crohn que mejoraron de forma importante tras la realización de un trasplante de médula ósea. De estos pacientes, tres experimentan una remisión de la enfermedad inflamatoria que se mantiene incluso diez años después del trasplante, incluso aún tras la suspensión de la terapia inmunosupresora (72).

Tras estos primeros estudios se propuso el trasplante de médula ósea como un posible tratamiento a largo plazo de la enfermedad de Crohn en pacientes refractarios. R.K. Burt describe en 2002 dos casos de pacientes con enfermedad de Crohn en los que se realiza trasplante de médula ósea para

control de la enfermedad intestinal, con resolución en ambos casos, permitiendo el cese de tratamiento con inmunosupresores (73).

A pesar de que existen diversos artículos en la literatura que describen el uso de trasplante de médula ósea como un posible tratamiento de la enfermedad de Crohn, en el momento actual no existe evidencia que avale su uso generalizado, debiendo individualizarse su aplicación viéndose regulada mediante ensayos clínicos. De hecho, determinados grupos postulan que el principal efecto terapéutico del trasplante de médula sobre pacientes con enfermedad de Crohn se debe, no tanto al trasplante, sino a la terapia inmunosupresora que lo sigue.

Los pacientes con enfermedad de Crohn poseen una respuesta alterada a los mecanismos inflamatorios dado el desequilibrio entre la producción local de citocinas proinflamatorias a nivel de la mucosa, que da lugar a una afectación transmural discontinua del tracto digestivo (129).

Los pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal sufren una neuropatía vagal autonómica con disfunción nerviosa a nivel local relacionada con un déficit de acetilcolina en la mucosa inflamada. Recientes líneas de trabajo demuestran que las células madre aplicadas a nivel local suponen un tratamiento que estimula la expresión de acetilcolin transferasa favoreciendo la regeneración entérica neural, disminuyendo por tanto la actividad celular (120).

Diferentes trabajos publicados en la literatura científica han demostrado la capacidad de las ASC de origen murino y humano de reparar daños tisulares in vivo. Se ha comprobado que en modelos animales de inflamación, las ASC son capaces de disminuir el proceso inflamatorio así como controlar la respuesta de los linfocitos T. Las ASC poseen capacidad de diferenciación, con escasa inmunogenicidad y capacidad de modular la respuesta inflamatoria. Si bien el mecanismo molecular se desconoce con exactitud, sabemos que su uso en tejidos adultos da lugar a la reparación tisular así como a la regeneración de las células dañadas. Asimismo, se ha comprobado la capacidad local de

estimulación tisular promoviendo entre otros la neovascularización de los tejidos dañados (82)(84)(85)(112)(113)(129)(130).

### **1.2.4 TRATAMIENTO DE LA FÍSTULA PERIANAL CON TERAPIA CELULAR**

En el momento actual existen 3 grupos a nivel mundial que lideran el estudio de las células madre y su aplicabilidad en la patología fistulosa. El grupo de la Dra Ciccocioppo en Italia, el del Dr. Cho en Corea y el grupo del Dr. García Olmo en el Hospital La Paz en Madrid.

Los estudios publicados por la Dra. Ciccocioppo en ensayos para valorar la factibilidad, seguridad y eficacia del uso de ASC en fístulas perianales resultan alentadores. En sus trabajos describe el mecanismo de acción y efectos de la terapia celular en diferentes patologías digestivas (129). Respecto al uso de células madre autólogas derivadas de médula ósea y su uso en fístulas perianales, describe una tasa de cierre completo de 7 de 15 pacientes y parcial en otros 3, con mejoría paralela de todos los índices de enfermedad de Crohn (130).

El grupo del Dr. Cho, en Corea describe la tolerabilidad, seguridad y potencial eficacia de las células madre autólogas derivadas de tejido adiposo en el tratamiento de las fístulas perianales secundarias a enfermedad de Crohn (131), con un cierre en 3 de 3 pacientes tratados y una ausencia de recidiva tras 8 semanas de seguimiento en un ensayo clínico fase I publicado en el año 2012 (132).

Los datos publicados en la literatura y la experiencia de nuestro grupo investigador liderado por el Dr. García Olmo, in vitro y los estudios en animales, nos llevaron al diseño y ejecución de ensayos clínicos en fase I, II y III empleando células madre autólogas en el tratamiento de la patología fistulosa.

El primer caso publicado por nuestro grupo correspondió a una paciente con fístula rectovaginal, una mujer de 33 años de edad con enfermedad de Crohn de 11 años de evolución, con una fístula rectovaginal de 1cm de diámetro. En dicha paciente se procedió a la administración de 9 millones de células madre autólogas derivadas de lipoaspirado. Tras 3 meses de seguimiento la paciente no presentó reacciones adversas a dicho tratamiento, observándose un cierre completo del defecto fistuloso (80)(81)(83)(86)(87)(88)(89).

El ensayo I se realizaron nueve implantes (cinco fístulas enterocutáneas, tres rectovaginales una fístula perianal) en cinco pacientes con enfermedad de Crohn, con dosis entre 6 y 30 millones de ASC por fístulas. No se observaron efectos adversos atribuidos a la terapia celular en ningún paciente y la tasa de cierre se situó en el 75% tras ocho semanas de seguimiento. En 8 de las fístulas se realizó seguimiento a las 8 semanas del implante. De estas, en 6 se observó reepitelización del trayecto fistuloso (75%). En las otras 2 se observó cierre incompleto del orificio externo con mejoría de la clínica. No se encontraron efectos secundarios durante el seguimiento, que duró 22 meses de media (81)

El ensayo fase II se trató de un estudio multicéntrico, abierto, aleatorizado con fármaco control, que constó de dos grupos paralelos tratados con un trasplante autólogo de ASC más adhesivo de fibrina o bien tan solo con adhesivo de fibrina. La dosis inicial fue de 20 millones y la de rescate de 40 millones. Durante el periodo de seguimiento no se objetivaron reacciones adversas relacionadas con la terapia celular y se obtuvo una tasa de curación del 71% en los pacientes tratados con ASC y adhesivo de fibrina frente al 14% en los pacientes tratados tan solo con adhesivo de fibrina. De todas las paciente incluidas en el ensayo 8 presentaban una fístula rectovaginal. De estas 8 paciente 4 fueron tratadas con ASC y 4 con adhesivo de fibrina. De las 4 tratadas con ASC en 3 de ellas se logró el cierre completo. De las pacientes tratadas con fibrina, en ningún caso se objetivó cierre completo durante el seguimiento (86).

El trabajo fase III fue también un ensayo multicéntrico ramdomizado realizado en 200 pacientes de 19 centros, que fueron ramdomizadas para recibir 20 millones de ASC (grupo A, 64 pacientes), 20 millones de ASC y pegamento de fibrina (grupo B, 60 pacientes) o bien sólo pegamento de fibrina (grupo C, 59 pacientes). Se consideraron pacientes curados aquellos con reepitelización del orificio externo y ausencia de colecciones mayores de 2cm en la Resonancia Magnética. Si tras 12 semanas la fístula permanecía abierta, se procedió a la aplicación de una segunda dosis (40 millones de ASC en los grupos A y B). Los pacientes fueron reevaluados tras 24 y 26 semanas de tratamiento y 1 año después. Tras 24-26 semanas, la tasa de cierre se situó en 39.1%, 43.3% y 37.3% en los grupos A, B y C ( $p=0.13$ ). Este trabajo demuestra que en el tratamiento de fístulas perianales complejas, las células madre derivadas de tejido adiposo son un tratamiento seguro que alcanza por si sólo o en combinación con pegamento de fibrina, tasas de cierre del 40% a los 6 meses y superior al 50% tras un año de seguimiento (121).



### **1.3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **1.3.1. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad, se ha demostrado la factibilidad, seguridad y eficacia de las células madre mesenquimales derivadas de lipoaspirado, utilizadas de en el tratamiento de las diferentes patologías fistulosas. Existen diversos ensayos clínicos publicados en la literatura (como hemos descrito con anterioridad), que emplean células madre alogénicas en la patología fistulosa. (80)(81)(83)(86)(88)(89)(121).

En este momento no existen ensayos clínicos registrados ni publicados referentes al empleo de células madre alogénicas en las fístulas rectovaginales. En este ensayo clínico realizamos el abordaje de las fístulas rectovaginales secundarias a enfermedad de Crohn con un producto celular alogénico.

El uso autólogo de las células madre ha demostrado ser factible, seguro y eficaz, y nuestra línea de investigación nos lleva ahora a plantearnos si el empleo de un producto alogénico pudiera ser factible y seguro en esta patología.

Teniendo en cuenta la naturaleza debilitante de la enfermedad, así como el carácter malabsortivo de la misma, no es posible realizar liposucción en todas las pacientes candidatas de terapia celular, por lo que nos vemos en la obligación de investigar nuevas vías de tratamiento.

La experiencia de nuestro grupo en este campo, así como los diferentes ensayos publicados en la literatura nos llevaron a plantear un ensayo clínico en fase I-IIa sin aleatorizar, sobre pacientes que cumplan los criterios de inclusión.

### 1.3.2. HIPÓTESIS

Las hipótesis planteadas en dicho ensayo clínico fueron las siguientes:

**Hipótesis Principal:** El uso alogénico de células madre derivadas del lipoaspirado (e-ASC) es factible y seguro para el tratamiento de fístulas rectovaginales.

**Hipótesis Nula:** Las e-ASC usadas de forma alogénica provocan algún tipo de reacción adversa inmunológica u otros efectos adversos graves.

**Hipótesis Óptima:** La variación de citoquinas circulantes no se afecta fuera de los valores normales, por usar e-ASC de forma alogénica.

Si la factibilidad y seguridad de este tratamiento, inicialmente, fuese similar a la obtenida usando e-ASC de forma autóloga se confirmarían las hipótesis principal y óptima, lo que nos llevaría a plantear un ensayo clínico multicéntrico, aleatorizado y randomizado en Fase II-III, con el fin de analizar la eficacia del tratamiento frente al tratamiento tradicional o frente al uso autólogo (cuya eficacia, seguridad y reproductibilidad ya han sido demostradas) en aquellos casos que se pueda realizar el proceso por las condiciones de las pacientes.

### 1.3.3. OBJETIVOS

Los objetivos de nuestro estudio se describen a continuación:

**Objetivo del proyecto:** Realizar un Ensayo Clínico en fase I-IIa con control externo sobre una nueva aplicación de Terapia Celular y Medicina Regenerativa, según las indicaciones desarrolladas en la Ley del Medicamento, para tratar una patología que altera considerablemente la calidad de vida de las mujeres que la padecen.

**Objetivo principal:** Evaluar la factibilidad y seguridad de las e-ASC alogénicas para tratar fístulas recto-vaginales.

**Objetivo secundario:** Determinar la variación de citoquinas en los pacientes tratados a diferentes tiempos, durante el seguimiento, para comprobar si existe una reacción de rechazo al inyectar células e-ASC procedentes de donantes sanos.

**Objetivo tercero:** Obtener unos datos preliminares de la efectividad del tratamiento propuesto que nos permitan diseñar en el futuro un Ensayo Clínico en Fase II frente a la misma patología.

### Relevancia del proyecto

- 1. Relevancia del proyecto en cuanto a su impacto clínico, asistencial y/o desarrollo tecnológico:** La patología a la que va dirigido este ensayo supone una merma importante de la calidad de vida de nuestras pacientes y un complicado manejo tanto clínico como quirúrgico, como hemos descrito previamente. Las fístulas recto-vaginales secundarias a enfermedad de Crohn presentan una baja tasa de curación así como una elevada recidiva. En este contexto se plantea el uso autólogo de e-ASC, cuya factibilidad, seguridad y eficacia (70% en el ensayo clínico en fase II) ha sido demostrada por nuestro grupo. A pesar de la eficacia descrita, no todas las pacientes son subsidiarias a la administración autóloga, debido al carácter debilitante de la enfermedad, siendo en ocasiones desaconsejable la realización de la liposucción. Por ello consideramos que el uso alogénico de e-ASC puede presentar un gran impacto clínico y social y aportar una solución de aplicabilidad clínica sencilla, de escasos riesgos, factible económicamente y con resultados esperamos sean similares a los obtenidos con e-ASC autólogas y superiores a los de los tratamientos

convencionales. Poco a poco, los productos de terapia celular podrían terminar integrándose como un medicamento más de la farmacopea actual.

- 2. Relevancia del proyecto en cuanto a su impacto bibliométrico:** Si los resultados son los esperados (similares a los obtenidos en modelos animales o en humanos con células de otro origen), se prevé publicarlos en revistas biomédicas con factor de impacto reconocido y dentro del primer cuartil de su grupo de influencia.

### **Limitaciones del estudio**

No se encontraron limitaciones del estudio, debido tanto a la casuística del ensayo (dirigido a 10 pacientes) así como a las características del mismo.

## **2. PACIENTES Y MÉTODOS**



### 2.1. DISEÑO DEL ENSAYO.

En el contexto clínico anteriormente descrito se procedió al diseño del ensayo clínico fase I-IIa con el fin de demostrar la factibilidad y seguridad del las células madre expandidas (e-ASC) alogénicas derivadas de la grasa en el tratamiento local de la fistula rectovaginal secundaria a enfermedad de Crohn.

Dicho ensayo se realizó de forma unicéntrica, sin fármaco control, procediéndose a la inyección local a nivel submucoso de una suspensión de células madre mesenquimales adultas obtenidas a partir de tejido adiposo de donante sano mediante liposucción. Dicho tejido adiposo fue procesado, tratado y envasado por la empresa Cellerix S.L. Dadas las características del estudio (I-IIa), no procedía la administración de fármaco control.

El promotor de nuestro estudio fue la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz y la Sección de Cirugía Colorrectal del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo, siendo la empresa responsable de la elaboración y control de las muestras Cellerix S.L. El centro en el cual se llevó a cabo en el ensayo es el Hospital Universitario La Paz, encontrándose monitorizado por Pilar Diarte Pérez, de Farmacología Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

El investigador principal del estudio fue el Profesor Dr. Damián García Olmo, actuando como investigadores colaboradores el Dr. M. García Arranz, la Lcda. P. de la Quintana, la Dra. M.D. Herreros, el Dr. H. Guadalajara, la Dra. C. González Gómez, el Dr. T. Georgiev y el Dr. J. Trébol.

Este ensayo fue controlado de forma externa, actuando como promotor la Fundación para la Investigación Biométrica de La Paz, bajo el seguro de Responsabilidad Civil de la aseguradora W.R. Berkley.

La financiación fue obtenida de la Convocatoria de Ensayos Clínicos No Comerciales del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) del año 2008 (Referencia

del ensayo: EC08/00158 con un presupuesto total de 210.540 euros: Ver anexo 10).

Los datos de Identificación del ensayo fueron:

- **Código del protocolo:** EC08/00153.
- **Nº EudraCT:** 2009-010225-39.
- **Título:** Ensayo clínico en Fase I-IIa para conocer la factibilidad y seguridad del uso alogénico de células madre expandidas (e-ASC) derivadas de la grasa en el tratamiento local de fístulas recto-vaginales de Crohn.

Dicho ensayo fue presentado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz (Ver anexos 7 y 8).

### **Medios disponibles para la realización del proyecto**

Entre los medios empleados en el proyecto destacamos:

- Sección de Cirugía Colorrectal del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo, integrado por varios cirujanos con experiencia tanto en Terapia Celular y en cirugía de la fístula rectovaginal.
- Consulta Externas de Cirugía, para el realizó el seguimiento de las pacientes.
- Servicios centrales hospitalarios (laboratorios de bioquímica, hematología, radiología,..).
- Quirófanos para los implantes y salas de corta estancia para el postoperatorio inmediato.
- Laboratorio de Terapia Celular. Integrado por biólogos y médicos con experiencia en Biología Molecular de las células mesenquimales adultas procedentes del tejido adiposo.



- Servicio de Farmacia hospitalaria. Realizó la recepción del medicamento, control de las condiciones de acondicionamiento y transporte.
- Servicio de Bioestadística: Análisis de los datos obtenidos en el estudio.

### **Experiencia del equipo investigador sobre el tema**

Nuestro equipo de terapia celular forma parte del grupo IdiPaz, encontrándose liderado por el Dr. García Olmo. Poseemos una amplia experiencia tanto clínica como investigadora, especialmente en lo referente al campo de la terapia Celular. Entre otros, contamos con diferentes proyectos en curso relacionados con patología fistulosa (fistula perianal compleja, fistula rectovaginal y fístula enterocutánea) y otros con el uso de suturas enriquecidas con células madre (aplicados a anastomosis cólicas, traqueales, tendinosas y a las reparaciones esfinterianas). Nos encontramos en fase de desarrollo investigaciones relacionadas con la oncogénesis y su potencial relación con las células troncales (80)(81)(82)(83)(84)(86)(87)(88)(121).

Nuestro grupo supone asimismo uno de los pioneros en trasladar los resultados del laboratorio utilizando células troncales a la práctica clínica (investigación traslacional). Hemos completado los estudios fase I, fase II y fase III en el uso de ASC autólogas. Esta actividad ha dado como resultado numerosas publicaciones de impacto internacional así como varias patentes nacionales, europeas y norteamericanas. La experiencia de nuestro grupo investigador se puede comprobar en la página de Clinicaltrials.gov, en la que constan diferentes ensayos clínicos, sobre Terapia Celular liderados el Dr. García Olmo (81)(86)(121).

## 2.2. SELECCIÓN DE PACIENTES

El número total de pacientes incluidas fue de 10. Todas las pacientes cumplían todos los criterios de inclusión no presentando ninguno de los criterios de exclusión.

### Criterios de inclusión

1. Firma del consentimiento informado previa entrevista con el equipo investigador, en la que se explica el estudio resolviéndose las dudas planteadas y entregándose el dossier de información al paciente (Ver anexo 9).
2. Historia médica de enfermedad de Crohn y diagnóstico de la misma mayor a 12 meses de evolución conforme a los criterios clínicos, endoscópicos, anatomopatológicos y/o radiológicos aceptados.
3. Las pacientes deben cumplir al menos una de las siguientes condiciones:
  - a) Al menos una cirugía previa por enfermedad fistulosa.
  - b) Condiciones físicas que desaconsejen la liposucción.
4. Presentar fístula recto-vaginal.
5. Mujeres mayores de 18 años en el momento del tratamiento, presentando buen estado general de salud, de acuerdo con los datos de la historia clínica y la exploración física.

### Criterios de exclusión

1. Presencia de proctitis grave (friabilidad llamativa, sangrado espontáneo, erosiones múltiples, úlceras profundas) o enfermedad luminal activa dominante que requiera tratamiento inmediato, a juzgar por la rectosigmoidoscopia.
2. Índice CDAI  $\geq 201$  (Ver anexo 2).

3. Sujetos con absceso presente en el momento de la aplicación, confirmado mediante exploración clínica y RMN (ver anexo 1), salvo que se efectúe una limpieza completa de la zona con drenaje de las colecciones y se confirme la ausencia de absceso y otras colecciones antes de iniciar el tratamiento.
4. Administración de Infliximab o cualquier otra tratamiento anti-TNF en las 8 semanas anteriores a la terapia celular.
5. Administración de Tacrolimus o ciclosporina en las 4 semanas anteriores a la terapia celular.
6. Antecedentes de abuso de alcohol o de otras sustancias adictivas en los 6 meses anteriores a la inclusión.
7. Neoplasia maligna, salvo carcinoma basocelular o epidermoide de la piel o antecedentes de tumores malignos, salvo que se hayan encontrado en fase de remisión durante los 5 años anteriores.
8. Enfermedad cardiopulmonar que, en opinión del investigador, resulte inestable o revista la gravedad suficiente para descartar al paciente del estudio.
9. Enfermedad médica o psiquiátrica de cualquier tipo que, en opinión del investigador, pueda suponer un motivo de exclusión del estudio.
10. Sujetos con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas. Hepatitis B y/o C o tuberculosis diagnosticada en el momento de la inclusión, así como infección por treponema.
11. Alergia los anestésicos o al gadolinio (contraste empleado en la realización de resonancia magnética).
12. Imposibilidad para la realización de resonancia magnética (p. ej., por presencia de marcapasos, prótesis de cadera o claustrofobia intensa)
13. Cirugía mayor o traumatismo grave del sujeto en el semestre anterior.
14. Mujeres embarazadas o lactantes.

15. Administración de cualquier fármaco en investigación en el momento actual o tres meses antes del reclutamiento para este ensayo.

### **2.3. ASPECTOS ÉTICOS**

Para el diseño y posterior desarrollo de este estudio se han respetado los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki (ver Anexo 11), en la Declaración Universal de la UNESCO y se cumplen todos los requisitos de la legislación española. En el contrato con el laboratorio productor se exigió el cumplimiento con la legislación vigente, así como las autorizaciones pertinentes para la producción de ASC siguiendo los criterios de BPCs.

El promotor del ensayo fue a la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz, contando con un Seguro de Responsabilidad Civil, con la correduría de seguros HDI.

Como queda reflejado previamente, se contrató una CRO y monitorización externa para asegurar la objetividad del estudio y su buen desarrollo, hasta ahora y en ensayos anteriores hemos trabajado con la empresa Effic Research.

El estudio fue presentado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz.

#### **Codificación de pacientes**

Con el fin de garantizar la fiabilidad de los datos recogidos durante el periodo del estudio y mantener la confidencialidad de las pacientes incluidas, de acuerdo con la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, los datos personales de las pacientes incluidas fueron los necesarios para cubrir los objetivos del proyecto, y son conocidos exclusivamente por el equipo investigador implicado en este ensayo clínico. En ninguno de los informes utilizados durante el estudio aparecían datos de identificación de las pacientes y su identidad solo será revelada en caso de urgencia médica o requerimiento

legal. En ningún momento Cellerix S.L. ni nadie ajeno al estudio, dispuso de información que permitiera asociar nombre, número de historia clínica ni número de la Seguridad Social.

La información obtenida en el estudio realizado se consideró confidencial, por lo que las pacientes incluidas recibieron en la visita inicial un código de sujeto según el orden de inclusión (ej. A01).

### **2.4. DESCRIPCIÓN DE LA SERIE**

Se incluyeron 10 pacientes en el ensayo clínico, todas ellas mujeres mayores de edad, con una edad media de 35 años (31-49). Las pacientes tratadas tenían una media de años de evolución de enfermedad de Crohn de 11.6 años.

Todas eran mayores de edad y cumplían con todos los criterios de inclusión, y no presentaban ninguno de los criterios de exclusión del estudio.

Para poder ser incluidas en el estudio, las pacientes que se encontraban en tratamiento con medicamentos biológicos (ej. Infliximab, Humira,...) tuvieron que interrumpirlos, para de esta forma poder cumplir los criterios establecidos. Sí que se permitió el tratamiento con Imurel, por lo que 4 pacientes lo recibieron durante el periodo del estudio, con corticoides (2 pacientes), con Claversal (1paciente) o con Humira (1 paciente).

Todas las pacientes habían presentado cirugías previas sobre su fístula rectovaginal, con una media de 1.8 intervenciones (1-4). La media de cirugías perineales previas fue de 3.1 cirugías.

Asimismo, dos pacientes presentaban antecedentes de colectomía subtotal con reservorio ileorrectal y en ambos casos presentaban incontinencia anal severa. En ambos casos se realizó dicha técnica ante el diagnóstico de colitis inespecífica, siendo posteriormente diagnosticadas de enfermedad de Crohn. Estas dos pacientes presentaban incontinencia anal en el momento de ser incluidas en el estudio.

## 2. PACIENTES Y MÉTODOS

Durante la exploración quirúrgica se evidenció la presencia de un único trayecto fistuloso en 8 pacientes mientras que una paciente presentó 2 trayectos fistulosos (uno rectovaginal y uno perianal) con un único orificio rectal y otra paciente presentó 3 trayectos (1 rectovaginal y 2 perianales) con un único orificio rectal.

El tamaño de orificio fistuloso fue de 4.8 mm de media (2-20mm) de diámetro.

Los datos de las pacientes se resumen a continuación.

	Edad	Años de EC	Cirugías perineales	Cirugía de FRV	Tratamiento para EC	Nº de tractos	Tamaño mm
A01	34	4	3	2	Imurel	1	5
A02	32	5	8	3	Imurel	2	2
A03	52	10	1	1		1	20
A04	34	19	4	2		1	3
A05	45	10	5	4		1	2
A06	36	17	2	1		1	2
A07	31	16	3	1	Imurel	3	3
A08	49	23	3	2	Imurel	1	4
A10	55	1	1	1	Claversal, Corticoides	1	3
A11	34	11	1	1	Humira, Corticoides	1	4
Media	35	11,6	3,1	1,8		1,3	4,8

Tabla 7.: Características de las pacientes incluidas en el estudio.

## 2.5. DESARROLLO DEL ESTUDIO

Las pacientes seleccionadas para el estudio fueron seguidas de forma mediante la realización de evaluaciones clínicas periódicas así como analíticas de sangre periférica y valoración de citocinas de plasma.

Las visitas planificadas se describen a continuación:

- **Visita de Pre-evaluación:** Explicación a la paciente y entrega de documentación del estudio.
- **Visita –1: Visita de incorporación de la paciente al ensayo,**
  - Entrega y firma del consentimiento informado.
  - Apertura del cuaderno de recogida de datos.
  - Valoración de criterios de inclusión y exclusión.
  - Cuestionarios: Test de Calidad de vida (SF-36), test de WEXNER, test CDAI, test PDAI y test SES-SC.
  - Valoración clínica: Exploración rectal y vaginal.
  - Analítica completa (bioquímica y hematología).
  - RMN.
  - Colonoscopia con ileoscopia.
- **Visita 0: Intervención quirúrgica:**
  - Cuaderno de recogida de datos.
  - Cuestionarios: Test Wexner, test CDAI, test PDAI.
  - Análisis de citocinas: 10 ml de sangre periférica.
- **Visita + 1:** 1 semana después de la administración celular:
  - Cuaderno de recogida de datos.
  - Cuestionarios: Test Wexner, test CDAI, test PDAI y Test de Calidad de vida SF-36.
  - Analítica completa y análisis de citocinas: 10 ml de sangre periférica.
- **Visita +2:** 4 semanas después de la administración celular:
  - Cuaderno de recogida de datos

- Cuestionarios: Test Wexner, test CDAI, test PDAI y Test de Calidad de vida SF-36.
- Exploración rectal y vaginal (digital).
- Analítica completa.
- **Visitas +3:** 8 semanas después de la administración celular:
  - Cuaderno de recogida de datos.
  - Cuestionarios: Test Wexner, test CDAI, test PDAI y Test de Calidad de vida SF-36.
  - Exploración rectal y vaginal con rectoscopia y/o espéculo.
  - Analítica completa y análisis de citocinas: 10 ml de sangre periférica.
- **Visita +4:** 12 semanas después de la administración celular: Valoración de “End point” cierre fístula.
  - Cuaderno de recogida de datos.
  - Cuestionarios: Test Wexner, test CDAI, test PDAI y Test de Calidad de vida SF-36.
  - Exploración rectal y vaginal con rectoscopia y/o espéculo.
  - Analítica completa.
- **Visita +5:** 24 semanas después de la administración celular:
  - Cuaderno de recogida de datos.
  - Cuestionarios: Test Wexner, test CDAI, test PDAI.
  - Exploración rectal y vaginal con rectoscopia y/o espéculo.
  - Analítica completa.
  - Solicitud de resonancia magnética pélvica y colonoscopia previa a la visita V+6.
- **Visita +6:** 52 semanas después de la administración celular.: Visita final: “End point” Valorar recidiva fistulosa.
  - Cuaderno de recogida de datos.
  - Cuestionarios: Test Wexner, test CDAI, test PDAI, Test SES-SC.
  - Exploración rectal y vaginal con rectoscopia y/o espéculo.
  - Analítica completa.
  - Valorar resultados de Colonoscopia y resonancia magnética.



Los datos obtenidos en cada una de estas visitas, fueron recogidos por el equipo investigador (Dr. D. García Olmo, Dra. M.D. Herreros, Dr. H. Guadalajara, Dra. C. González-Gómez, Dr. J. Trébol y Dr. T. Georgiev) en el cuaderno de recogida de datos codificado de acuerdo a la Ley de Protección de Datos y almacenado bajo llave. Asimismo, en cada una de estas visitas, se dejó constancia de los datos clínicos más relevantes en la historia clínica hospitalaria, con el fin de completar la misma y dejar constancia del evolutivo de las pacientes.

### 2.6. DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO

El tratamiento aplicado compone una suspensión de células madre mesenquimales adultas derivadas de tejido adiposo procedentes de donante sano, aplicadas en dosis de 20 millones, con una pauta de rescate de 40 millones en los casos de no cierre completo a las 16 semanas del tratamiento inicial. Las células fueron obtenidas mediante liposucción en un donante sano, y procesadas y envasadas por el laboratorio productor seleccionado a partir de un concurso público.

La vía de administración fue intralesional, a nivel submucoso.

La identificación de la dosis en terapia celular no sigue las mismas bases que con los fármacos tradicionales. Los estudios previos desarrollados con células autólogas en patología fistulosa perianal, en su mayoría, incluyen una dosis inicial de 20 millones de células y una segunda dosis, en los casos de no cierre de los diferentes tractos fistulosos, de 40 millones de células. Por ello hemos decidido mantener las mismas dosis que en los tratamientos autólogos.

#### **Tratamientos concomitantes**

En el momento de iniciar el estudio, las pacientes continuaron con medicación prescritas por su médico, que quedaron registradas en el cuaderno de recogida de datos, a excepción de aquellos medicamentos que supongan un criterio de exclusión. Asimismo, se registraron aquellos procesos diagnósticos o terapéuticos realizados durante el estudio. Se proporcionó a las pacientes las medidas terapéuticas necesarias para el tratamiento de sus enfermedades. Las pacientes no pudieron recibir otros fármacos en fase de experimentación ni tratamientos quirúrgicos en la región perianal.

#### **Productor del compuesto experimental**

Empresa Cellerix S.L.  
C/ Marconi 1, Parque Tecnológico de Madrid  
28760. Tres Cantos. Madrid.

### **Identificación del producto**

La obtención de ASC se llevó a cabo en condiciones estériles mediante una liposucción de donantes sanos, posteriormente tratadas en el laboratorio y cultivadas por la empresa Cellerix S.L.

Para la liposucción se introdujo una cánula hueca a través de una incisión en el abdomen, provocando una succión y disrupción del tejido adiposo. Previamente se inyectó una mezcla de epinefrina que actuó como vasoconstrictor minimizando así el sangrado.

Dicho lipoaspirado se lavó con una solución tamponada estéril que eliminó las células sanguíneas y los restos de suero y anestésico. Fue tratado con colagenasa tipo II durante 30 minutos a 37°C, en condiciones de esterilidad.

Posteriormente se centrifugaron a 250g por minuto las células suspendidas, realizando eritrolisis con NH<sub>4</sub>Cl e incubándolo durante 10 minutos.

Finalmente se realizó una nueva centrifugación y una resuspensión en medio DMEN con suero fetal bovino al 10% y ampicilina/estreptomicina al 1%, y sembrándose en placas de cultivo a concentración de 10-15x10<sup>3</sup> céls/cm<sup>2</sup>.



Fig.11.: Tratamiento del producto celular.

### **Técnica quirúrgica**

Una vez incluidas las pacientes en el ensayo y completado el estudio preoperatorio, se indicó la cirugía en el momento de mejor control de la enfermedad sistémica y cuando el estado de la fístula fue adecuado (ej. Ausencia de abscesos perianales asociados)

Las pacientes ingresaron la víspera de la intervención quirúrgica. Previa intervención se administraron 2gr de Amoxicilina- Ác. Clavulánico con carácter profiláctico. Bajo anestesia local y sedación se colocó a cada paciente en posición de litotomía y se esterilizó el campo con una solución de Clorhexidina no alcohólica. Se realizó una exploración rectal y vaginal identificando el orificio rectal, el orificio vaginal, el trayecto fistuloso y los posibles trayectos perianales

asociados, excluyendo la presencia de abscesos. Se llevó a cabo un legrado del trayecto fistuloso y una resección de los orificios en los casos indicados.

Posteriormente se realizó un cierre simple si el defecto era pequeño o un flap de avance rectal o vaginal, si el orificio era grande, con el fin de evitar una sutura con tensión y cubrir por completo el defecto tisular. Los colgajos de avance fueron completos (mucosa, submucosa y muscular), con un pedículo ancho que favorece una correcta irrigación, suturados con puntos sueltos. Posteriormente se llevó a cabo una inyección del producto celular a nivel submucoso, en la zona del trayecto fistuloso así como los orificios vaginal y rectal. En ninguna de las pacientes se realizó un abordaje del esfínter anal, con el fin de evitar incontinencia fecal.

A continuación se detalla la técnica quirúrgica empleada en la visita V0:

- Paciente A01: Flap vaginal.
- Paciente A02: Flap vaginal.
- Paciente A03: Flap vaginal.
- Paciente A04: Flap vaginal.
- Paciente A05: Cierre simple.
- Paciente A06: Flap rectal.
- Paciente A07: Flap vaginal.
- Paciente A08: Flap rectal.
- Paciente A10: Flap rectal y flap vaginal.
- Paciente A11: Reconstrucción rectovaginal.

Tras la cirugía las pacientes pasaron a la Recuperación postanestésica para control hemodinámico y posteriormente ingresan en la planta de cirugía. Se inició tolerancia a líquidos a las 6h de la intervención y posterior tolerancia a sólidos. Si al día siguiente la paciente presenta buen control del dolor, las pacientes fueron dadas de alta, completándose el resto de seguimiento de manera ambulatoria.



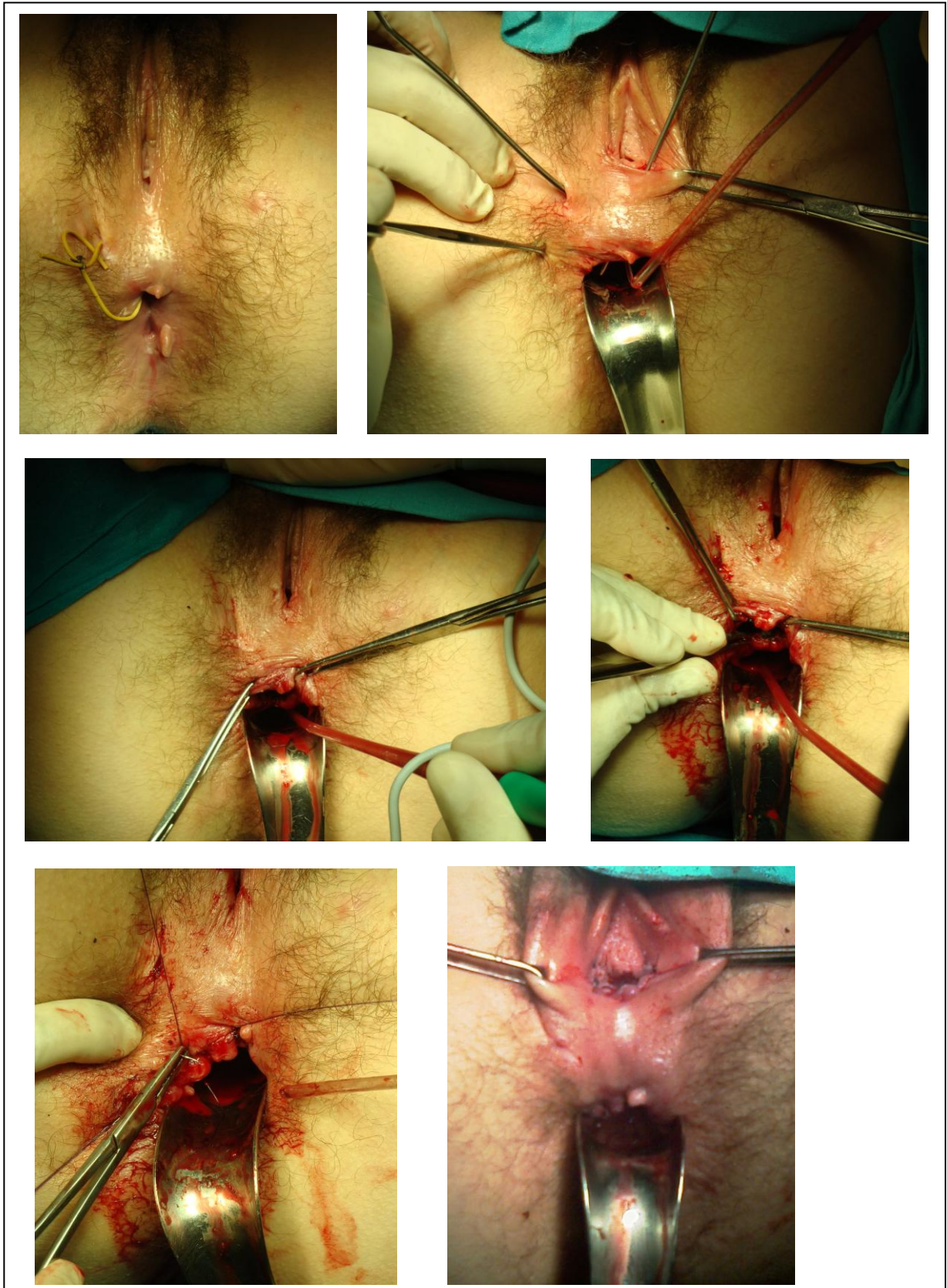


Fig. 12.: Paciente A02.



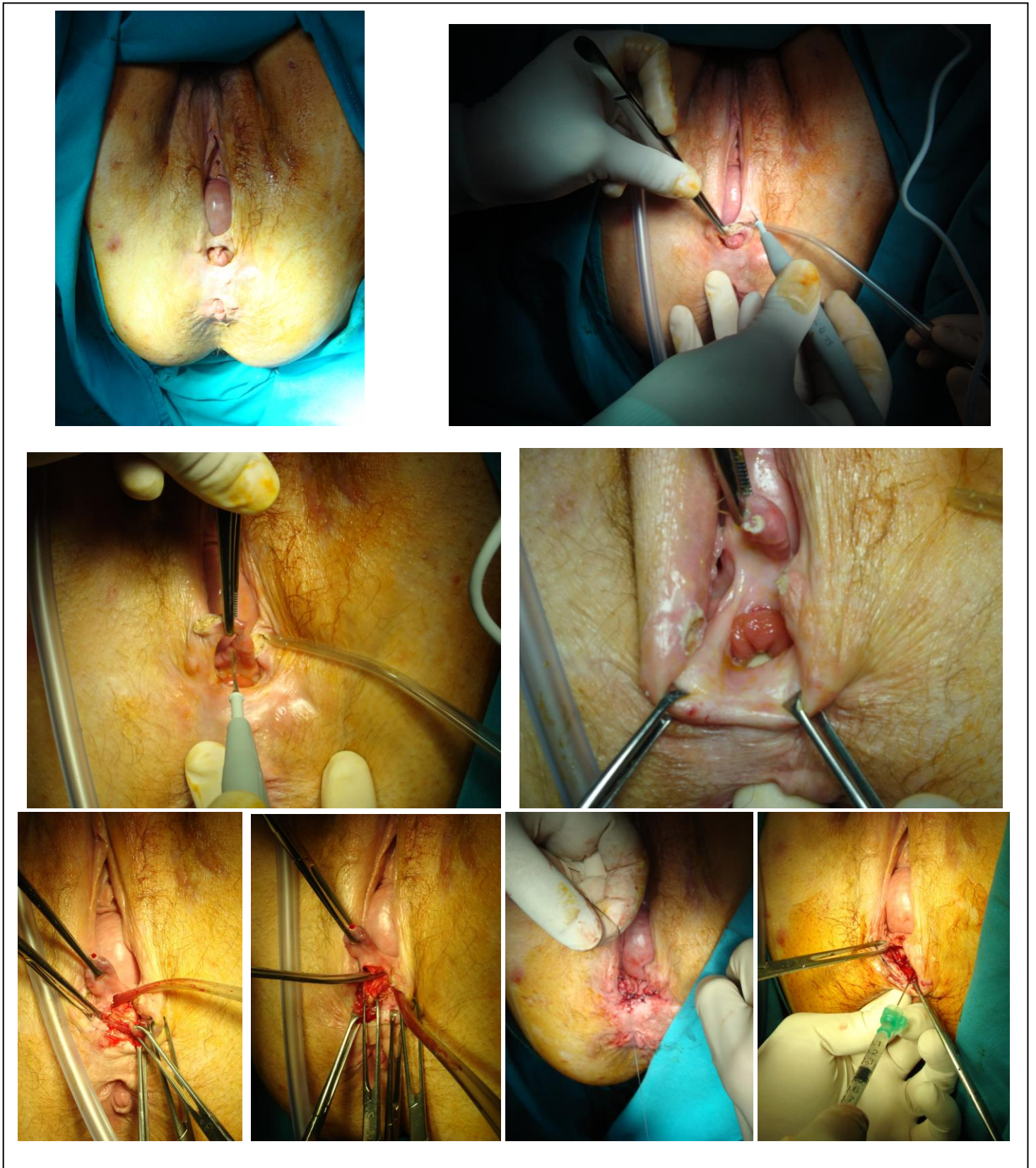


Fig. 13.: Paciente A03.



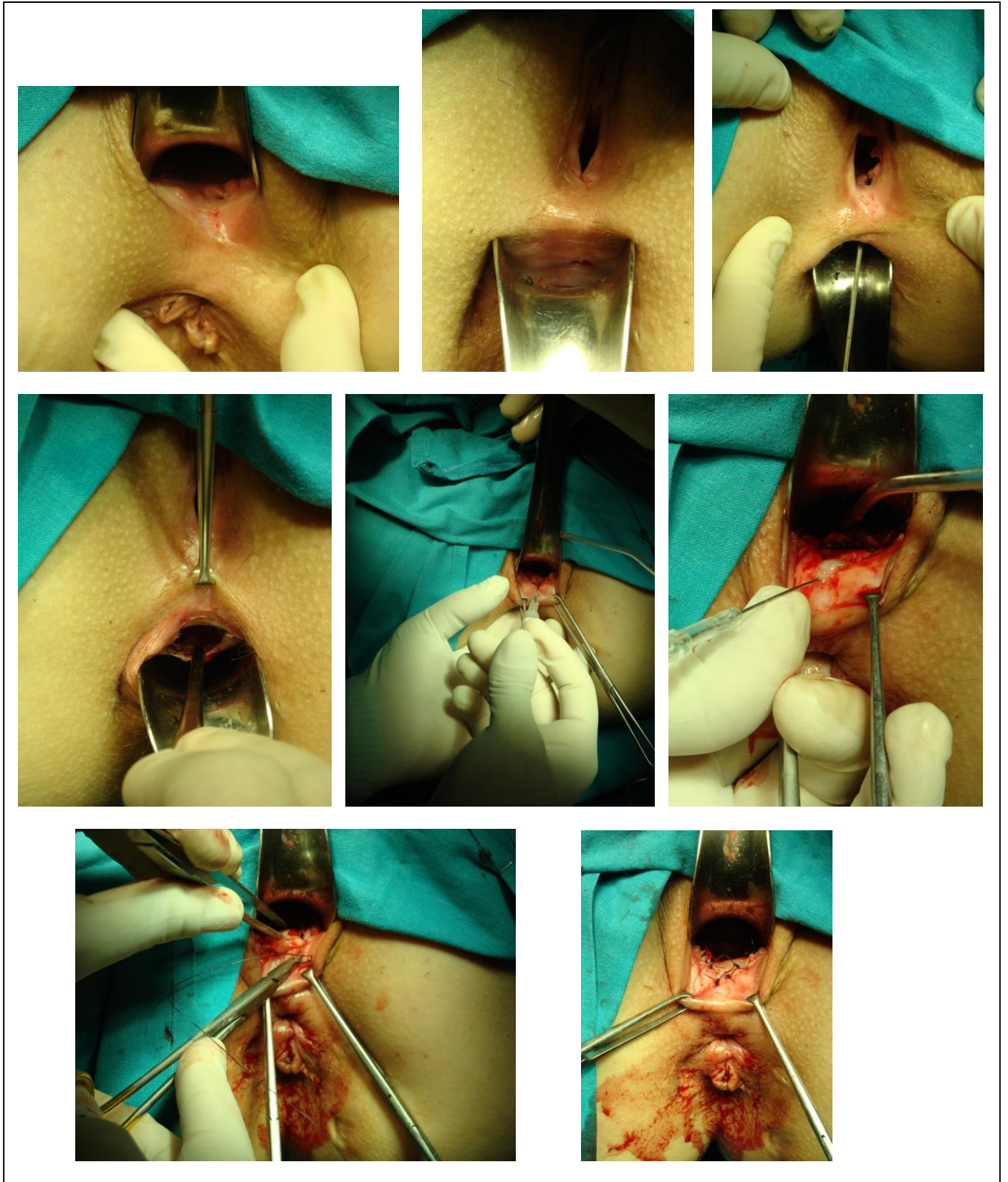


Fig. 14.: Paciente A04.



## 2.7. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA

### Variables de valoración

La **variable primaria** de factibilidad y seguridad del estudio se analizó una vez la paciente hubo recibido el tratamiento, a las 16 semanas del implante y al año de seguimiento. Se definió el proceso como seguro cuando durante el desarrollo y seguimiento del ensayo no se produjo ningún acontecimiento adverso relacionado con la terapia propuesta en el ensayo. Todos los acontecimientos adversos clínicos fueron recogidos durante el seguimiento en los mismos tiempos que la evaluación clínica. Se evaluó como objetivo principal la incidencia acumulada de efectos adversos atribuidos a la terapia en el estudio.

**Variable secundaria:** Como parte de la evaluación de la calidad de vida de las pacientes así como una evaluación clínica del tratamiento se realizó a las 16 semanas después del implante. Como parte de la evaluación de recidiva se realizó una evaluación clínica de las pacientes al año de implantarse las células. Ambos estudios fueron llevados a cabo por los investigadores clínicos del ensayo, coordinados por el investigador principal.

### **Desarrollo del estudio**

El ensayo propuesto suponía estudio en fase I-IIa sobre un grupo de pacientes (10) que cumplían los criterios de inclusión y no presentaban criterios de exclusión, que nos permitiera conocer la factibilidad y seguridad de un tratamiento con células madre derivadas de lipoaspirado (ASC). Durante los 9 primeros meses se obtuvieron los permisos necesarios del CEIC y de la Agencia del Medicamento Española para utilizar las ACS con esta nueva indicación y se contrataron los servicios de un laboratorio productor que suministraban las células. Los siguientes 6 meses se reclutaron los pacientes, que cumplían los criterios de inclusión, como hemos comentado por su gravedad afortunadamente es una patología poco común. Este trabajo fue realizado los Dres. D. García Olmo, M.D. Herreros, H. Guadalajara, C.

González Gómez, J. Trébol y T. Georgiev (Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo del Hospital Universitario La Paz).

Una vez diseñada la documentación, el Dr. García Arranz se encargó de distribuirla, a los componentes clínicos del equipo. Posteriormente fue rellena, completando los datos de cada paciente, en la consulta de Cirugía destinada para su fin por la Enfermera (Paloma de la Quintana) y el médico correspondiente del estudio. La enfermera de la consulta se encargó de archivar toda la documentación para mantener la confidencialidad de los pacientes.

Previa a la administración del tratamiento las pacientes, los investigadores rellenan los formularios en cada paciente: codificación de la paciente, cuaderno de recogida de datos y procedimientos normalizados de trabajo (Ver anexo 9). Estos documentos fueron elaborados conjuntamente entre la empresa que actúa como CRO y el equipo de investigación.

Una vez incluido una paciente en el estudio y firmados los consentimientos y aceptados los permisos, se procedió al implante celular. Si pasadas 16 semanas desde el tratamiento (implante celular) no se produjo curación (definida como ausencia de supuración con re-epitelización del orificio externo) se procedió a un segundo implante, esta vez con dosis de rescate (40 millones), siguiendo la misma técnica.

### Desarrollo del procedimiento de implantación celular

Se informó detenidamente a las pacientes, que cumplían los criterios de inclusión, del estudio, siendo firmada la hoja de Consentimiento. Una vez aceptado y cuando el estado de la fístula fue el adecuado se solicitó el medicamento al laboratorio fabricante, programando la intervención y notificando a la paciente la fecha del implante. El medicamento fue recibido por el Servicio de Farmacia del Hospital, quien comprobaba el envase, vigilando que el rango de temperatura se había mantenido durante el transporte así como verificando la documentación requerida. La implantación del producto se

realizó de forma local, mediante inyección de la suspensión celular en las paredes del tracto fistuloso.

El día del tratamiento se anestesió a la paciente a criterio del anestesista. Se identificó del orificio interno de la fistula, del orificio externo y del trayecto o trayectos fistulosos. En función de las características de la fístula y del esfínter anal, se procedió a la realización de un legrado del trayecto, cierre simple del orificio y realización de flap de avance rectal o vaginal según procedía. Posteriormente se llevó a cabo la inyección de 20 millones de células madre en el entorno del mismo en condiciones de esterilidad.

### Seguimiento postimplante

Una vez dada de alta hospitalaria, la paciente acudió a la consulta, para revisión y seguimiento, según la pauta de seguimiento estipulada (1, 4, 16 y 52 semanas); los días de consulta fueron coordinados por la enfermera de la consulta, que asimismo se encargó de recoger todos los datos necesarios junto con el médico correspondiente. La enfermera de la consulta llevó a cabo el archivo y clasificación toda la documentación para mantener la confidencialidad de los pacientes.

En todo momento el seguimiento de la paciente fue individualizado y todos los datos se recogieron en los cuadernos diseñados para este fin por la CRO y el equipo quirúrgico. Los “end point” fueron a las 16 semanas y al año posteriores al implante celular. Consideraremos exitoso el ensayo cuando no se describieron efectos adversos, habiendo mejorado la calidad de vida de la paciente (test SF36) y cuando observamos ausencia de supuración con re-epitelización del orificio externo de la fistula.

## 2.8. DESVIACIONES DEL PROTOCOLO

Tras completar el ensayo clínico fueron documentadas las siguientes desviaciones del protocolo:

- Paciente A09: Una paciente excluida del estudio en la visita -1 por presentar criterios de exclusión tras completar el estudio preoperatorio. En esta paciente no se administró el producto ASC.
- Paciente A06: Paciente que presentó cierre de la fístula rectovaginal tras una única dosis de células, sin precisar rescate con una nueva intervención. La paciente fue seguida en consultas externas, y durante dicho seguimiento presentó un brote severo de su enfermedad de Crohn, precisando tratamiento con Imurel (criterio de exclusión), por lo que fue excluida del estudio entre las visitas V5 y V6.
- Paciente A10: Tras la primera administración celular y durante el seguimiento se evidenció trayecto fistuloso permeable, por lo que consideramos a la paciente candidata de dosis de rescate. Previa a la administración de la segunda dosis de tratamiento, la paciente fue excluida del estudio por presentar brote severo de enfermedad de Crohn que precisó tratamiento con Infliximab, considerándose el mismo criterio de exclusión.
- Pacientes A02, A03 y A11: Estas tres pacientes precisaron dosis de rescate con 40 millones de ASC. Tras la administración de la segunda dosis de tratamiento, fueron retiradas del estudio por precisar tratamiento con fármacos biológicos (Infliximab, Imurel y Humira) debido al mal control de su enfermedad de base.

Los datos se resumen a continuación, en la siguiente tabla:

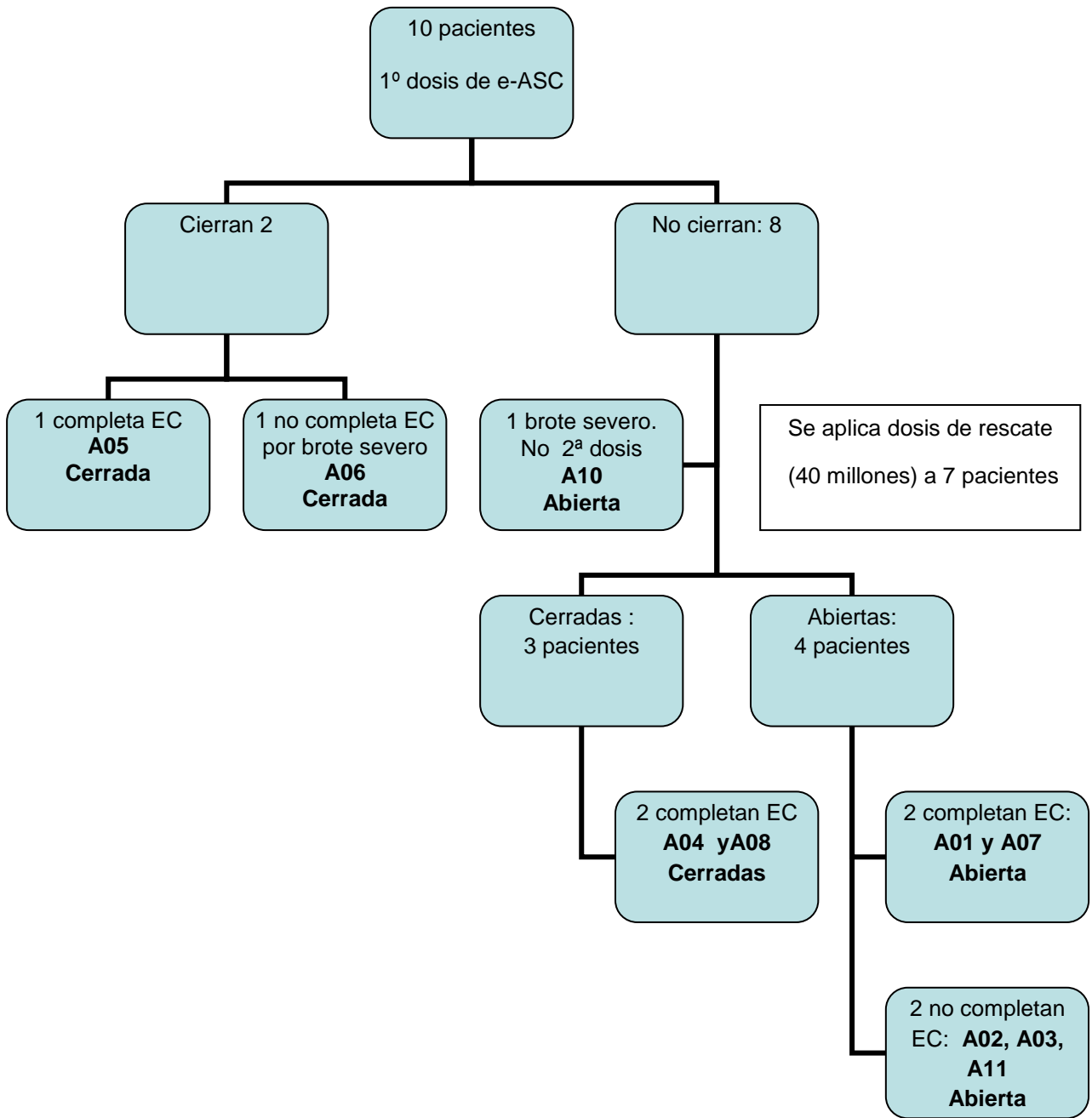


Fig. 15.: Esquema de tratamiento y desviaciones del protocolo.

## 2.9. ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

Se definió acontecimiento adverso a cualquier signo, síntoma o estado clínico indeseable que tuviera lugar durante el periodo de observación del Ensayo clínico. La existencia de un acontecimiento adverso no implica su relación con el fármaco administrado durante el estudio. Debido a que uno de los objetivos de este estudio es valorar la seguridad del fármaco en investigación, este aspecto debe ser cuidado de forma meticulosa.

En el caso de que un investigador detecte un acontecimiento adverso grave e inesperado, atribuible al fármaco en investigación, el promotor debe elaborar un informe y ponerse en contacto de inmediato con la AEMPS y CEIC.

Los acontecimientos adversos se clasifican en base a su relación de causalidad con el fármaco, de acuerdo con el Algoritmo de Karch y Lasagna (1977), como:

- Definitiva: Existe secuencia temporal razonable entre la administración del fármaco y la aparición del acontecimiento adverso, dicho acontecimiento coincide con las reacciones adversas descritas para el fármaco, mejora con la supresión del mismo y reaparece tras su readministración.
- Probable: Existe secuencia temporal razonable entre la administración del fármaco y la aparición del acontecimiento adverso, dicho acontecimiento coincide con las reacciones adversas descritas para el fármaco y no puede ser explicado por otras alternativas.
- Posible: Existe secuencia temporal razonable entre la administración del fármaco y la aparición del acontecimiento adverso, dicho acontecimiento coincide con las reacciones adversas descritas para el fármaco pero puede ser explicado por otras causas.
- Condicional o improbable: Existe secuencia temporal razonable entre la administración del fármaco y la aparición del acontecimiento adverso, dicho acontecimiento no coincide con las reacciones

adversas descritas para el fármaco y puede ser explicado por causas alternativas.

- No relacionada: No existe secuencia temporal razonable entre la administración del fármaco y la aparición del acontecimiento adverso, dicho acontecimiento no coincide con las reacciones adversas descritas para el fármaco y puede ser explicado por causas alternativas.

Las enfermedades/condiciones médicas que estuvieran presentes antes del inicio del estudio sólo se consideran acontecimientos adversos si empeoran tras el inicio del tratamiento.

Asimismo, los acontecimientos adversos pueden clasificarse en base a su intensidad como leves, moderados o graves.

Se considera acontecimiento adverso leve a aquellos que no causan limitación alguna para las actividades habituales ni requieren tratamiento adicional.

Son moderados aquellos acontecimientos adversos que generan cierta limitación para las actividades cotidianas y pueden o no obligar a tomar una actitud terapéutica adicional.

Se consideran acontecimientos adversos graves todos aquellos acontecimientos adversos con una relación posible o probable con la medicación y que cumplan algunos de los siguientes criterios:

- Son mortales o amenazan la vida de las pacientes
- Requieren hospitalización o una prolongación de la hospitalización ya existente.
- Causan incapacidad o invalidez permanente o significativa.
- Una sobredosis accidental o voluntaria.
- Un acontecimiento que ponga en evidencia una anomalía congénita o malformación del nacimiento o de un proceso maligno.

- Poseen relevancia clínica, pudiendo poner en peligro la vida de la paciente o pudiendo requerir intervención quirúrgica.

### **2.10. ESTUDIO DE CITOCINAS CIRCULANTES**

Previo a la intervención y durante el seguimiento de las pacientes se les realizó una extracción de 10cc de sangre periférica para un análisis de citocinas circulantes, y así poder comprobar si existía rechazo a las células madre. Las citocinas suponen una serie de mediadores solubles de carácter proteico que modulan las reacciones inmunológicas y la participación de otras células y sistemas durante la respuesta inmunitaria. Las citocinas que participan en la inmunidad natural conducen a las células efectoras de la inflamación, primordialmente macrófagos y linfocitos T citotóxicos, a reaccionar de forma inespecífica en la respuesta hacia un antígeno, con la participación nula o mínima de anticuerpos específicos.

En algunas enfermedades infecciosas y autoinmunes, resulta tan importante el balance entre las células Th1 y Th2 que se vislumbra su manipulación como parte del tratamiento de la enfermedad a corto plazo.

La parte más polimorfa de los individuos es el HLA, siendo estas proteínas fundamentales en el rechazo de los trasplantes. Hay interleucinas que pueden producir rechazo que generalmente termina activando los CD4 y CD8, dando lugar a necrosis tisular un rechazo de tipo agudo. Dependiendo del momento en el que se produzca podemos clasificar el rechazo en:

- Hiperagudo: Presencia de hemorragia y/o oclusión trombótica. Se produce en minutos, y es típica en la reacción por glucanos en grupos sanguíneos diferentes.
- Agudo: Lesión celular y parenquimatosa mediada por células T y macrófagos. Se genera a partir del tercer día tras el transplante y los anticuerpos producidos son específicos de cada tejido.
- Crónico: Aparición de fibrosis con pérdida de la arquitectura normal de la región del ímplate tisular. Se produce en torno a seis meses después



del trasplante y es mediada por la acción de los linfocitos CD4 que activan los macrófagos estimulando éstos a los fibroblastos.

La reacción inmunológica frente a las células extrañas está mediada por diferentes vías del sistema inmune. Para analizar estas reacciones inflamatorias producidas por el rechazo, podemos analizar el suero de los animales de experimentación y posteriormente en los pacientes a nivel de las citocinas circulantes:

- Citocinas mediadoras de la inmunidad natural: Interferon tipo I, TBF, IL-1, IL-6.

El Interferon gamma es producido por los linfocitos T y es un potente activador de los macrófagos, además de inducir la presentación de MHCII en la superficie de estos y de otras células a las que confiere la propiedad de presentar Ag.

La IL-1 se produce fundamentalmente por la APC y su acción más prominente es estimular la proliferación de linfocitos T previamente activados para reconocer el complejo MHCII-Ag. Es un mediador proinflamatorio, produce fiebre y estimula la producción hepática de proteínas de manera aguda. Induce asimismo la síntesis de prostaglandinas que modulan el tono y la permeabilidad vascular.

- Citocinas mediadoras de activación, crecimiento y diferenciación de linfocitos: IL-2, IL-4, TGF- $\beta$ .

La IL-2 es producida principalmente por los linfocitos CD 4+ una vez activados al reconocer en una APC el complejo MHCII-Ag, en presencia de IL-1. Se unen a su receptor específico en la membrana de la célula T CD4+ e induce la proliferación de más receptores y más células. El linfocito T no activado no es estimulado por la IL-2. Asimismo, la IL-2 es también fundamental para la generación de células T CD8+.

La IL-4 se produce por los linfocitos T CD4+. Inicia la proliferación de linfocitos B activados por el Ag (células plasmáticas). Ésta es la citocina fundamental de la respuesta humoral.

- Citocinas mediadoras de la inflamación inmune (específica): Interferón y, IL-5, IL-12.

Se realizó un análisis de las citocinas circulantes en plasma en las visitas V0, V1, V3 y en aquellas pacientes que precisaron dosis de rescate se realizó en las visitas V1bis y V3bis, con el fin de valorar la posible respuesta del organismo a la administración celular y descartar la presencia de fenómenos de rechazo.

### **3. RESULTADOS**



## 3.1. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

El tratamiento a estudio (producto alogénico de ASC procedentes de donantes sanos) se aplicó a todas las pacientes seleccionadas para el estudio siguiendo el protocolo establecido. No hubo incidencias relevantes.

## 3.2. ANÁLISIS DE SEGURIDAD

### 3.2.1. ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

Durante el desarrollo del Ensayo Clínico se realizó un seguimiento en profundidad de las pacientes participantes de acuerdo a lo establecido según la programación de visitas clínicas, así como un seguimiento telefónico.

De las 10 pacientes incluidas en el ensayo clínico, 5 presentaron brote de su enfermedad de Crohn precisando tratamiento con inmunomoduladores, siendo ésta condición criterio de exclusión del ensayo clínico, como se describe a continuación:

- Paciente A02: La paciente presentó brote de enfermedad de Crohn con empeoramiento de la clínica digestiva, entre las visitas V4bis y V5 bis. Precisó tratamiento con Humira, siendo excluida del ensayo. El trayecto fistuloso se mantuvo abierto, si bien, a lo largo del seguimiento, tuvo un periodo de 2 meses en los que permaneció cerrado.
- Paciente A03: La paciente presentó, entre las visitas V1bis y V2bis, empeoramiento de la enfermedad de Crohn con reagudización de la espondilitis anquilopoyética secundaria a las manifestaciones extraintestinales. Precisó tratamiento con Infliximab para el correcto control de la misma. La paciente presentó un trayecto fistuloso permeable, abierto.
- Paciente A06: La paciente presentó un brote de la enfermedad de Crohn en el periodo existente entre las visitas V5 y V6 precisando tratamiento médico con Imurel. A pesar del brote de enfermedad de Crohn, el trayecto fistuloso permaneció cerrado.

- Paciente A10: La paciente presentó brote de enfermedad de Crohn con empeoramiento de la sintomatología digestiva, tras la visita V4 y previa a la administración de la dosis de rescate de 40 millones de e-ASC, precisando tratamiento con Infliximab. Esta paciente presentó mejoría tras la primera dosis de tratamiento, aunque la fístula no presentó un cierre completo. La valoración clínica previa a la segunda dosis diagnosticó sintomatología digestiva y mal control de la enfermedad de Crohn de base, por lo que se remitió al Gastroenterólogo, quien pautó tratamiento biológico, por lo que no se aplicó la dosis de rescate.
- Paciente A11: La paciente presentó brote de enfermedad de Crohn con empeoramiento de las manifestaciones digestivas y osteoarticulares, precisando tratamiento con biológicos. La paciente presentó mejoría de la sintomatología de la fístula, si bien ésta permaneció abierta.

Dichos acontecimientos no se encontraban en relación con el tratamiento administrado, sino con la enfermedad de base de las pacientes, considerándose por tanto según el Algoritmo de Karch y Lasagna (1977), como condicionales o improbables, siendo de intensidad moderada.

#### **3.2.2. PACIENTES QUE FINALIZARON EL ESTUDIO**

De las diez pacientes incluidas en el estudio, cinco lo finalizaron, completando el protocolo del mismo. Las otras cinco pacientes no finalizaron el ensayo por presentar brote de su enfermedad de base.

#### **3.2.3. ANÁLISIS DE CITOCINAS**

Durante el estudio se analizaron las citocinas (IL 1B, IL 2, IL6, IL 10, IL 12, TNF a y IFN g) circulantes en plasma en las siguientes visitas:

- Previa a la administración del tratamiento: V0
- La primera semana tras el tratamiento: V1 y en las pacientes con dosis de rescate en V1 bis.
- La tercera semana tras el tratamiento: V3 y en las pacientes con dosis de rescate en V3 bis.

### 3. RESULTADOS

Los datos obtenidos se enumeran a continuación:

IL 2	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A10	A11
v0	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20
v1	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20
v3	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20
v1'	<1.20	<1.20		<1.20			<1.20	2.24		<1.20
v3'	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20			<1.20	<1.20		<1.20

Tabla 8.: Interleucina 2. Valores de referencia < 1.20 U/mL

IL06	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A10	A11
v0	<1.56	<1.56	5.38	<1.56	6.80	4.98	7.06	2.03	<1.56	2.91
v1	1.75	1.60	7.30	1.91	5.38	7.68	7.44	5.09	2.23	<1.56
v3	2.09	2.38	8.73	<1.56	4.02	6.46	8.14	2.03	1.60	<1.56
v1'	<1.56	1.85		<1.56			<1.56	2.18		2.13
v3'	<1.56	5.53	2.91	<1.56			<1.56	<1.56		<1.56

Tabla 9.: Interleucina 6. Valores de referencia < 14 pg/mL

	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A10	A11
v0	<19	<19	<19	<19	<19	<19	<19	<19	<19	<19
v1	<19	<19	<19	<19	<19	<19	<19	<19	<19	<19
v3	<19	<19	<19	<19	<19	<19	<19	<19	<19	<19
v1'	<19	<19		<19			<19	<19		<19
v3'	20	<19	<19	<19			<19	<19		<19

Tabla 10.: Interleucina 10. Valores de referencia < 19 pg/mL

### 3. RESULTADOS

	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A10	A11
v0	217	231	270	196	179	269	153	58	129	130
v1	230	203	339	158	163	240	141	85	168	232
v3	174	141	352	138	<17*	217	190	46	145	161
v1'	110	208		154			189	69.1		188
v3'	85.6	89.1	140	233			209	63.2		222

Tabla 11.: Interleucina 12. Valores de referencia 24-369 pg /mL

	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A10	A11
v0	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8
v1	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8
v3	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8
v1'	<16	<7.8		<7.8			<7.8	<7.8		<7.8
v3'	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8			<7.8	<7.8		<7.8

Tabla 12.: Factor de necrosis tumoral alfa. Valores de referencia <16pg / mL

	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A10	A11
v0	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	0.67
v1	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
v3	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0,50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
v1'	<0.50	<0.50		<0.50			<0.50	<0.50		1.36
v3'	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50			<0.50	<0.50		<0.50

Tabla 13.: Interferón gamma. Valores de referencia < 0.77 UI/mL



Con el fin de analizar los datos, los valores obtenidos fueron comparados con los valores de referencia para cada citocina analizada (IL 1B, IL 2, IL6, IL 10, IL 12, TNF a y IFN g) y con los valores obtenidos en la visita -1.

Se analizaron los datos mediante un test de Wilcoxon para estudios pareados. Ninguna paciente presentó cambios estadísticamente significativos a nivel de las citocinas en plasma tras recibir el tratamiento.

IL 6	V1 frente V0	P 0.139
	V3 frente V0	P 0.401
	V1bis frente V0	P 0.465
	V3 bis frente V0	P0.345
IL 12	V1 frente V0	P 0.575
	V3 frente V0	P 0.285
	V1bis frente V0	P 0.753
	V3 bis frente V0	P0.499

Tabla 14.: Análisis de citocinas

### 3.3. ANÁLISIS DE EFICACIA

#### 3.3.1. RESULTADOS CLÍNICOS

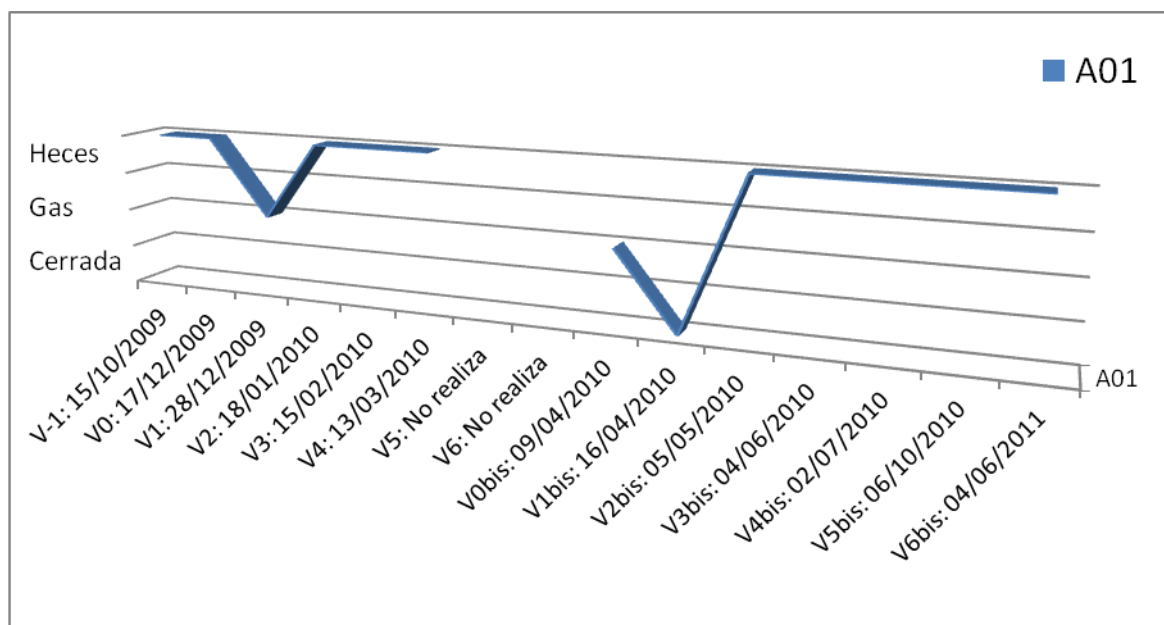
Tras la visita de evaluación 10 pacientes fueron incluidas en el estudio y seleccionadas para la inyección de la primera dosis de células. Estas pacientes fueron denominadas: A01, A02, A03, A04, A05, A06, A07, A08, A10, A11. La paciente A09 no recibió dosis de e-ASC siendo excluida del estudio antes de la administración del tratamiento.

Fig. 16.: Resultados clínicos.

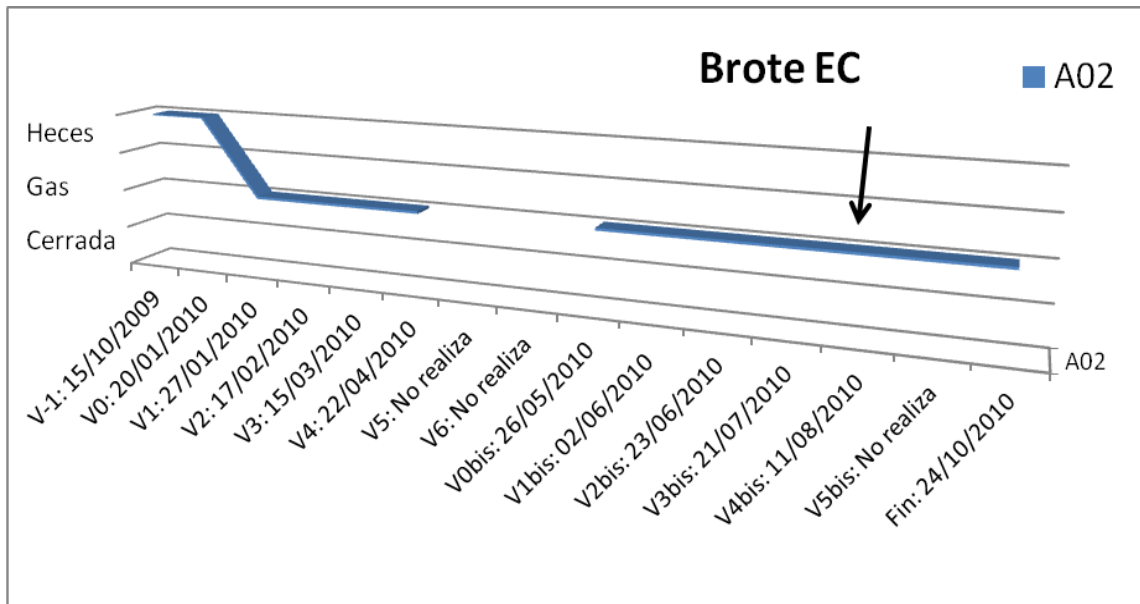
N: 10	Completan ensayo	No completan ensayo	Total
Cierre de la fístula	A04, A05, A08	A06	4 pacientes
No cierre de la fístula	A01, A07	A02, A03, A10, A11	6 pacientes
Total	5 pacientes	5 pacientes	10 pacientes

De las 5 pacientes que completaron el estudio, 3 de ellas presentaron un cierre completo mantenido en el tiempo de la fístula.

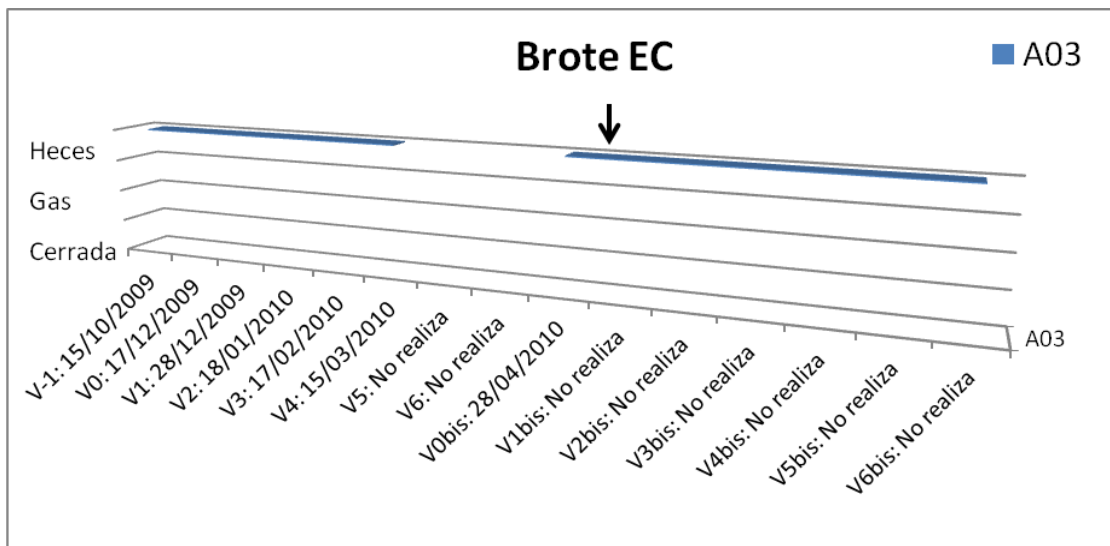
Fig. 17.: En función de la sintomatología presentada durante el seguimiento, podemos plasmar la sintomatología clínica en las siguientes gráficas:



**Paciente A01:** La paciente A01 presentaba en V-1, expulsión de heces de forma continuada por vagina, con un orificio fistuloso de 5mm de diámetro. Se administra una dosis inicial de e-ASC. Tras una mejoría inicial, es rescatada para una segunda dosis de e-ASC tras V4. Finaliza el ensayo con mejoría clínica, pero con emisión de heces entre 6 y 8 veces al día (no de forma continuada).

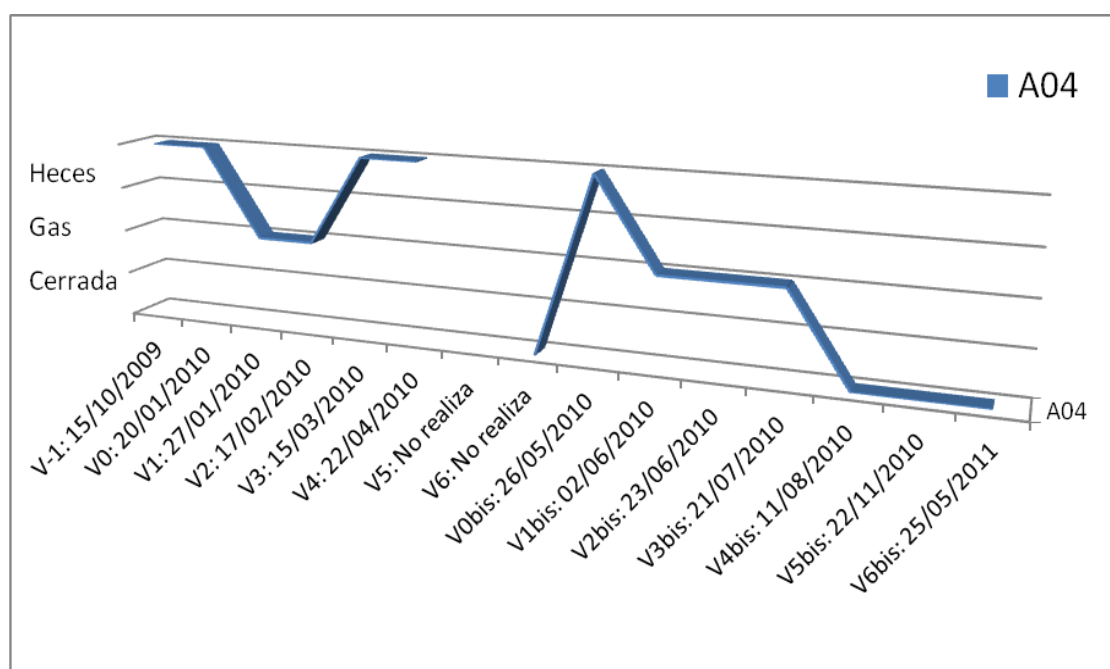


**Paciente A02:** En V-1 expulsión intermitente de heces por vagina, con orificio fistuloso de 2mm y dos trayectos. Se administra e-ASC con mejoría y dosis de rescate de e-ASC tras V4. Presenta brote de enfermedad de Crohn con entre V4bis y V5 bis, precisando tratamiento con Humira, saliendo del ensayo.



**Paciente A03:** En V-1 expulsión continua de heces por vagina, con orificio fistuloso de 20mm. Se administra e-ASC, con mejoría y disminución del tamaño del defecto, y posteriormente dosis de rescate de e-ASC. Precisa

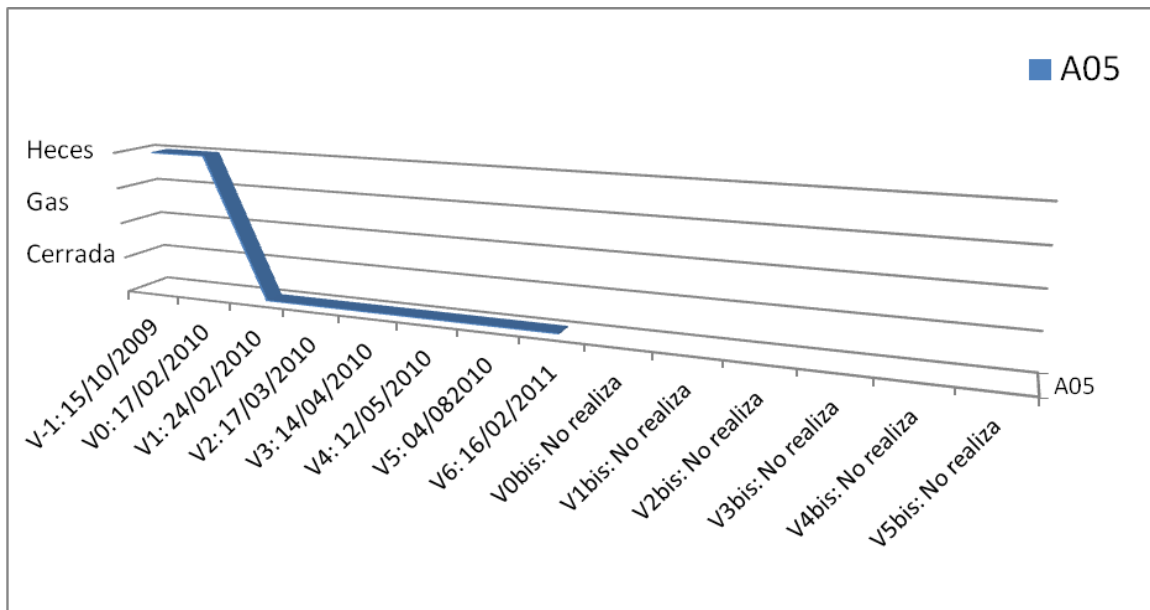
tratamiento con Infliximab tras V0bis por empeoramiento de espondilitis anquilopoyética, por lo que sale del ensayo clínico.



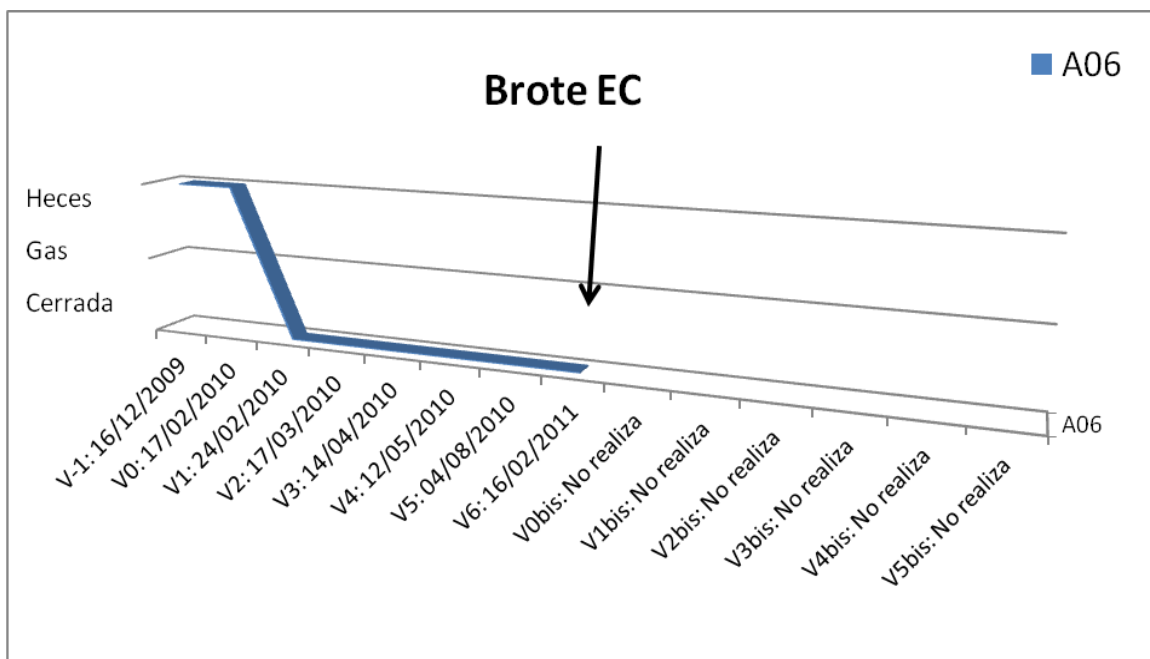
**Paciente A04:** En V-1 emisión de heces por vagina, con orificio fistuloso de 3mm. Tras e-ASC presenta mejoría transitoria con cese de la emisión de heces por vagina, que reaparece en V4, por lo que es reclutada para una dosis de rescate de e-ASC. En el momento de V0bis la paciente refiere emisión de heces por vagina. Durante la exploración en quirófano no se identifica orificio fistuloso, por lo que se procede a la inyección de 40 millones de e-ASC en el tabique rectovaginal, sin ninguna actitud quirúrgica adicional.

Durante el seguimiento la paciente presenta mejoría inicial con emisión de gas de forma diaria, y desaparición de la emisión de heces desde V1bis. Entre las visitas V3bis y V4 bis la paciente refiere desaparición por completo de la emisión de aire por vagina.

Presenta un absceso perianal en torno a la visita V5 bis, pero sin reaparición de la clínica fistulosa. Al finalizar el ensayo, la paciente refiere permanecer asintomática.

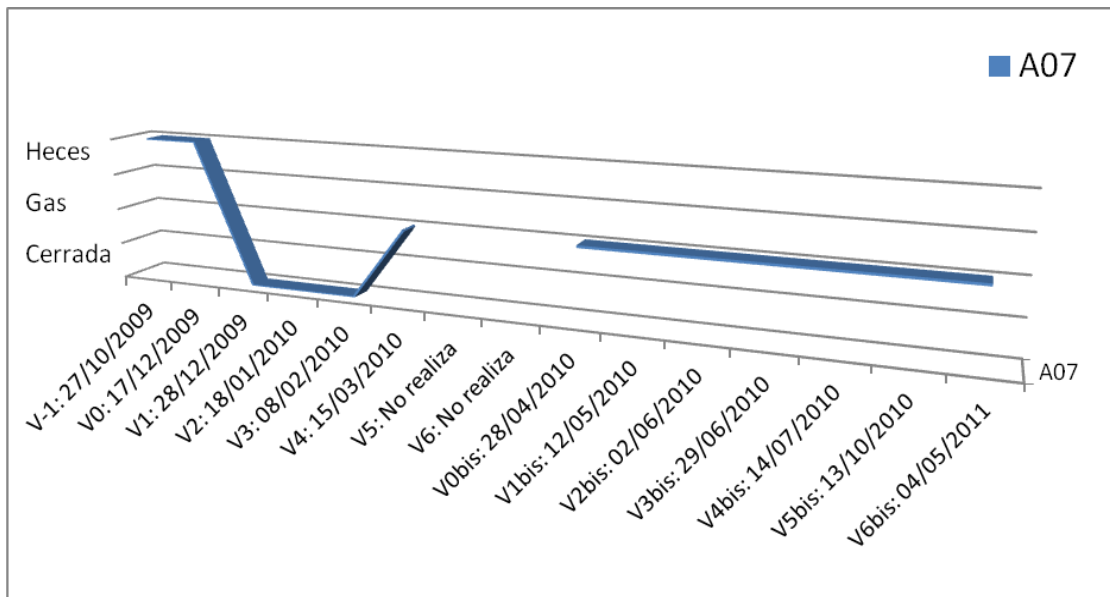


**Paciente A05:** Tras la administración de la primera dosis de e-ASC presenta desaparición de la clínica. Completa el ensayo clínico con fístula cerrada.

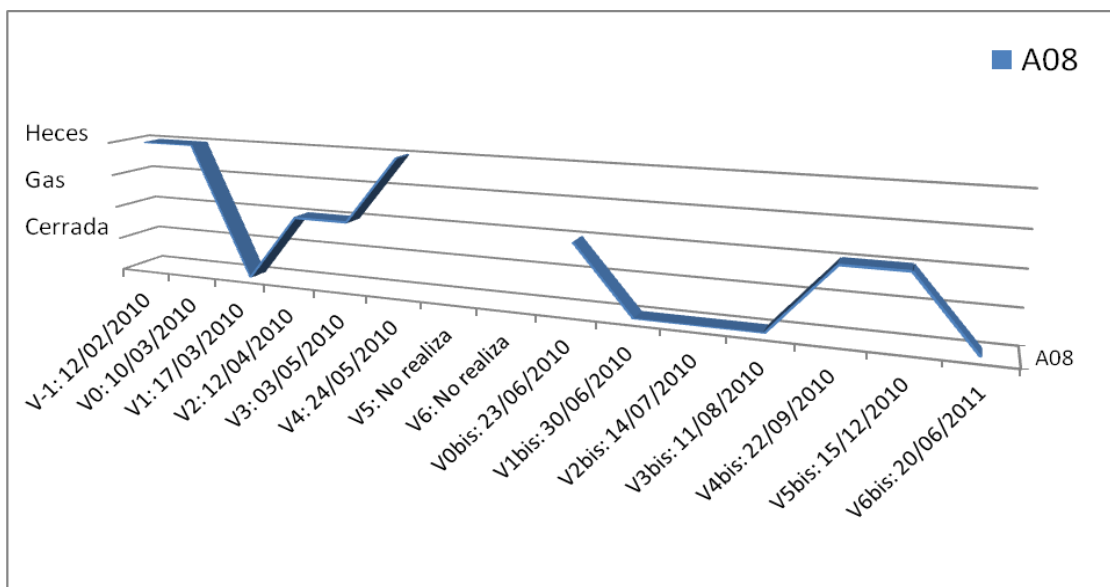


**Paciente A06:** Tras la primera dosis de e-ASC presenta mejoría y posterior desaparición de la clínica. Brote severo de Crohn entre V5 y V6 precisando tratamiento médico, por lo que sale del ensayo. A pesar del brote, el trayecto fistuloso permaneció cerrado.

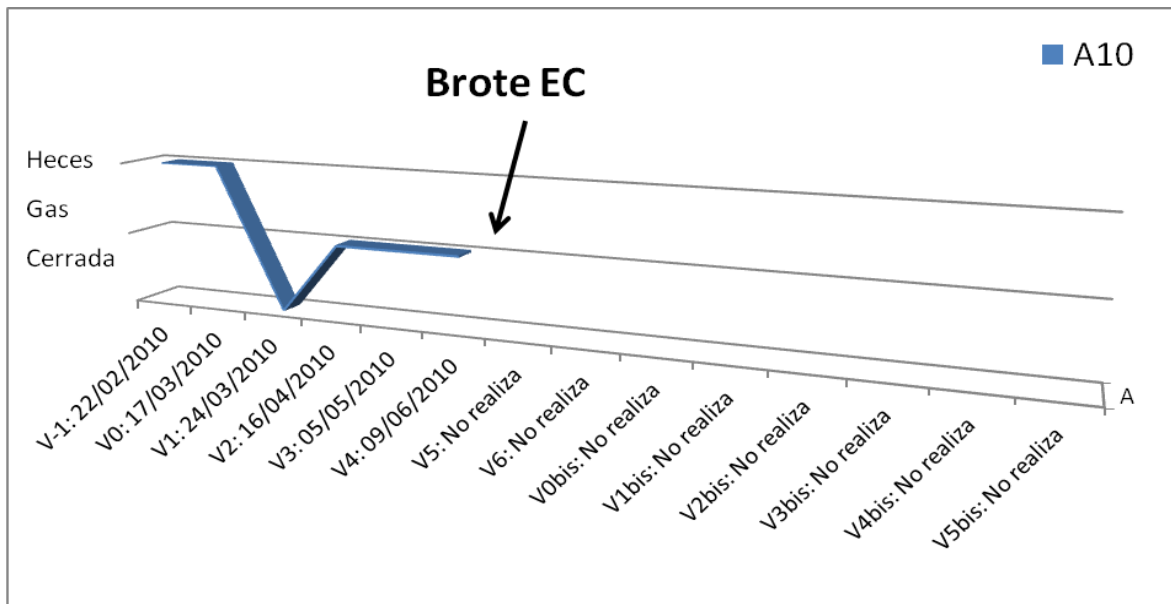
### 3. RESULTADOS



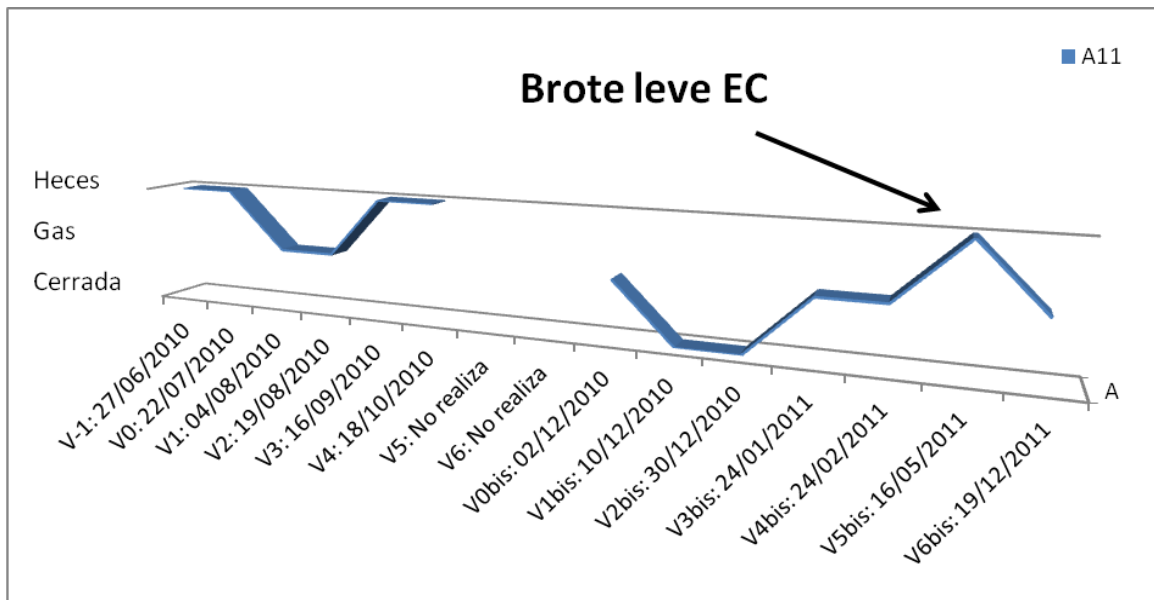
**Paciente A07:** Paciente con triple trayecto fistuloso en V-1 y emisión continua de heces por vagina. Tras e-ASC mejoría con cierre transitorio entre V2 y V4. Recibe segunda dosis de e-ASC. Finaliza el ensayo sin lograr cierre completo.



**Paciente A08:** Emisión continua de heces en V-1. Tras mejoría inicial es rescata para segunda dosis de e-ASC. Finaliza el ensayo clínico estando en V6bis asintomática.



**Paciente A10:** Emisión de gas y heces preoperatoria, con cierre fistuloso transitorio y posterior mejoría. Debido al mal control de la sintomatología digestiva, la paciente no es candidata de dosis de rescate, finalizando el ensayo clínico en V4.



**Paciente A11:** Emisión de heces preoperatoria con mejoría transitoria tras la primera dosis. Es rescatada para segunda dosis de e-ASC. Presenta un brote leve de su enfermedad de base en torno a la visita V5bis, criterio de exclusión del ensayo, con mejoría clínica pero persistencia de emisión de gas.

### 3.3.2. RESULTADOS DE LOS DIFERENTES TESTS APLICADOS

#### Test CDAI

No se encontraron cambios estadísticamente significativos en los valores de CDAI (ver Anexo 2), permaneciendo en todas las pacientes por debajo de 200 puntos. A continuación se desglosan dichos valores en dos periodos de tiempo, de V-1 a V4 y de V0 bis a V6 bis.

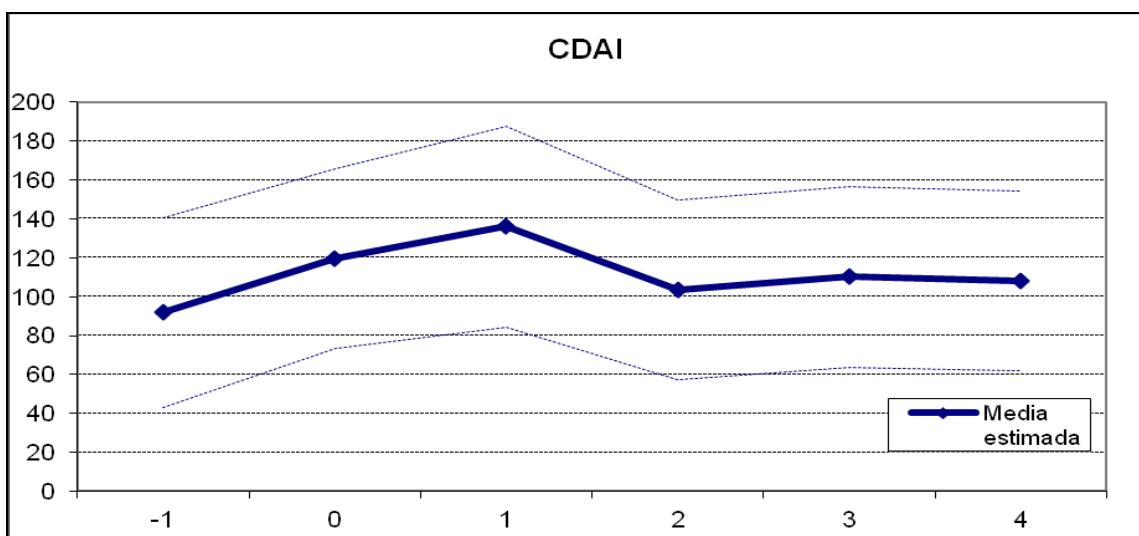


Fig. 18.: Test de CDAI. Valores medios e IC en las visitas V-1 a V4.

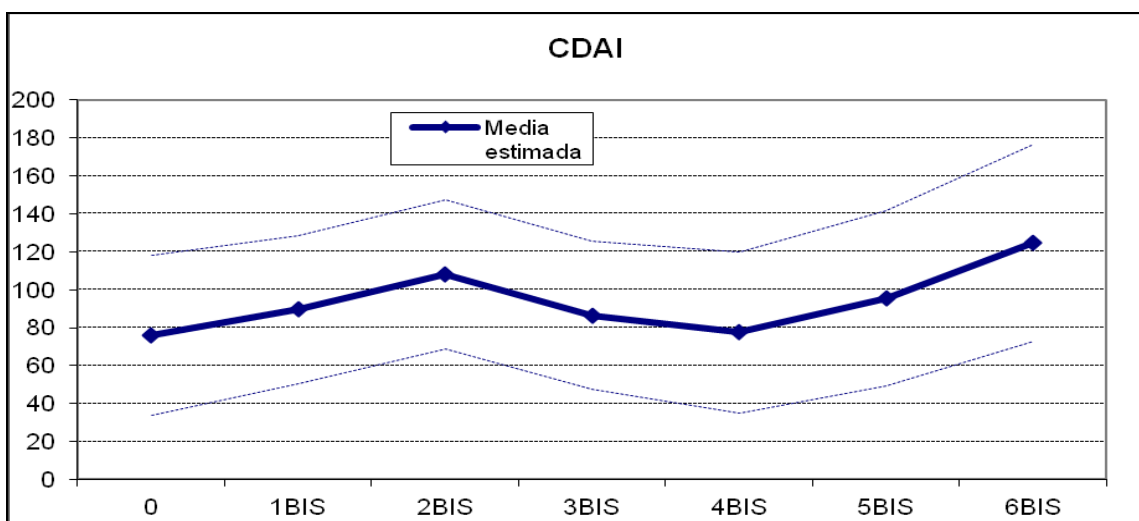


Fig. 19.: Test de CDAI. Valores medios e IV en las visitas V1bis a V6bis.



Si separamos las pacientes en dos grupos, pacientes con brote de EC durante el ensayo clínico frente a pacientes sin brote, encontramos que las diferencias entre ambos grupos no son estadísticamente significativas.

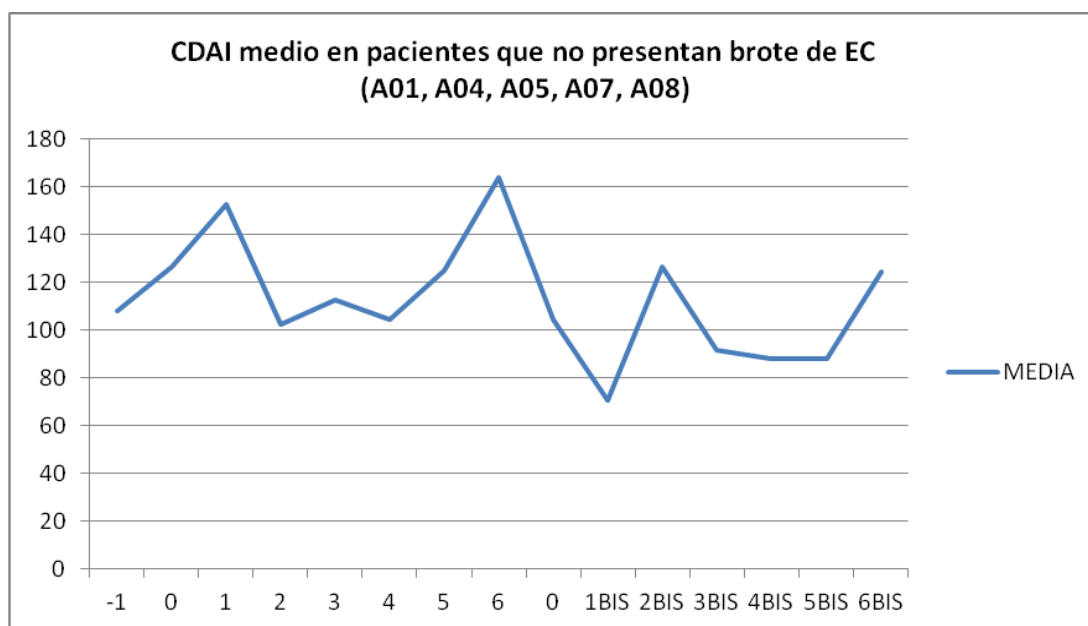


Fig. 20.: Valores medios de CDAI en pacientes que no presentan brote de EC a lo largo del ensayo clínico.

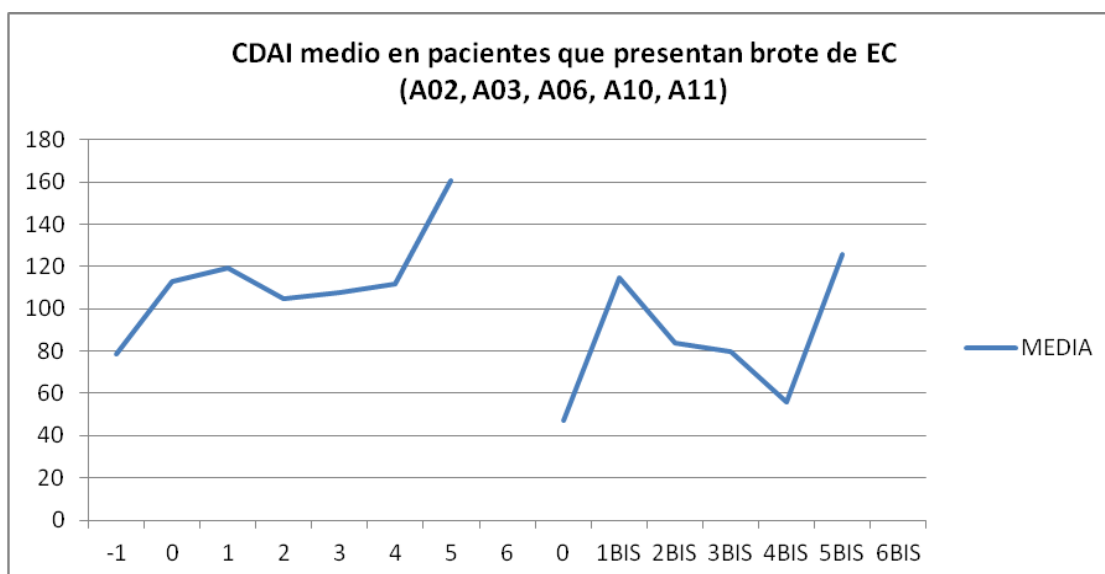


Fig. 21.: Valores medios del CDAI en pacientes que presentan brote de EC a lo largo del ensayo clínico.

**Test PDAI**

Los datos obtenidos en el test PDAI reflejan el índice de actividad de la fístula (ver Anexo 3). Respecto a los valores del PDAI, las pacientes presentaron cierta tendencia negativa a lo largo del ensayo, con un comportamiento medio decreciente, lo que marca la positividad del tratamiento. Dichos valores sufren un repunte en la visita 6 bis, especialmente debido a una tendencia creciente de la paciente A07.

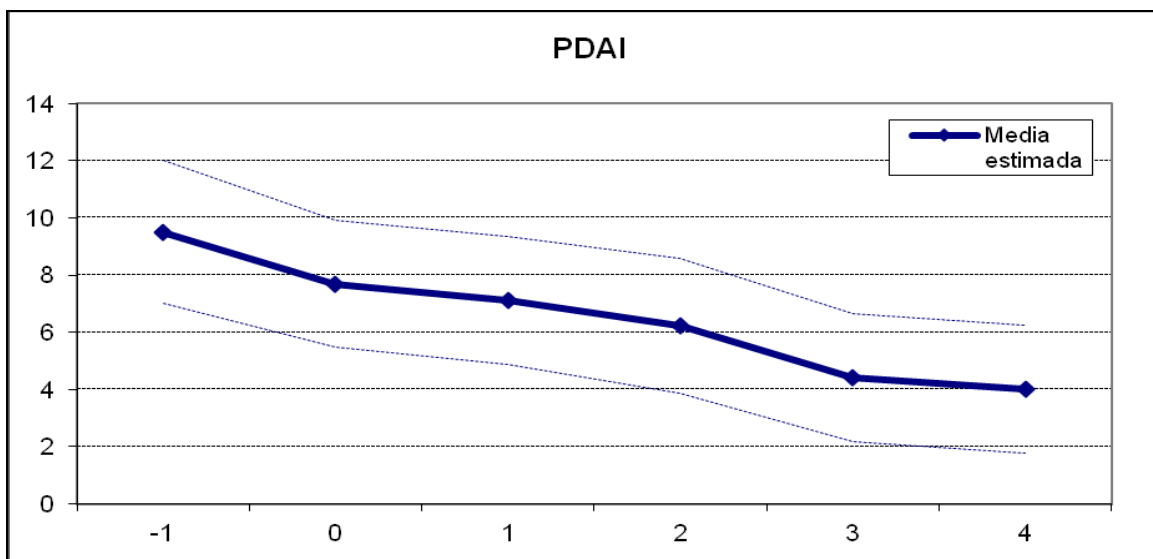


Fig. 22.: Test de PDAI. Valores medios e IC de V-1 a V4.

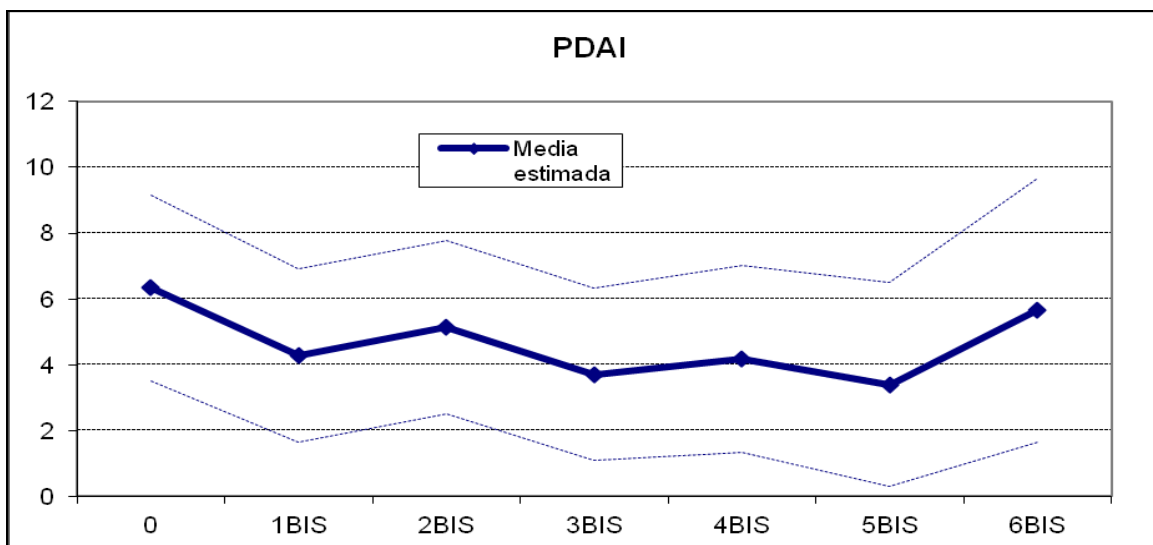


Fig. 23.: Test de PDAI. Valores medios e IC de V1bis a V6bis.

Si desglosamos las pacientes en dos grupos, comparando los valores PDAI de pacientes con cierre de fístula al final del ensayo frente a aquellas en las que no se logra el cierre, observamos una respuesta favorable en las pacientes con cierre fistuloso frente a aquellas que no presentan cierre.

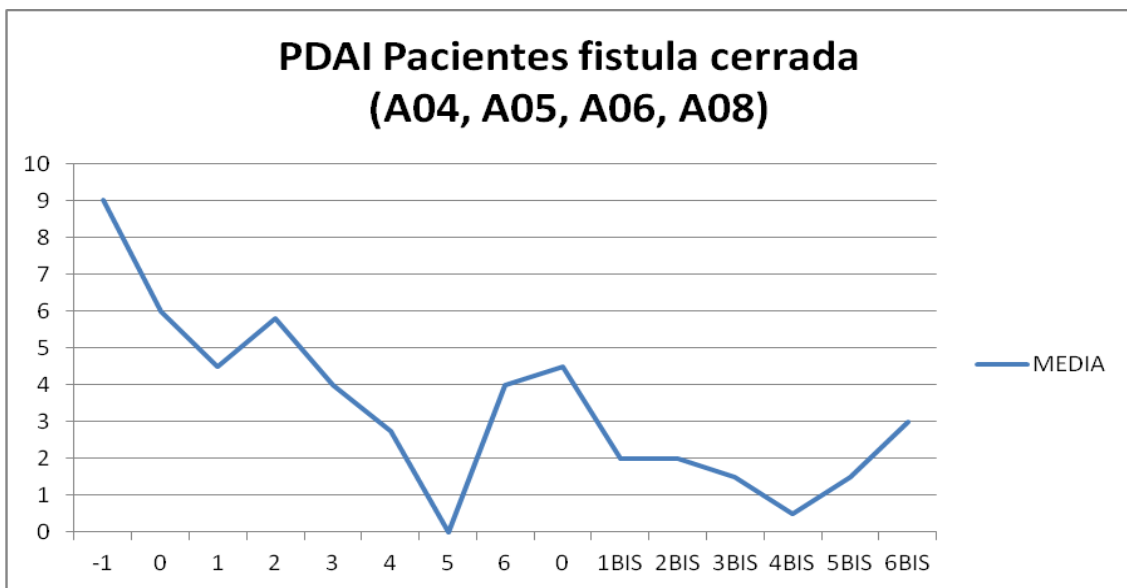


Fig. 24.: Valores medios de PDAI en pacientes que logran cierre.

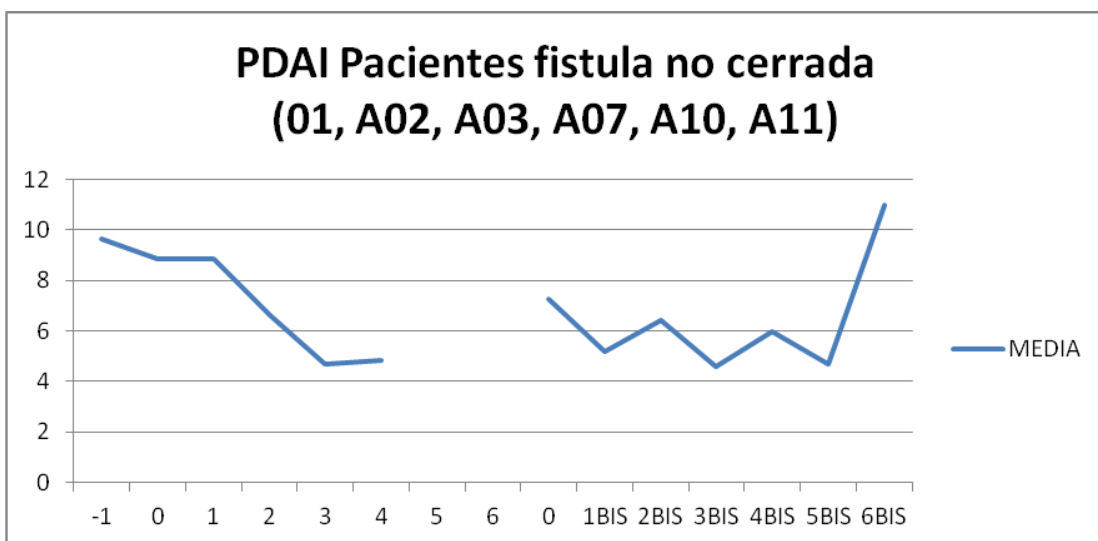


Fig. 25.: Valores medios de PDAI en pacientes que no logran cierre.

**Test de WEXNER**

La gráfica representa los valores de Wexner a lo largo del seguimiento, que refleja la incontinencia anal (ver Anexo 6). Las pacientes no presentaron incontinencia anal postoperatoria o empeoramiento de la misma (en los casos presente en el momento del diagnóstico), ni en el postoperatorio inmediato ni durante el seguimiento. Las tablas adjuntas describen los resultados obtenidos en el test de Wexner tras la primera dosis y tras la dosis de rescate.

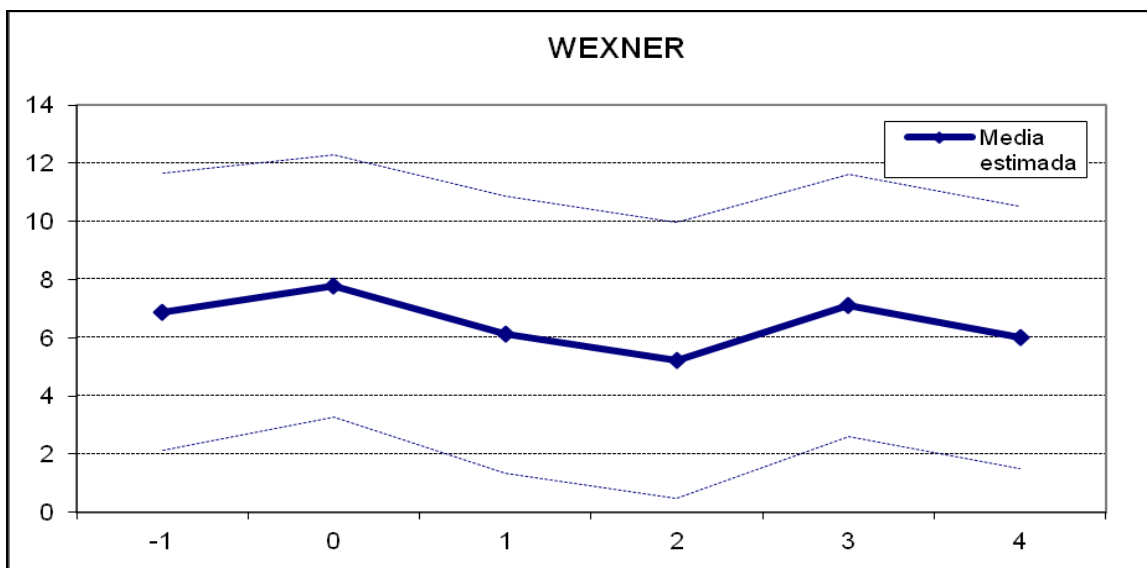


Fig. 26.: Test de Wexner. Valores medios e IC de V-1 a V4.

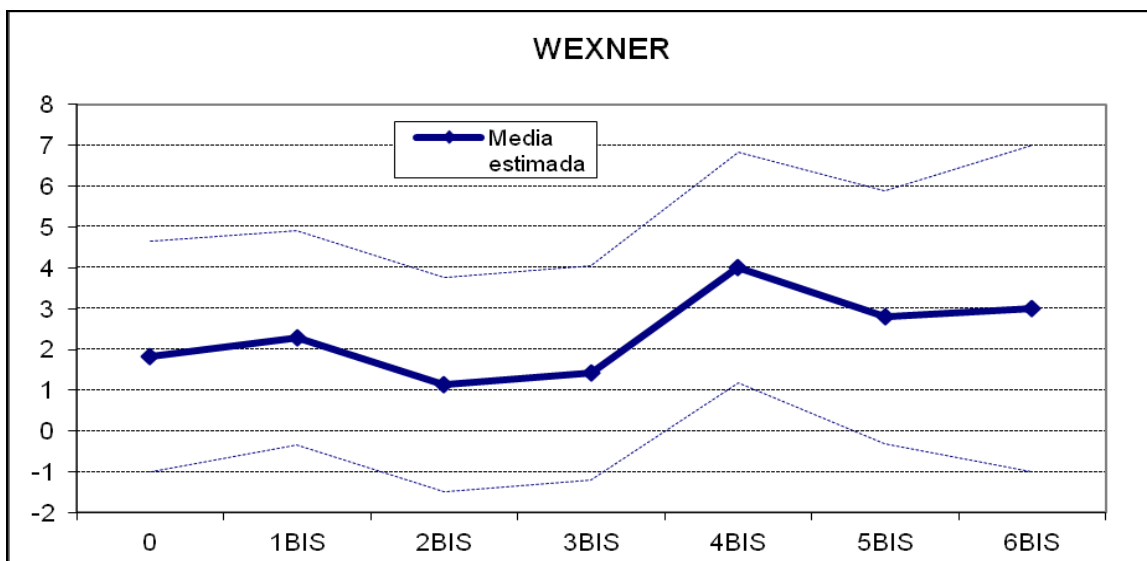


Fig. 27.: Test de Wexner. Valores medios e IC de V1bis a V6bis.

**Test de SF-36**

El cuestionario SF 36 indica a nivel global la percepción del paciente de su estado de salud (ver Anexo 12). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes que logran un cierre completo de la fístula frente al grupo de pacientes que no logran un cierre.

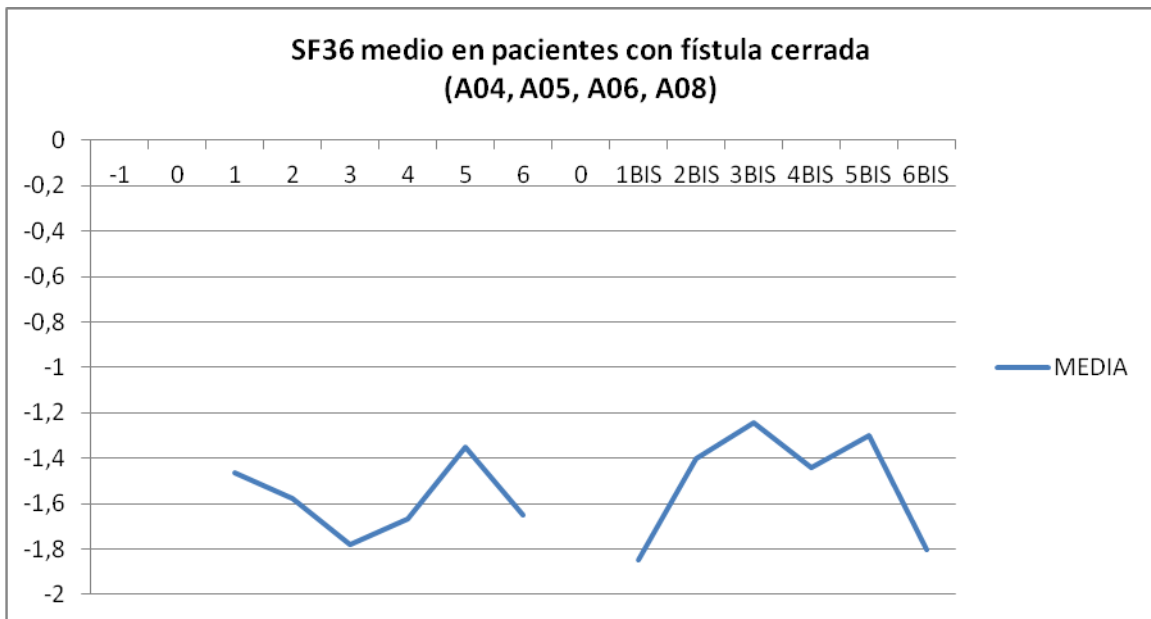


Fig. 28.: Media SF 36 en pacientes con fístula cerrada.

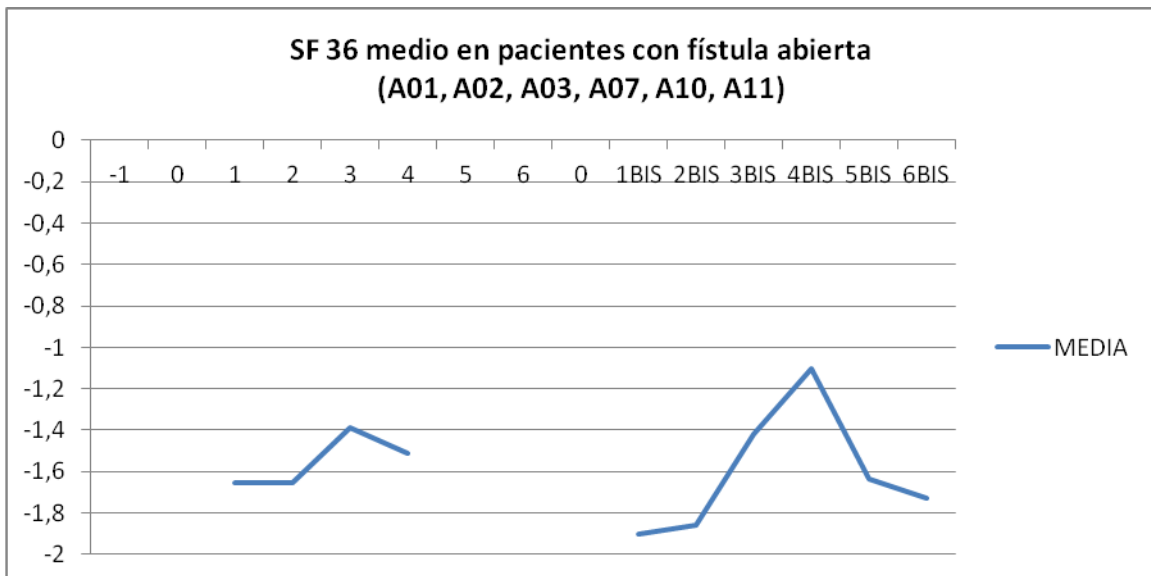


Fig. 29.: Media SF 36 en pacientes con fístula abierta.



## **4. DISCUSIÓN**





## **4.1. ENSAYOS CLÍNICOS REALIZADOS CON TERAPIA CELULAR EN EL TRATAMIENTO DE LA FÍSTULA RECTOVAGINAL EN ENFERMEDAD DE CROHN.**

Como hemos comentado anteriormente, el tratamiento de la fístula rectovaginal en pacientes con enfermedad de Crohn supone un importante reto para cualquier coloproctólogo experimentado y para cualquier profesional médico en general. Existen numerosas técnicas descritas para el tratamiento de esta patología, si bien ninguna ha demostrado resultados alentadores.

Existen numerosos trabajos publicados en la literatura sobre la capacidad de las células madre tanto autólogas como alogénicas en el tratamiento de diferentes patologías. Por lo que respecta al tratamiento de la fístula perianal, cabe resaltar el trabajo publicado por el Dr. De la Portilla que describe el uso de e-ASC alogénicas en el tratamiento de las fístulas perianales complejas (excluyendo fístulas rectovaginales), en a un ensayo I-IIA multicéntrico que incluyó a 24 pacientes con fístula perianal compleja en las que se procedió a la administración de 20 millones de ASC realizando un seguimiento de 6 meses posterior al implante. De los 24 pacientes incluidos, el 69,2% presentaron mejoría de la clínica fistulosa, con un cierre completo del 56,3%, y un 30% de los pacientes con cierre completo mantenido en el tiempo. No se encontraron reacciones adversas a dicho tratamiento (134).

Concretamente, en el momento en el que se planteó nuestro ensayo clínico, no existían estudios publicados en la literatura ni registrados en [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) sobre el uso alogénico de e-ASC en el tratamiento de las fístulas rectovaginales.

Dado que el tratamiento con e-ASC autólogo ha demostrado ser seguro y eficaz en el tratamiento de la patología fistulosa, y dado que el uso de células madre alogénicas se está aplicando en otros campos (especialmente en el trasplante de médula ósea), nuestro grupo decidió proyectar una nueva línea

de investigación con el fin de valorar la factibilidad y seguridad de las e-ASC en el tratamiento de las fístulas perianales.

De acuerdo con la Ley General de Sanidad, la Ley de Garantías y el Uso Racional de los Medicamentos y Productos Sanitarios y según el RD 561/1993 y el RD 223/2004 nuestro grupo diseñó un ensayo clínico fase I-IIa en un grupo de 10 pacientes.

Dicho ensayo clínico se rige desde el punto de vista ético por La declaración Universal de los Derechos Humanos de 1948, el Código de Nuremberg de 1949, la Declaración de Helsinki (Anexo 11) y el convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano (BOE 11 Noviembre 199) y ha sido aprobado por el Comité de Ética (Anexo 7 y 8).

Todas las pacientes incluidas en el ensayo clínico fueron citadas para una visita de preevaluación en las que se les informó detalladamente del tratamiento a aplicar, recibieron una hoja de información y firmaron un consentimiento informado referente al mismo (Anexo 9).

El ensayo clínico fue registrado en [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) recibiendo el número identificativo NCT00999115 y fue autorizado por la Agencia Española del Medicamento.

El diseño de los criterios de inclusión buscaba el encontrar una muestra de pacientes que pudieran beneficiarse del tratamiento (pacientes con fístula rectovaginal secundaria a enfermedad de Crohn) tras haber presentado fracasos terapéuticos previos (al menos una cirugía previa sobre la fístula perianal).

De acuerdo con las Autoridades Regulatorias, dado que el producto celular era de origen alogénico, asumieron indispensable el suspender el uso de tratamientos inmunomoduladores con el fin por un lado de poder analizar posibles reacciones inmunológicas a la administración del fármaco y por otro lado para evitar que dichos tratamientos pudieran enmascarar el efecto del

producto celular. También se temió que dicho uso pudiera dar lugar a un crecimiento celular descontrolado.

El hecho de interrumpir el tratamiento con inmunomoduladores en pacientes de esta complejidad terapéutica, con enfermedad de Crohn de larga evolución (11,6 años de evolución de media) planteó serias dificultades a lo largo del estudio, dado que las pacientes presentaron mal control de su enfermedad a nivel digestivo y sistémico, y fue motivo de exclusión del ensayo clínico a lo largo del mismo en 5 de las 10 pacientes. A pesar de todo, en todas las pacientes se mantuvo el calendario de visitas diseñado en el ensayo, con el fin de completar el seguimiento clínico tras 52 semanas de la administración del tratamiento.

A día de hoy (Enero 2013), tres años después del comienzo de nuestro ensayo clínico, siguen sin existir resultados publicados en la literatura ni registrados en [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) que describan el uso de e-ASC de origen alogénico en pacientes con fístula rectovaginal. Confiamos que los resultados sirvan de impulso para futuros ensayos clínicos y que pueda contribuir al crecimiento y desarrollo de otros grupos que siguen una línea de investigación similar a la nuestra.

## **4.2. ANÁLISIS DE RESULTADOS.**

Se incluyeron 10 pacientes en nuestro ensayo clínico, con una media de edad de 35 años y una media de 11,6 años de evolución de enfermedad de Crohn. Todas las pacientes incluidas en el ensayo clínico habían sido sometidas a cirugías previas sin lograr un cierre de la fístula rectovaginal, con una media de 1,8 cirugías previas (1-4) y presentaban un diámetro del orificio rectal de 4.8mm de media (2-20mm).

Se realizó un total de 17 implantes en las 10 pacientes incluidas en el estudio. Todas las pacientes completaron el seguimiento según el calendario

previsto (52 semanas tras el último implante celular), fuesen o no excluidas durante el desarrollo del ensayo.

De las 10 pacientes, 5 de ellas completaron el ensayo clínico, siendo las otras 5 excluidas del mismo por los siguientes motivos: brote digestivo de la enfermedad de Crohn que precisó tratamiento con inmunomoduladores en 4 pacientes y manifestaciones extraintestinales (empeoramiento de espondilitis anquilopoyética de larga evolución, que se tornó invalidante) que precisó tratamiento con Infliximab en 1 paciente.

Los objetivos del ensayo clínico eran obtener datos sobre la factibilidad, seguridad y eficacia del tratamiento autólogo. Respecto al análisis de factibilidad el tratamiento a estudio se aplicó a las 10 pacientes incluidas en el ensayo, y no se encontraron dificultades técnicas durante dicha aplicación. La inyección de e-ASC se realizó en quirófano, asociándose a plastia rectal en 2 pacientes, plastia vaginal en 5 pacientes, doble plasta en 1 paciente, cierre simple en 1 paciente y reconstrucción vaginal en 1 paciente.

Respecto al análisis de seguridad, ninguna paciente mostró reacción local en el lugar del implante ni a nivel sistémico, ni en el momento de la aplicación ni durante el periodo de seguimiento. Se realizaron análisis de las citocinas circulantes en plasma (IL 1B, IL 2, IL6, IL 10, IL 12, TNF a y IFN g) en todas las pacientes en las visitas V0, V1 y V1 bis (en las pacientes en que recibieron dosis de rescate) y en V3 y V3 bis (en aquellas con dosis de rescate). No se encontraron alteraciones en los niveles de dichas citocinas.

En el apartado de análisis de seguridad, cabe destacar que la paciente A06 fue excluida del ensayo tras la visita V5, por brote de la enfermedad de Crohn que precisó tratamiento inmunomodulador. Posterior a dicho brote la paciente nos comunicó estar embarazada. Dicho embarazo transcurrió sin incidencias y en el parto alumbró un recién nacido sano, sin ningún tipo de malformación ni enfermedad. No es el primer caso documentado de embarazo y parto sin incidencias tras la aplicación perianal de e-ASC, dado que la

primera paciente en la que se aplicaron e-ASC presentó un embarazo y parto normales tras el tratamiento con células madre (80).

Respecto al análisis de eficacia conviene resaltar que todas las pacientes presentaron mejoría clínica, alcanzándose el cierre completo mantenido en 3 pacientes (A04, A05, A08) de las 5 que completaron el ensayo clínico. En ninguna paciente se realizó colostomía o ileostomía a pesar de que muchos autores defienden su realización (52)(53) y en todas las pacientes se mantuvo una integridad esfinteriana, obteniendo resultados en la escala de Wexner similar a los preoperatorios (ver figura 24, 25 y 26), a pesar de realizar colgajos de avance.

El análisis del índice CDAI no mostró cambios significativos entre las visitas V-1 y V4, ni durante la segunda parte del ensayo, permaneciendo en todas las pacientes por debajo de 200, si bien muestra un repunte estadísticamente no significativo entre V5bis y V6bis, probablemente debido al abandono de la terapia inmunomoduladora.

Respecto al análisis de los valores del índice PDAI, que refleja la sintomatología perianal, las pacientes presentaron cierta tendencia negativa a lo largo del ensayo, con un comportamiento medio decreciente, lo que marca la positividad del tratamiento. Dichos valores sufren un repunte en la visita 6 bis, especialmente debido a una tendencia creciente de la paciente A07.

Respecto al análisis de cuestionarios de calidad de vida, el análisis de datos correspondiente al SF-36 no presentó diferencias estadísticamente significativas, comparado la visita V-1 con las posteriores al implante celular. Este cuestionario analiza de forma global la percepción del paciente en diferentes ámbitos de su calidad de vida, por lo que a pesar de que todas las pacientes refirieron mejoría de la sintomatología perianal, el hecho de que 5 pacientes presentasen difícil control de su enfermedad de base, da lugar a un mantenimiento del resultado global.

Por tanto, podemos concluir que se han alcanzado todos los objetivos planteados en el ensayo clínico.

### **4.3. LA FÍSTULA RECTOVAGINAL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN ¿PUEDE LA TERAPIA CELULAR AYUDAR A SU CURACIÓN?**

La enfermedad de Crohn supone la segunda causa de fístula rectovaginal tras la patología gineco-obstétrica (6)(7)(8)(9). El riesgo de desarrollar fístulas perianales supone alrededor de un 50% a partir de los 20 años de edad, de las cuales, en torno a un 9% pueden ser fístulas rectovaginales, aumentando esta incidencia a mayor afectación digestiva distal de la enfermedad de Crohn. En un porcentaje importante de los pacientes (20-30%), las fístulas perianales son la primera manifestación de la enfermedad.

El tratamiento de la fístula rectovaginal secundaria a enfermedad de Crohn supone un importante trastorno para los pacientes y un auténtico reto para los más experimentados Coloproctólogos. A pesar de los diferentes avances en el campo de la proctología (75)(76)(77)(78)(79) y la aparición de arsenal terapéutico, hoy en día no existe una técnica que haya demostrado una clara supremacía en el tratamiento de esta patología. Existen numerosas técnicas quirúrgicas acompañadas de un importante número de fármacos que intentan minimizar la sintomatología y lograr el cierre fistuloso, si bien, los resultados obtenidos son en ocasiones desalentadores (11)(20)(21)(22)(23)(26)(27).

### **4.3.1. Tratamiento médico de la FRV en la enfermedad de Crohn**

Existen múltiples opciones terapéuticas en la enfermedad de Crohn perianal, que globalmente podemos dividir en antibióticos, Mercaptopurina o Azatioprina, Ciclosporina, Tacrolimus e Infliximab. La mayor parte de estos tratamientos poseen un papel limitado en la enfermedad de Crohn fistulosa, especialmente en los casos de fistula rectovaginal. Su uso debe valorarse combinadamente con las diferentes opciones quirúrgicas, con el fin de optimizar los resultados y lograr un mejor control de la enfermedad de base, con el fin de evitar la sepsis perianal y lograr resultados positivos a largo plazo.

La mayoría de los pacientes consigue la remisión clínica de la enfermedad de Crohn digestiva con los llamados fármacos de primera línea, entre los que se incluyen los antibióticos (57)(58)(59)(60)(61), los corticoides (62)(63) y los aminosalicilatos. Sin embargo, existen determinadas situaciones que requieren fármacos de segunda línea, como la Azatioprina (90)(91), la Ciclosporina (92)(93)(94), el Tacrolimus (95) o los anti- TNF (64)(96-111) . Estas situaciones engloban la refractariedad al tratamiento de primera línea, la corticodependencia o, lo que es lo mismo, la necesidad prácticamente continuada de esteroides para mantener la remisión.

La mayor parte de estos fármacos controlan la sintomatología digestiva, controlan la aparición de la sepsis y reducen el débito fistuloso. Prácticamente ninguno de estos tratamientos logra un cierre completo del trayecto fistuloso y por lo general, la sintomatología reaparece tras el cese del tratamiento médico.

### **4.3.2. Tratamiento quirúrgico de la FRV en la enfermedad de Crohn**

Dado que la Enfermedad de Crohn supone un trastorno crónico y recidivante, hasta el 80% de los pacientes precisarán cirugía en algún momento de su vida. Los objetivos del tratamiento quirúrgico de la enfermedad de Crohn fistulizante perianal son el cierre de la fístula a corto y largo plazo, reducir el número de infecciones y procesos sépticos de origen perianal, evitar el daño esfinteriano y la consiguiente incontinencia y realizar el mínimo indispensable número de cirugías. Por lo general la fistulotomía no suele estar indicada, puesto que en su mayor parte se trata de trayectos fistulosos complejos, altos y ramificados. Existen multitud de técnicas descritas, si bien ninguna ha demostrado una clara superioridad (20)(32)(33)(34)(30)(31)(35)(36)(38-50)(54)(65)(66).

Para fistulas más alta o complejas tendremos que valorar la realización de un colgajo de avance rectal o vaginal, de espesor completo, base ancha y vascularización preservada. Los colgajos deben realizarse exclusivamente en aquellos casos sin afectación rectal, puesto que suelen fracasar en pacientes con proctitis activa, por lo que en la mayor parte de los trabajos estas pacientes son excluidas, evitándose dichos colgajos en casos de proctitis activa. Por el contrario, las pacientes seleccionadas para nuestro ensayo clínico presentaban proctitis en el momento de la inclusión, de hecho, no se pudo realizar colgajo rectal en muchas de ellas, por la actividad inflamatoria presente en el momento de la intervención, precisando la realización de colgajo vaginal en parte de las pacientes. La tasa de éxito varía entre el 29 y el 100% de los casos, en función de las series (como se adjunta en la tabla descrita a continuación). Esta amplia discrepancia se debe tanto a las diferencias técnicas como a la selección de las pacientes. Las complicaciones más frecuentes son la formación de hematomas en el tabique rectovaginal, abscesos o la dehiscencia de la sutura y otras con menor frecuencia como fiebre, dolor o infección urinaria (29)(54)(74).



Autores	Pacientes/ Reparación	Procedimiento	Curación (%) inicial/final	Recurrencia (%)
Joo et al 1998	20	Flap rectal	-/75	
Windsor et al 2000	13/21	Cierre simple	40/77	54
Athanasiadis et al 2007	37/56	Varios	51/73	
	-/20	Abordaje transanal	70	
	-/15	Cierre simple	73	
	-/14	Flap anocutáneo	86	
	-/7	Flap de avance	29	30
Ruffolo et al 2009	52/71	Varios	56/81	
	-/36	Flap rectal	56	
	-/23	Flap vaginal	57	10

Tabla 15.: Resultados de las diferentes técnicas empleadas en fistula rectovaginal secundaria a enfermedad de Crohn (54).

No existen diferencias significativas entre la realización de un flap rectal o vaginal, siendo la técnica y los principios quirúrgicos empleados muy similares. En algunos pacientes pueden asociarse ambas técnicas, especialmente en pacientes con el grosor del tabique rectovaginal conservado y que no presenten otras lesiones asociadas ni zonas de debilidad ni inflamación del mismo. Como decimos, los resultados son muy similares con ambos colgajos. Por lo general existe más experiencia en la realización de colgajos rectales, dado que este tipo de reparaciones por lo general la realizan cirujanos Coloproctólogos. (28)(29)

Todos estos factores, hacen que en ocasiones se plantee la realización de un estoma con el fin de aislar el tracto fistuloso(51)(52)(53). En nuestro grupo, intentamos evitar la realización de colostomías exceptuando los casos de sepsis perianal que puedan poner en peligro la vida de la paciente. A pesar del complicado abordaje de esta patología, nosotros abogamos por el abordaje

perianal de la misma, intentando evitar el realizar estomas, tanto temporales como definitivos.

### **4.3.3. La terapia celular en el tratamiento de la fístula rectovaginal secundaria a enfermedad de Crohn**

La terapia celular supone un tratamiento novedoso que ha demostrado ser seguro y eficaz en el tratamiento de la patología fistulosa. El proceso de cicatrización depende de la capacidad de respuesta del organismo a la agresión sufrida, y su resultado y la capacidad de regeneración pueden verse influenciadas por la gravedad de la lesión y la capacidad de respuesta de los tejidos dañados. El proceso de regeneración implica un amplio número de mediadores inflamatorios que se suceden de forma simultánea durante las fases de cicatrización (fase inflamatoria, fase proliferativa, epitelización y fase de maduración). Los pacientes con enfermedad de Crohn poseen una respuesta alterada a los mecanismos inflamatorios dado el desequilibrio entre la producción local de citocinas proinflamatorias a nivel de la mucosa, que da lugar a una afectación transmural discontinua del tracto digestivo.

Existe un amplio número de trabajos en la literatura que ha demostrado la capacidad de las ASC de origen murino y humano de reparar daños tisulares in vivo (84)(112)(135)(136). Se ha comprobado que en modelos animales de inflamación, las ASC son capaces de disminuir el proceso inflamatorio así como controlar la respuesta de los linfocitos T (82)(85)(113). Las ASC poseen capacidad de diferenciación, con escasa inmunogenicidad y capacidad de modular la respuesta inflamatoria. Si bien el mecanismo molecular se desconoce con exactitud, sabemos que su uso en tejidos adultos da lugar a la reparación tisular así como a la regeneración de las células dañadas. Asimismo, se ha comprobado la capacidad local de estimulación tisular promoviendo entre otros la neovascularización de los tejidos dañados (135).

Los datos publicados en la literatura, así como nuestra experiencia in vitro y los estudios en animales (87), nos llevaron al diseño y ejecución de

ensayos clínicos en fase I (81), II (86) y III (121) empleando células madre autólogas en el tratamiento de la patología fistulosa (80)(83)(88)(89). El primer caso publicado por nuestro grupo correspondió a una paciente con fístula rectovaginal, una mujer de 33 años de edad con enfermedad de Crohn de 11 años de evolución, con una fístula rectovaginal de 1cm de diámetro. En dicha paciente se procedió a la administración de 9 millones de células madre autólogas derivadas de lipoaspirado. Tras 3 meses de seguimiento la paciente no presentó reacciones adversas a dicho tratamiento, observándose un cierre completo del defecto fistuloso.

El ensayo I se realizaron nueve implantes (cinco fístulas enterocutáneas, tres rectovaginales una fístula perianal) en cinco pacientes con enfermedad de Crohn, con dosis entre 6 y 30 millones de ASC por fístulas. No se observaron efectos adversos atribuidos a la terapia celular en ningún paciente y la tasa de cierre se situó en el 75% tras ocho semanas de seguimiento. En 8 de las fístulas se realizó seguimiento a las 8 semanas del implante. De estas, en 6 se observó reepitelización del trayecto fistuloso (75%). En las otras 2 se observó cierre incompleto del orificio externo con mejoría de la clínica. No se encontraron efectos secundarios durante el seguimiento, que duró 22 meses de media (81)

El ensayo fase II se trató de un estudio multicéntrico, abierto, aleatorizado con fármaco control, que constó de dos grupos paralelos tratados con un trasplante autólogo de ASC más adhesivo de fibrina o bien tan solo con adhesivo de fibrina. La dosis inicial fue de 20 millones y la de rescate de 40 millones. Durante el periodo de seguimiento no se objetivaron reacciones adversas relacionadas con la terapia celular y se obtuvo una tasa de curación del 71% en los pacientes tratados con ASC y adhesivo de fibrina frente al 14% en los pacientes tratados tan solo con adhesivo de fibrina. De todas las paciente incluidas en el ensayo 8 presentaban una fístula rectovaginal. De estas 8 paciente 4 fueron tratadas con ASC y 4 con adhesivo de fibrina. De las 4 tratadas con ASC en 3 de ellas se logró el cierre completo. De las pacientes

tratadas con fibrina, en ningún caso se objetivó cierre completo durante el seguimiento (86).

El trabajo fase III fue también un ensayo multicéntrico randomizado realizado en 200 pacientes de 19 centros. Fueron randomizadas para recibir 20 millones de ASC (grupo A, 64 pacientes), 20 millones de ASC autólogas y pegamento de fibrina (grupo B, 60 pacientes) o bien sólo pegamento de fibrina (grupo C, 59 pacientes). En este ensayo se excluyeron las pacientes con fístula rectovaginal. Se consideraron pacientes curados aquellos con reepitelización del orificio externo y ausencia de colecciones mayores de 2cm en la Resonancia Magnética. Si tras 12 semanas la fístula permanecía abierta, se procedió a la aplicación de una segunda dosis (40 millones de ASC en los grupos A y B). Los pacientes fueron reevaluados tras 24 y 26 semanas de tratamiento y 1 año después. Tras 24-26 semanas, la tasa de cierre se situó en 39.1%, 43.3% y 37.3% en los grupos A, B y C ( $p=0.13$ ). Los resultados analizados por centros demostraron una mayor tasa de cierre en el centro pionero (Hospital Universitario La Paz), lo que nos lleva a resaltar la importancia de poseer una amplia experiencia en este campo con el fin de obtener resultados óptimos. Este trabajo demuestra que en el tratamiento de fístulas perianales complejas, las células madre derivadas de tejido adiposo son un tratamiento seguro que alcanza por sí sólo o en combinación con pegamento de fibrina, tasas de cierre del 40% a los 6 meses y superior al 50% tras un año de seguimiento (121).

Los diferentes ensayos publicados en la literatura y aquellos en los que ha participado nuestro grupo, así como el hecho de que en no todos nuestros pacientes es factible la obtención de células derivadas de una liposucción (debido al carácter malabsortivo de la enfermedad de Crohn), nos llevaron a plantear un ensayo con ASC de origen alogénico.

De ahí nace este ensayo clínico, en el que se aplica una dosis inicial de 20 millones de ASC alogénicas y una dosis de rescate de 40 millones. La

decisión de emplear esta dosis surge a consecuencia de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos in vitro y en vivo.

Los resultados obtenidos, demuestran que, a pesar de no ser un tratamiento autólogo, el uso de ASC obtenidas a partir de un donante sano, pueden ser empleadas a nivel intralesional (submucoso) sin dar lugar a fenómenos de rechazo ni de inmunogenicidad. Suponen por tanto un tratamiento seguro, además de resultar factible y fácilmente reproducible, el hecho de ser células derivadas de la grasa dan lugar a una obtención más cómoda, más barata y con menos complicaciones que aquellas obtenidas a partir de otros tejidos.

Si bien el ensayo planteado buscaba el analizar la factibilidad y seguridad de este tratamiento, también nos planteamos si su uso es eficaz y aumentan las tasas de cierre fistuloso. Nuestra serie es de reducido tamaño muestral, como corresponde a un estudio de este tipo, pero a pesar de ello, podemos extrapolar conclusiones. Nuestras tasas de cierre son similares a las encontradas en la literatura(28)(29)(74), dado que de las 5 pacientes que finalizan el estudio, 3 de ellas presentan cierre completo de la fístula (60%), sin observarse recurrencia tras 52 semanas de seguimiento. Lo cierto es que tras los excelentes resultados obtenidos con anteriores ensayos clínicos, ésta tasa de cierre resulta por debajo de lo esperado, si bien éste es un ensayo tipo I-IIa que no busca un análisis de eficacia.

Esta tasa de cierre puede ser explicada de dos maneras. Una de ellas supone una infradosificación terapéutica. Hemos observado que la administración de 20 millones de ASC no genera ningún tipo de rechazo y resulta llamativo, que incluso la administración de una dosis doble de 40 millones no genera ningún tipo de alteración a nivel local ni sistémico (análisis de citocinas circulantes), si bien al ser un tratamiento alogénico, pudiera producirlo. Esto nos lleva a plantearnos el uso de dosis claramente superiores,

siguiendo las proporciones empleadas en estudios animales, ahora que sabemos que este es un tratamiento seguro.

Otra posible explicación supone el abandono de terapias médicas durante el periodo de seguimiento del ensayo clínico. Las pacientes incluidas en el ensayo son pacientes con enfermedad de Crohn de larga evolución, en las que ya ha fracasado un abordaje quirúrgico de la fístula (ambos criterios de inclusión). Prácticamente todas ellas se encontraban con tratamientos médicos agresivos al ser incluidas en el ensayo, y dichos tratamientos fueron suspendidos. De las 10 pacientes, 5 sufrieron reagudización de la enfermedad de Crohn durante el periodo de seguimiento, lo que supone un factor de riesgo para la recidiva fistulosa.

Estas dos premisas nos llevan a plantearnos nuevos ensayos clínicos con ASC alogénicas en el tratamiento de las fístulas rectovaginales derivadas de la enfermedad de Crohn. Nuevos tratamientos que por un lado permitan el uso de dosis superiores de ASC y por otro lado, que nos permitan mantener aquellos fármacos biológicos para alcanzar un mejor control de la enfermedad de base.

### **4.4. SOBRE LA MEJOR FUENTE CELULAR.**

Desde el punto de vista de su capacidad reproductiva y funcional, las células madre se han definido como aquellas que pueden dividirse simultáneamente para mantener su autorrenovación y para generar células hijas especializadas morfológica y funcionalmente. Se ha descrito la presencia de las células madre adultas o somáticas en prácticamente todos los tejidos y órganos, incluyendo médula ósea, sangre periférica, piel, grasa subcutánea, córnea, retina, hígado, páncreas, tejido gastrointestinal, pulmón, pulpa dentaria, tejido musculoesquelético y tejido conjuntivo (67)(88). Muchas de ellas se han conseguido aislar y cultivar y se ha comprobado que dichas células tienen

capacidad de regeneración y diferenciación en múltiples líneas celulares (67)(116)(129).

Actualmente, existen cinco fuentes reseñables de células madre adultas empleadas en la terapia celular: El cordón umbilical, la sangre periférica, la médula ósea, el tejido musculoesquelético y la grasa subcutánea, como ya hemos descrito en capítulos anteriores (67). Recientemente se está trabajando con células madre derivadas de la piel. Dichas investigaciones, lideradas por el Dr. Yamanaka se encuentran por el momento en fase experimental, y por ahora no tienen aplicabilidad clínica (115)(118).

Nuestro grupo de investigación se centra particularmente en las células madre obtenidas de tejido adiposo. Las principales ventajas de esta fuente celular supone su fácil y segura obtención (liposucción de grasa periférica), éticamente aceptada, con menor morbilidad para el donante, bajos costes y alta rentabilidad y permiten ser empleadas en el momento de la obtención o ser criopreservadas (67)(88)(136).

Dado que desde el punto de vista inmunológico esta línea celular presenta características similares a las células obtenidas a partir de médula ósea (CD29, CD44, CD71, CD13, CD105, SH-3 Y STRO-1), posee numerosas ventajas y similares características de adherencia estromal, crecimiento y capacidad de diferenciación (88)(129)(135).

La mayor parte de estas células poseen una autorrenovación limitada, y hasta hace poco, su manipulación y cultivo resultaban dificultosos y con elevado coste. La realización de nuevos estudios está abriendo actualmente la posibilidad de cultivos más factibles y económicos, con lo que se ampliarían considerablemente las posibilidades de investigación y terapéutica.

En cuanto a sus ventajas, dada la procedencia (abundante tejido adiposo que permite una amplia obtención celular) y dados los escasos efectos adversos derivados de su uso, así como el hecho de que no presenten problemas éticos en su obtención, es cuestión de tiempo que esta fuente

celular se convierta en una potente arma en nuestro arsenal terapéutico habitual (136).

### **4.5. UNA MIRADA AL FUTURO.**

Diferentes trabajos publicados en la literatura científica han demostrado la capacidad de las ASC de origen murino y humano de reparar daños tisulares in vivo. Se ha comprobado que en modelos animales de inflamación, las ASC son capaces de disminuir el proceso inflamatorio así como controlar la respuesta de los linfocitos T. Las ASC poseen capacidad de diferenciación, con escasa inmunogenicidad y capacidad de modular la respuesta inflamatoria. Si bien el mecanismo molecular se desconoce con exactitud, sabemos que su uso en tejidos adultos da lugar a la reparación tisular así como a la regeneración de las células dañadas. Asimismo, se ha comprobado la capacidad local de estimulación tisular promoviendo entre otros la neovascularización de los tejidos dañados (82)(84)(85)(112)(113)(129)(130).

Por ahora se desconocen con exactitud los mecanismos implicados en estos procesos, así como los posibles efectos adversos de dichos tratamientos. En nuestro camino de investigación con esta fuente celular hemos ido encontrando diferentes retos. Tras estudiar y demostrar que la terapia celular con e-ASC tanto autóloga como alogénica supone un tratamiento seguro y que no provoca reacciones inmunológicas ni en el punto de aplicación local ni a nivel sistémico, nos preguntamos si la dosis de e-ASC aplicada es la correcta, o si por el contrario resulta insuficiente la dosis actual de 40 millones.

Hemos visto que a corto y medio plazo, el uso de e-ASC de origen alogénico no presenta rechazo ni reacciones inmunológicas pero, ¿resulta igual de eficaz que el tratamiento autólogo? Y, ¿qué pacientes se beneficiarían de dicho tratamiento? ¿Resultan todos nuestros pacientes potenciales candidatos?



Actualmente nuestro grupo lleva a cabo diferentes estudios en fase I-IIa para valorar la eficacia del producto alogénico en pacientes con fístulas rectovaginales, perianales complejas y enterocutáneas, encontrándose los mismos en fase de reclutamiento.

Por otro lado, y más concretamente en la enfermedad de Crohn, no conocemos con exactitud el mecanismo inmunomodulador que llevan a cabo las e-ASC. En esta patología, los mecanismos inflamatorios y antiinflamatorios se encuentran descompensados y descontrolados. Creemos que las e-ASC pueden dar lugar a efectos, tanto a nivel local como nivel molecular en la regulación de dichos mecanismos, si bien desconocemos con exactitud el modo en que esto se produce. Aún queda mucho por investigar y por conocer.

Dado que los costes de estos tratamientos se reducen progresivamente, debemos tener en mente que nuestros pacientes pueden beneficiarse en un futuro próximo, de la aplicación periódica de estos tratamientos, incluso de forma ambulatoria y que esto puede dar lugar a un mejor control de la enfermedad de Crohn perianal y sistémica.



## **5. CONCLUSIONES**



### 5. CONCLUSIONES

1. La terapia celular alogénica en la fístula rectovaginal supone un tratamiento seguro y factible. El uso de células madre adultas derivadas de grasa periférica ha demostrado ser una fuente segura y de fácil obtención, aprobada desde el punto de vista clínico y ético.
2. El uso de ACS alogénicas en pacientes con enfermedad de Crohn y fístula rectovaginal puede emplearse a nivel intralesional asociándose a otras técnicas quirúrgicas, como el legrado, cierre simple o flap de avance.
3. El uso de ACS alogénicas puede favorecer la correcta cicatrización y el cierre del trayecto fistuloso en pacientes con fístula rectovaginal secundaria a enfermedad de Crohn consiguiendo el cierre completo en el 60% de los casos.
4. Los estudios clínicos y analíticos a lo largo del seguimiento, no han detectado ningún dato de rechazo inmunológico del inóculo celular alogénico.
5. Ninguna de nuestras pacientes ha requerido la realización de estomas derivativos.
6. Los resultados clínicos obtenidos junto al conocimiento científico disponible, nos llevan a proponer el uso de una dosis muy superior de ASC así como inyecciones repetidas, con el fin de mejorar su eficacia.



## **6. RESUMEN**





## 6. RESUMEN

### 6.1. INTRODUCCIÓN

Las fistulas rectovaginales suponen una comunicación anómala epitelizada entre recto y vagina, siendo una condición infrecuente y de etiología diversa, que provoca grandes trastornos sociales, emocionales y sexuales para las pacientes que se ven afectadas. Hoy en día suponen hoy una de las manifestaciones de la enfermedad de Crohn de mayor complejidad terapéutica, siendo un auténtico reto para Gastroenterólogos y Coloproctólogos experimentados.

Según las diferentes series, el riesgo de desarrollar una fístula perianal en pacientes con enfermedad de Crohn es del 33% tras 10 años de diagnóstico y del 50% tras 20 años, siendo las manifestaciones perianales la primera manifestación clínica de esta enfermedad hasta en el 45% de las pacientes. Suelen afectar a pacientes jóvenes, pudiendo ser la primera manifestación de esta enfermedad. Según la localización y tamaño del orificio fistuloso la sintomatología puede ser variable, con la emisión de gas, heces o pus en vagina, secreciones malolientes, presencia de infecciones de repetición del trato genitourinario y dolor e irritación a nivel vulvar y perianal

Hoy en día se considera que la curación espontánea o medicamentosa es tan improbable que el tratamiento definitivo es principalmente quirúrgico, si bien los resultados obtenidos con las diferentes técnicas descritas resultan en ocasiones desalentadoras, precisando varias intervenciones para lograr el cierre completo del trayecto fistuloso. En toda intervención quirúrgica de estas pacientes los objetivos buscados son lograr el éxito completo y duradero, evitando un daño del esfínter y previniendo la formación de abscesos.

Los diferentes trabajos publicados demuestran la factibilidad, seguridad y eficacia de las ASC en el tratamiento de las fístulas perianales. El uso autólogo de las células madre ha demostrado ser factible, seguro y eficaz, y nuestra

línea de investigación nos lleva ahora a plantearnos si el empleo de un producto alogénico pudiera ser factible y seguro en esta patología.

En este momento no existen ensayos clínicos registrados ni publicados referentes al empleo de células madre alogénicas en las fístulas rectovaginales. En este ensayo clínico I-IIa, realizamos el abordaje de las fístulas rectovaginales secundarias a enfermedad de Crohn con un producto celular alogénico, con el fin de valorar la seguridad y factibilidad de las e-ASC alogénicas.

### **6.2. PACIENTES Y MÉTODOS**

Se incluyeron 10 pacientes en el ensayo clínico, todas ellas mujeres mayores de edad, con una edad media de 35 años (31-49). Las pacientes tratadas tenían una media de años de evolución de enfermedad de Crohn de 11.6 años (1-23). Todas eran mayores de edad y cumplían con todos los criterios de inclusión, y no presentaban ninguno de los criterios de exclusión del estudio.

Para poder ser incluidas en el estudio, las pacientes que se encontraban en tratamiento con medicamentos biológicos (ej. Infliximab, Humira,...) tuvieron que interrumpirlos, para de esta forma poder cumplir los criterios establecidos. Sí que se permitió el tratamiento con Imurel, por lo que 4 pacientes lo recibieron durante el periodo del estudio, con corticoides (2 pacientes), con Claversal (1paciente) o con Humira (1 paciente).

Todas las pacientes habían presentado cirugías previas sobre su fístula rectovaginal, con una media de 1.8 intervenciones (1-4). La media de cirugías perineales previas fue de 3.1 cirugías.

Se administró una dosis de 20 millones de ASC a nivel perianal a las 10 pacientes incluidas en el ensayo clínico. Las pacientes fueron seguidas mediante las visitas protocolizadas, valorándose a las 12 semanas el cierre fistuloso. En 2 pacientes que presentaban cierre en dicha visita, se continuó el seguimiento. El resto de pacientes fueron reclutadas para una dosis de rescate con 40 millones de ASC. De las 8 pacientes reclutadas para esta segunda

dosis, una fue excluida por mal control de su enfermedad de Crohn, administrándose el tratamiento en las otras 7 pacientes.

### 6.3. RESULTADOS

Podemos agrupar los resultados de acuerdo con los objetivos iniciales de nuestro ensayo:

6.3.1. Análisis de factibilidad: El tratamiento a estudio (producto alogénico de ASC procedentes de donantes sanos) se aplicó a todas las pacientes seleccionadas para el mismo. Supone un tratamiento factible y aplicable en los pacientes seleccionados.

6.3.2. Análisis de seguridad:

- i. Análisis de seguridad: Cinco pacientes fueron excluidas del estudio a lo largo del mismo por presentar brote de su enfermedad de base y precisar tratamiento con inmunomoduladores. Dicho tratamiento era criterio de exclusión para el ensayo clínico, por lo que las pacientes abandonaron el mismo.
- ii. Análisis de reacción inmunológica: no se ha encontrado reacción inmunológica adversa en ninguna paciente a la que se aplicó el tratamiento (datos referidos por un laboratorio externo).
- iii. Análisis de citoquinas circulantes: No se ha encontrado ninguna alteración en ninguna paciente ni visita a lo largo del ensayo, (datos referidos por un laboratorio externo).

6.3.3. Análisis de eficacia: Podemos desglosarlo en los siguientes apartados:

- i. Resultados clínicos: De las 5 pacientes que finalizaron el ensayo clínico, todas cumplieron todas las visitas programadas según el protocolo el tratamiento, siendo este eficaz para 3 de ellas. Estas pacientes presentaron un cierre completo de la fístula con desaparición de la sintomatología tras 52 semanas de seguimiento.

- ii. Análisis de calidad de vida: todas las pacientes han mostrado una mejora a lo largo de las visitas de seguimiento según el test SF-36, sin cambios significativos en las pacientes que presentan cierre fistuloso frente a aquellas que no lo presentan.

## 6.4. CONCLUSIONES

Tras la realización del ensayo podemos concluir:

1. La terapia celular alogénica en la fístula rectovaginal supone un tratamiento seguro y factible. El uso de células madre adultas derivadas de grasa periférica ha demostrado ser una fuente segura y de fácil obtención, aprobada desde el punto de vista clínico y ético.
2. El uso de ACS alogénicas en pacientes con enfermedad de Crohn y fístula rectovaginal puede emplearse a nivel intralesional asociándose a otras técnicas quirúrgicas, como el legrado, cierre simple o flap de avance.
3. El uso de ACS alogénicas puede favorecer la correcta cicatrización y el cierre del trayecto fistuloso en pacientes con fístula rectovaginal secundaria a enfermedad de Crohn consiguiendo el cierre completo en el 60% de los casos.
4. Ninguna de nuestras pacientes ha requerido la realización de estomas derivativos.
5. Los resultados clínicos obtenidos junto al conocimiento científico disponible, nos llevan a proponer el uso de una dosis muy superior de ASC así como inyecciones repetidas, con el fin de mejorar su eficacia.

## **7. ANEXOS**



## 7. ANEXOS

### Anexo 1.: hallazgos en la Resonancia Magnética Nuclear

Categoría	Puntuación
Número de trayectos fistulosos	
Ninguno	0
Único, no bifurcado	1
Único, bifurcado	2
Múltiples	3
Localización	
Extra o interesfintérioria	1
Transesfintérioria	2
Supraesfintérioria	3
Extensión	
Infraelevador	1
Supraelevador	2
Aumento de captación en fases T2	
Ausente	0
Moderada	4
Importante	8
Colecciones (cavidades mayores a 3mm de diámetro)	
Ausentes	0
Presentes	4
Pared rectal	
Normal	0
Engrosada	2

**Anexo 2.: Índice CDAI**

Variable	Multiplicar
Número de deposiciones líquidas al día durante 7 días	X2
Dolor abdominal: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausente: 0</li> <li>• Leve: 1</li> <li>• Moderado: 2</li> <li>• Grave: 3</li> </ul>	X5
Estado general: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bueno: 0</li> <li>• Regular: 1</li> <li>• Malo: 2</li> <li>• Muy malo:3</li> <li>• Terrible: 4</li> </ul>	X7
Presencia de otras complicaciones (artritis, uveítis, empiema nodoso o pioderma gangrenoso, fisura anal, fistula o absceso) o fiebre superior a 37,8 °C	X20
Necesidad de uso de Loperamida u otros antidiarreicos	X30
Tumoración abdominal: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausente: 0</li> <li>• Cuestionable: 1</li> <li>• Presente: 2</li> </ul>	X10
Hematocrito: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hombres 47%</li> <li>• Mujeres 42%</li> </ul>	X6
Índice de masa corporal	X1



**Anexo 3.: Índice PDAI (Perineal Disease Activity Index)**

Variable		Puntuación
Escapes o manchado	No escapes	0
	Mínimos mucosos	1
	Moderados mucosos o purulentos	2
	Escapes importantes	3
	Incontinencia fecal	4
Dolor/restricción de actividades	Ausente	0
	Leve disconfort no restricción	1
	Moderado disconfort, alguna limitación	2
	Marcado disconfort, marcada limitación	3
	Dolor y limitaciones severas	4
Restricción actividad sexual	No restricción	0
	Leve restricción	1
	Moderada limitación	2
	Marcada limitación	3
	Imposibilidad para relaciones sexuales	4
Tipo enfermedad perineal	No enfermedad perineal/ colgajos	0
	Fisura anal o desgarros mucosos	1
	Menos de 3 fístulas perianales	2
	3 ó más fístulas perianales	3
	Ulceración del esfínter anal	4
Grado de induración	No induración	0
	Mínima induración	1
	Moderada induración	2
	Marcada induración	3
	Fluctuación/ Absceso	4

**Anexo 4.: Fistula Drainage Assessment Measure**

Endpoint	Definición
Mejoría	Disminución del número de trayectos fistulosos abiertos >50%, durante 2 visitas clínicas consecutivas (mínimo 4 semanas)
Remisión	Cierre trayecto fistuloso y ausencia de drenaje a la compresión

**Anexo 5.: Clasificación de Montreal de la enfermedad de Crohn.**

<b>Edad al diagnóstico (A)</b>	
<b>A1</b>	16 años o menos
<b>A2</b>	17-40 años
<b>A3</b>	>40
<b>Localización (L)</b>	
<b>L1</b>	Íleon terminal
<b>L2</b>	Colon
<b>L3</b>	Ileocólica
<b>L4</b>	Tracto digestivo alto
	<b>L1+L4</b> (íleon terminal y tracto digestivo alto)
	<b>L2+L4</b> (colon y tracto digestivo alto)
	<b>L3+L4</b> (ileocólica y tracto digestivo alto)
<b>Patrón clínico (B)</b>	
<b>B1</b>	No estenosante, no fistulizante, o inflamatorio
<b>B2</b>	Estenosante
<b>B3</b>	Fistulizante
	<b>B1p</b> (inflamatorio con afección perianal asociada)
	<b>B2p</b> (estenosante con afección perianal asociada)
	<b>B3p</b> (fistulizante con afección perianal asociada)

**Anexo 6.: Escala de Wexner**

Incontinencia	Nunca	Rara vez	A veces	Habitualmente	Siempre
Sólidos	0	1	2	3	4
Líquidos	0	1	2	3	4
Gas	0	1	2	3	4
Precisa compresa	0	1	2	3	4
Afectación vida social	0	1	2	3	4

## Anexo 7.: Informe del Comité Ético I



Hospital Universitario La Paz

Comunidad de Madrid

### INFORME DEL COMITE ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Don Antonio Gil Aguado, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz

### CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor **Fundación Investigación Biomédica Hospital La Paz** para que se realice el ensayo clínico titulado **"ENSAYO CLÍNICO EN FASE I-IIa PARA CONOCER LA FACTIBILIDAD Y SEGURIDAD DEL USO ALOGÉNICO DE CÉLULAS MADRE EXPANDIDAS DERIVADAS DE LA GRASA EN EL TRATAMIENTO LOCAL DE FÍSTULAS RECTO-VAGINALES DE CROHN"**, código del protocolo: EC08/00153, Versión 2 de 22 de Enero de 2009 y la Hoja de Información al Paciente/Consentimiento Informado, Número EudraCT: 2009-010225-39, código HULP: 2746,

y considera que teniendo en cuenta la respuesta a las aclaraciones solicitadas

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Y que este Comité acepta que dicho ensayo clínico sea realizado en el Hospital Universitario La Paz por el Dr. Damián García Olmo del Servicio de Cirugía General C del Hospital General, como investigador principal.

Lo que firmo en Madrid a 17 de Febrero de 2009



Firmado:  
Don Antonio Gil Aguado

## Anexo 8.: Informe del Comité Ético II



Ensayo clínico titulado: "ENSAYO CLÍNICO EN FASE I-IIa PARA CONOCER LA FACTIBILIDAD Y SEGURIDAD DEL USO ALOGÉNICO DE CÉLULAS MADRE EXPANDIDAS DERIVADAS DE LA GRASA EN EL TRATAMIENTO LOCAL DE FÍSTULAS RECTO-VAGINALES DE CROHN".  
Promotor: Fundación Investigación Biomédica Hospital La Paz Código HULP: 2746

D<sup>a</sup> Rosario Madero Jarabo, Secretaria del  
Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario "La Paz" de Madrid,

### HACE CONSTAR QUE:

1º En la reunión celebrada el día 11 de septiembre de 2008, acta 15/2008, se decidió emitir el informe correspondiente al estudio de referencia.

2º En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente –Real Decreto 223/2004 y Decreto 39/94 de la Comunidad de Madrid –para que la decisión del citado CEIC sea válida.

3º El CEIC del Hospital La Paz, tanto en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95).

4º La composición actual del CEIC del Hospital La Paz es la siguiente:

- Dr. Antonio Gil Aguado, Jefe de Sección de Medicina Interna, Presidente
- Dr. Jesús Frías Iniesta, Jefe de Servicio de Farmacología Clínica, Vicepresidente
- D<sup>a</sup> Rosario Madero Jarabo, Adjunto de Bioestadística, Secretaria
- Dr. Mario Arancón Monge, Médico de Atención Primaria, Vocal
- Dr. Javier Arpa Gutiérrez, Jefe de Sección de Neurología, Vocal
- Dr. Manuel Jiménez Lendínez, Jefe de Servicio de Medicina Intensiva, Vocal
- Dr. Carlos A. Hernández Gil, Médico Adjunto de Traumatología, Vocal
- Dr. Antonio Buño Soto, Médico Adjunto del Laboratorio de Urgencias, Vocal
- Dr. Jaime Feliú Batlle, Médico Adjunto de Oncología, Vocal
- Dra. Elena García Higuera, Médico Adjunto de Anestesia, Vocal
- Dr. Fernando Cabañas González, Médico Adjunto de Neonatología, Vocal
- D. Filiberto Chulíá, Licenciado en Derecho, Vocal
- D<sup>a</sup> Elena Villamañán, Farmacéutica Adjunta. Servicio de Farmacia, Vocal
- D<sup>a</sup>. Dolores Alvarez Alonso, Enfermera de C.I.N., Vocal
- D<sup>a</sup>. Teresa González de Benito, Licenciada en Filosofía y Ciencias de la Educación, Vocal
- D. Juan A. Sánchez-Moreno Mínguez, Licenciado en Derecho, Vocal y Ajeno al Hospital
- Dr. Jaime Fernández-Bujarrabal, Médico Adjunto de Neumología, Vocal
- Dr. Luis Asensio Prianes, Médico Adjunto. Servicio de Cirugía General
- Dra. Almudena Castro Conde, Médico Adjunto. Servicio de Cardiología
- Dr. José Ramón Paño Pardo, Médico Adjunto de Medicina Interna, Vocal

Para que conste donde proceda, y a petición del promotor

Madrid a 11 de septiembre de 2008

Fdo: Rosario Madero Jarabo



**Anexo 9.: Hoja de información a los pacientes y consentimiento informado.**

**Título:** Ensayo clínico en Fase I-IIa para conocer la factibilidad y seguridad del uso alogénico de células madre expandidas (e-ASC) derivadas de la grasa en el tratamiento local de fístulas recto-vaginales de Crohn.

**Promotor:** Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz

Sección de Cirugía Colorrectal del Hospital Universitario La Paz.

**Antecedentes:**

Se le propone incorporarse a un Ensayo Clínico en Fase I-IIa para comprobar la factibilidad y seguridad de una nueva aplicación terapéutica basada en el uso de células madre derivadas de lipoaspirado (ASC). Antes de que usted dé su consentimiento firmado, es necesario que entienda lo que el tratamiento pueda suponer.

El presente documento -hoja de información al paciente y consentimiento- describe el propósito, los procedimientos, los beneficios y riesgos potenciales, así como las molestias y las precauciones de este tratamiento, en el entorno de un Ensayo Clínico.

Le rogamos lea detenidamente este documento y no dude en ponerse en contacto con su médico para cualquier pregunta que le pueda surgir acerca del mismo y/o de la información sobre el estudio que le damos a continuación.

Su médico le ha explicado que usted tiene: una fístula recto-vaginal y como usted conoce, en su caso han fracasado los tratamientos estándares que le podemos ofrecer. Tras dos ensayos clínicos, de seguridad y eficacia, de esta nueva terapia con ASC, en el tratamiento de las fístulas perianales complejas, se ha demostrado que un procedimiento similar con células usadas de forma autóloga parece ser eficaz y es seguro.

**Propósito del tratamiento:**

El propósito de este tratamiento es solucionar su fístula sin necesidad de una intervención quirúrgica agresiva.

**Procedimientos durante el tratamiento:**

Previo al tratamiento, el cirujano responsable elaborará su historia médica completa mediante: exploración física, datos antropométricos, signos vitales (tensión arterial, temperatura, frecuencia cardíaca), análisis de sangre y evaluación de la fístula. Durante el periodo de seguimiento se podrán realizar pruebas, según los protocolos aprobados por el CEIC para el Ensayo Clínico que se le propone.

Es necesario, por su parte, advertir de sus posibles alergias medicamentosas, alteraciones de la coagulación, enfermedades cardiopulmonares, renales, existencia de prótesis, marcapasos, medicaciones actuales o cualquier otra circunstancia (diabetes, obesidad, inmunodepresión, hipertensión, anemia, edad avanzada...) que pudiera complicar el procedimiento o agravar el postoperatorio.

Previo al tratamiento y con posterioridad en cada visita de control, se le solicitará la extracción de sangre (10-20 ml en cada ocasión) para los estudios que el Laboratorio de Terapia Celular considere oportunos con el fin de comprobar la evolución de las células en su organismo: estudio de citoquinas (IL-2, IL-6, IL-10, IL-12,..) u otros estudios que sirvan para analizar la evolución de las células implantadas en usted.

Será examinada por el Servicio de Anestesia de nuestro hospital, el cual se encargará de llevar a cabo las medidas necesarias para garantizar su confort durante el procedimiento (anestesia raquídea con/sin sedación o anestesia general) de la intervención que se la realice para este tratamiento. Tras aclarar cualquier duda que a usted la surja, se solicitará la firma de un nuevo consentimiento específico y dará la conformidad para la intervención.

La empresa Cellerix S.L. será la encargada de darle a su cirujano las células derivadas del lipoaspirado con calidad clínica, procedentes de otra persona que ha

donado su grasa para la obtención de estas. Cellerix S.L. se ha asegurado que el donante sea una persona sana y ha realizado todos los estudios necesarios para asegurar la calidad de uso clínico de las células que a usted le van a implantar de acuerdo con las indicaciones de la Agencia Española del Medicamento. En todo momento la identidad del donante será preservada, salvo para requerimientos judiciales y en ese caso sólo Cellerix S.L. conocerá su origen. Cellerix S.L. le comunicará a su médico la disponibilidad de las células con antelación; el cual mediante el personal administrativo del hospital, se pondrá en contacto con usted para su ingreso y posterior implante celular.

Si por alguna razón sobran células tras su intervención, usted debe saber que estas se quedará en el Laboratorio de Terapia Celular de la Unidad de Investigación de nuestro hospital, para ser utilizadas en diferentes estudios para mejorar el proceso de cicatrización, para conocer mejor la Biología de este tipo de células o en estudios de Bioseguridad celular. Además, estas células sobrantes pueden ser cedidas por el laboratorio a otras instituciones con las que colabore para análisis relacionados con los estudios anteriormente indicados.

Una vez que inicie el tratamiento, acudirá al hospital para revisiones en las que, el equipo médico que le atiende comprobará su evolución:

- Por favor, consulte con su médico del estudio antes de tomar cualquier medicación de prescripción o de venta libre.
- Debe informar a los otros médicos que le atienden que ha sido tratada mediante este procedimiento.

### **Riesgos potenciales:**

No se han descrito efectos secundarios atribuibles a la aplicación de e-ASC en ningún paciente durante los dos ensayos clínicos autólogos que previamente ha realizado nuestro equipo. Además en la bibliografía no se ha descrito ningún efecto adverso usando células madre mesenquimales de forma alogénica (ver anexo). Los posibles efectos a largo plazo de esta terapia celular, por novedosa, se desconocen, no obstante la investigación experimental sobre modelos animales, usando e-ASC de forma alogénica no han mostrado diferencias significativas frente a los ensayos usando células autólogas.



Existen complicaciones poco graves que pueden ocurrir durante las intervenciones y en los días inmediatamente posteriores a las mismas (sangrado, infección de la herida, retención de orina, inflamación y/o dolor prolongado en la zona de la operación). La aparición de abscesos perianales, aunque puede ser grave, no es una complicación frecuente.

#### **Notificación de síntomas, molestias y/o efectos adversos**

Si notara durante los meses posteriores al tratamiento algún síntoma, molestia o efecto adverso no dude en comunicárselo a su médico de inmediato, tanto si considera o no que esté relacionado con el tratamiento. El médico podrá realizar los análisis o exploraciones que considere oportunos para su seguridad.

#### **Participación:**

Su participación en este tratamiento es voluntaria y usted renuncia a cualquier beneficio económico que se pueda obtener de él. Si decide tomar parte en él, pero cambia más tarde de opinión, es libre de hacerlo aunque deberá firmar la renuncia en el apartado correspondiente. Los cuidados que usted pudiera recibir posteriormente de su médico no se verán afectados.

#### **Confidencialidad:**

Con el fin de garantizar la fiabilidad de los datos recogidos durante este tratamiento y de acuerdo con la ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, los datos personales que se le requieren (p.ej., nombre, datos de salud) son los necesarios para cubrir los objetivos del tratamiento y sólo serán conocidos por el equipo investigador implicado en este ensayo clínico. En ninguno de los informes aparecerá su nombre, y su identidad no será revelada a persona alguna, salvo en el caso de urgencia médica o requerimiento legal. En ningún momento Cellerix S.L. ni nadie ajeno al estudio, dispondrá de información que permita asociar su nombre, número de Seguridad Social o número de historia clínica.



Los resultados del tratamiento podrán ser comunicados a las autoridades sanitarias, y eventualmente, a la comunidad científica a través de congresos y/o publicaciones científicas. En este caso y de acuerdo con la Ley 15/1999 sus datos personales nunca serán revelados.

Los resultados obtenidos de este tratamiento así como de las células que se cedan al Laboratorio de Terapia Celular podrían ser usados para futuras investigaciones biomédicas. Además es posible que en el futuro el equipo médico necesite obtener datos adicionales de su historia clínica con el fin de integrar los datos ya recogidos en un contexto médico apropiado. En todos estos supuestos se mantendrá su anonimato, salvo para el personal médico que le atiende.

**Información adicional:**

Este documento se ha enviado para su autorización al Comité Ético de Investigaciones Científicas de nuestro hospital, cuya misión es verificar que se respetan todos sus derechos y se toman las medidas necesarias para su seguridad. Además dicho ensayo clínico ha sido autorizado por la Agencia Española del Medicamento.

Se le suministrará oportunamente toda la información relevante que sobre su enfermedad o sus tratamientos se vaya teniendo conocimiento, de forma que usted pueda valorar su evolución.

Si tiene alguna pregunta acerca de asuntos médicos relacionados con estos procedimientos, debe contactar con el Dr. Damián García Olmo. Número de teléfono: 91 207 14 37.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE POR ESCRITO**

**Ensayo clínico en Fase I-IIa para conocer la factibilidad y seguridad del uso alogénico de células madre expandidas (eASC) derivadas de la grasa en el tratamiento local de fístulas recto-vaginales de Crohn.**

Yo,..... (Nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.  
He podido hacer preguntas sobre el tratamiento.  
He recibido suficiente información sobre el tratamiento.  
He hablado con el

Dr/a..... sobre el tratamiento.  
Comprendo que mi participación es voluntaria.

Yo DOY  / No DOY  mi consentimiento voluntariamente para que se me aplique el tratamiento propuesto en este Ensayo Clínico.

Yo DOY  / No DOY  mi consentimiento voluntariamente para que se me extraiga sangre previo al tratamiento y durante las visitas de seguimiento que consideren oportunas, éstas muestras se cederán al Laboratorio de Terapia Celular para la investigación que sus responsables consideren oportuna. Presto libremente mi conformidad para que se me aplique el tratamiento propuesto.

Fecha ..... Firma de la paciente

Fecha ..... Firma del Médico responsable

Revoco el consentimiento prestado en fecha ..... y no deseo proseguir con las visitas de seguimiento que doy con esta fecha por finalizado.

Fecha ..... Firma de la paciente

Fecha ..... Firma del Médico responsable

Consentimiento de familiares o tutores:

El paciente D./Dña. .... con D.N.I. .... no tiene capacidad para decidir en este momento.

D./Dña. .... con D.N.I. .... y en calidad de ..... he sido informado/a suficientemente del procedimiento que se le va a realizar. Por ello, doy expresamente mi consentimiento. Mi aceptación es voluntaria y puedo retirar este consentimiento cuando lo considere oportuno.

Firma del tutor o familiar

Fecha:...../...../.....

**Anexo 10: Presupuesto solicitado para el ensayo clínico.**

1. Gastos de Personal (gasto en la duración del proyecto)	Euros
Técnico especialista de laboratorio X 2	40.000
1. Gastos de Ejecución	
- Gastos de equipamiento	50.000
- Gastos material inventariable	30.000
- Gastos de material fungible	20.000
- Subcontratación (CROs)	12.000
- Seguro	12.000
- Adquisición/fabricación del MI	80.000
- Gastos relacionados con la obtención de autorizaciones administrativas y dictámenes	0
- Gastos de publicación y difusión de resultados	3.000
- Otros gastos especificar	
SUBTOTAL	207.000
b) Viajes y Dietas	
Asistencia del equipo a congresos nacionales o internacionales (viaje, inscripción y alojamiento)	6.000
SUBTOTAL	6.000
3. Subcontrataciones exclusivamente derivadas del proyecto	
Ya se han presupuestado la contratación de una CRO, un monitor y del seguro, por ello no se prevén más subcontrataciones. Con la incorporación del ecógrafo se asumirían todas las necesidades del estudio	0
4. Gastos generales suplementarios directos de la actividad	
Impresión de cuadernos de recogida de datos. Material informático para generar una base de datos.	4.000
Armario- archivador con cerradura para los cuadernos de recogida de datos	1.000
SUBTOTAL	5.000
Costes indirectos y gestión añadidos (max 2%)	4.360
<b>TOTAL AYUDA SOLICITADA</b>	<b>222.360</b>

La mayor partida presupuestaria fue dirigida al apartado de bienes y contratación de servicios. En este sentido la compra del medicamento (células mesenquimales adultas derivadas de tejido adiposo) supone casi el 40% del presupuesto. Este elevado coste se debe a la falta de laboratorios autorizados que suministren este tipo de células con calidad clínica y autorizados por los organismos competentes. Durante este Ensayo, el medicamento en investigación fue suministrado por un laboratorio que cumplía todos los requisitos legales y se le concedió la producción mediante concurso público desde la institución promotora.

Otros gastos importantes fueron los relacionados con la contratación de una CRO que monitorizó el Ensayo y controló su desarrollo así como el diseño de los protocolos de seguimiento. En este sentido se solicitó presupuesto a la empresa Effice Servicios para la Investigación S.L., compañía con experiencia en el desarrollo y monitorización de Ensayos Clínicos.

El tercer gasto fue la contratación de un Seguro de Responsabilidad Civil, presupuesto solicitado a la Correduría de seguros March que contrató con la aseguradora WR Berkley ESPAÑA y a la correduría HDI.

Otro gasto considerado fue la compra de un sigmorectoscopio flexible, con el fin de llevar a cabo una correcta exploración de las pacientes en quirófano y en la consulta.

Por último, consta una partida presupuestaria para material fungible, necesario para los estudios de cultivo de las células sobrantes en cada implante. Con estas células se pretendían realizar estudios de bioseguridad celular y estudios de nuevos modelos de cicatrización sobre animales de experimentación.

Para el desarrollo del proyecto se solicitó la contratación de un Técnico de Laboratorio para los estudios mencionados en el apartado anterior, dado que la mayor parte del equipo investigador es clínico con una alta labor asistencial.

Se han presupuestado una pequeña partida de gastos de viaje, ya que la exposición de los resultados a Congresos se realizará por todo el grupo una vez finalizado el Ensayo y tras haberse analizado todos los datos.

No se presupuestaron los gastos derivados de pagos de tasas pero sí de material necesario para el estudio (diseño de cuadernos de recogida de datos, diseño del protocolo, informatización de archivos...).

Asimismo, existe una partida para la publicación de los resultados en revistas científicas de reconocido prestigio, es conocido que cada vez es más común el pago exigido por figuras o por textos en prestigiosas revistas además de la contratación de un corrector ortográfico.

Por último no hay gastos en la partida de análisis estadísticos debido a la colaboración del Servicio de Bioestadística del Hospital Universitario La Paz.

### **Anexo 11: Declaración de Helsinki**

El ensayo clínico llevado a cabo se rige por los principios de la Declaración de Helsinki, descrita a continuación.

La declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial fue adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial de Helsinki, Finlandia en Junio de 1964; y enmendada por la 19ª Asamblea Médica Mundial de Tokio, Japón, en Octubre de 1975; 35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia Italia en Octubre de 1983; 41ª Asamblea Médica Mundial de Hong Kong, Septiembre de 1989; 48ª Asamblea General de Somerset West, Sudáfrica en Octubre de 1996; 52ª Asamblea General en Edimburgo, Escocia, en Octubre de 2000; Nota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la Asamblea Médica Mundial en Washington en 2002; Nota aclaratoria del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la Asamblea Médica Mundial en Tokio en 2004 y la 59ª Asamblea General en Seúl, Corea en Octubre de 2008.

#### Introducción

1. La Asociación Médica Mundial ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para la investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables. La Declaración debe ser considerada como un todo y un párrafo no debe ser aplicado sin considerar el resto de párrafos pertinentes.
2. Aunque la Declaración está destinada principalmente a los médicos, la Asociación Médica Mundial insta a otros participantes en la investigación médica en seres humanos, a adoptar estos principios.
3. El deber del médico es promover y velar por la salud de los pacientes, incluidos los que participan en investigación médica. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de este deber.
4. La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial vincula al médico con la fórmula “Velar solícitamente y ante todo por la salud de mi

paciente” y el Código Internacional de la Ética Médica afirma que: “El médico debe considerar lo mejor para el paciente cuando preste atención médica”.

5. El progreso de la medicina se basa en la investigación que, en último término, debe incluir estudio en los seres humanos. Las poblaciones que estén subrepresentadas en la investigación médica deben tener un acceso apropiado a la participación de la investigación.
6. En investigación médica en seres humanos, el bienestar de la persona que participa en la investigación debe tener siempre primacía sobre otros intereses.
7. El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos, procedimientos y tratamientos). Incluso las mejores intervenciones actuales deben ser evaluadas continuamente a través de la investigación para que sean seguras, eficaces, efectivas, accesibles y de calidad.
8. En la práctica de la medicina y de la investigación médica, la mayoría de las intervenciones implican algunos riesgos y costos.
9. La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y los derechos individuales. Algunas poblaciones sometidas a la investigación son particularmente vulnerables y necesitan protección especial. Estas incluyen a los que no pueden otorgar o rechazar el consentimiento por sí mismos y pueden ser vulnerables a coerción o influencia indebida.
10. Los médicos deben considerar las normas y estándares éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que las normas y estándares internacionales vigentes. No se debe permitir que un requisito ético, legal o jurídico nacional o internacional disminuya el nivel o elimine cualquier medida de protección para las personas que participan en la investigación establecida en esta Declaración.

Principios básicos para toda investigación médica

- 11.** En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información personal de las personas que participan en investigación.
- 12.** La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generales aceptados y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno. Se debe cuidar también del bienestar de los animales utilizados en los experimentos.
- 13.** Al realizar la investigación médica en seres humanos, hay que prestar atención adecuada a los factores que puedan dañar el medio ambiente.
- 14.** El proyecto y el método de todo estudio en seres humanos debe describirse claramente en un protocolo de investigación. Este debe hacer referencia siempre a las consideraciones éticas que fueran del caso y debe indicar cómo se han considerado los principios enunciados en esta Declaración. El protocolo debe incluir la información sobre financiamiento, patrocinadores, afiliaciones institucionales, otros posibles conflictos de interés e incentivos para las personas del estudio e estipulaciones para tratar o compensar a las personas que han sufrido daños como consecuencia de su participación en la investigación. El protocolo debe describir los arreglos para el acceso después del ensayo a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o el acceso a otra atención o beneficios apropiados.
- 15.** El protocolo debe enviarse, para consideración, comentario, consejo y aprobación, a un comité de ética de investigación antes de comenzar el estudio. Este comité debe ser independiente del investigador, del patrocinador o de cualquier otro tipo de influencia indebida. El comité debe considerar las leyes y reglamentos vigentes en el país donde se realiza la investigación, como también las normas internacionales vigentes, pero no



se debe permitir que éstas disminuyan o eliminen ninguna de las protecciones para las personas que participan en la investigación establecidas para esta Declaración. El comité tiene derecho de controlar los ensayos en curso. El investigador tiene la obligación de proporcionar información del control al comité, en especial sobre todo incidente adverso grave. No se debe hacer ningún cambio en el protocolo sin la consideración y aprobación del Comité.

- 16.** La investigación médica en seres humanos debe ser llevada a cabo sólo por personas con la formación y calificaciones científicas apropiadas. La investigación en pacientes o voluntarios sanos necesita la supervisión de un médico u otro profesional de la salud competente y calificado apropiadamente. La responsabilidad de la protección de las personal que toman parte en la investigación debe recaer siempre en un médico u otro profesional de la salud y nunca en los participantes en la investigación, aunque hayan otorgado su consentimiento.
- 17.** La investigación médica en una población o comunidad con desventajas o vulnerable sólo se justifica si la investigación responde a necesidades y prioridades de salud de esta población o comunidad y si existen posibilidades razonables de que la población o comunidad sobre la que la investigación se realiza, podrá beneficiarse de sus resultados.
- 18.** Todo proyecto de investigación médica en seres humanos debe ser precedido de una cuidadosa comparación de los riesgos y los costos para las personas y las comunidades que participan en la investigación, en comparación con los beneficios previsibles para ellos y para otras personas o comunidades afectadas por la enfermedad que se investiga.
- 19.** Todo ensayo clínico debe ser inscrito en una base de datos disponible al público antes de aceptar a la primera persona.
- 20.** Los médicos no deben participar en estudios de investigación en seres humanos a menos que estén seguros de que los riesgos inherentes han sido adecuadamente evaluados y de que es posible hacerles frente de manera satisfactoria. Deben suspender inmediatamente el experimento en

marcha si observan que los riesgos que implican son más importantes que los beneficios esperados o si existen pruebas concluyentes de resultados positivos o beneficiosos.

- 21.** La investigación médica en seres humanos sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo inherente y los costos para la persona que participa en el ensayo.
- 22.** La participación de personas competentes en la investigación médica debe ser voluntaria. Aunque puede ser apropiado consultar a familiares o líderes de la comunidad, ninguna persona debe ser incluida en un estudio a menos que ella acepte libremente.
- 23.** Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de la persona que participa en la investigación y la confidencialidad de su información personal y para reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su integridad física, mental y social.
- 24.** En la investigación médica en seres humanos competentes, cada individuo potencial debe recibir información adecuada acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posibles conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento y todo otro aspecto perteneciente a la investigación. La persona potencial debe ser informada del derecho a de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Se debe prestar especial atención a las necesidades específicas de información de cada individuo potencial, como también del os métodos utilizados para entregar la información. Después de asegurarse de que el individuo ha comprendido la información, el médico u otra persona calificada apropiadamente debe pedir entonces, preferiblemente por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona. Si el consentimiento no se puede otorgar por escrito, el proceso para lograrlo debe ser documentado y atestiguado formalmente.

- 25.** Para la investigación médica en que se utilice material o datos humanos identificables, el médico debe pedir normalmente el consentimiento para la recolección, análisis, almacenamiento y reutilización. Podrá haber situaciones en las que será imposible o impracticable obtener el consentimiento para dicha investigación o podría ser una amenaza para su validez. En esta situación, la investigación sólo puede ser realizada después de ser considerada y aprobada por un comité de ética de investigación.
- 26.** Al pedir el consentimiento informada para la participación en la investigación, el médico debe poner especial cuidado cuando el individuo potencial está vinculado con él por una relación de dependencia o si consiente bajo presión. En una situación así, el consentimiento informado debe ser pedido por una persona calificada adecuadamente y que no tenga nada que ver con aquella relación.
- 27.** Cuando el individuo potencial sea incapaz, el médico debe pedir el consentimiento informado del representante legal. Estas personas no deben ser incluidas en la investigación que no tenga posibilidades de beneficio para ellas, a menos que ésta tenga como objetivo promover la salud de la población representada por el individuo potencial y ésta investigación no puede realizarse en personas competentes y la investigación implica solo un riesgo y costos mínimos.
- 28.** Si un individuo potencial que participa en la investigación considerado incompetente es capaz de dar su asentimiento a participar o no en la investigación considerado incompetente es capaz de dar su asentimiento a participar o no en la investigación, el médico debe pedirlo, además del consentimiento del representante legal. El desacuerdo del individuo potencial debe ser respetado.
- 29.** La investigación en individuos que no son capaces física o mentalmente de otorgar consentimiento, por ejemplo los pacientes inconscientes, se puede realizar sólo si la condición física o mental que impide otorgar el consentimiento informado es una característica necesaria de la población

investigada. En estas circunstancias, el médico debe pedir el consentimiento informado del representante legal. Si dicho representante no está disponible y no se puede retrasarse la investigación, el estudio puede llevarse a cabo sin consentimiento informado, siempre que las razones específicas para incluir a individuos con una enfermedad que nos les permite otorgar consentimiento informado hayan sido estipuladas en el protocolo de la investigación y el estudio haya sido aprobado por un comité de ética de investigación. El consentimiento para mantenerse en la investigación debe obtenerse a la brevedad posible del individuo o de un representante legal.

- 30.** Los autores, directores y editores todos tienen obligaciones éticas con respecto a la publicación de los resultados de su investigación. Los autores tiene el deber de tener a la disposición del público los resultados de su investigación en seres humanos y son responsables de la integridad y exactitud de los informes. Debe aceptar las normas éticas de entrega de información. Deben publicar tanto los resultados negativos e inconclusos como los positivos o de lo contrario deben estar a la disposición del público. En la publicación deben citar las fuentes de financiamiento, afiliaciones institucionales y conflictos de intereses. Los informes sobre investigaciones que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.

### Principios aplicables cuando la investigación médica se combina con la atención médica

- 31.** El médico puede combinar la investigación médica con la atención médica, sólo en la medida en que tan investigación acredite un justificado valora potencial preventivo, diagnóstico o terapéutico y si el médico tiene buenas razones para creer que la a participación en el estudio no afectará de manera adversa la salud de los pacientes que toman parte de la investigación.

**32.** Los posibles beneficios, riesgos, costos y eficacia de toda intervención nueva deben ser evaluados mediante su comparación con la mejor intervención probada existente, excepto en las siguientes circunstancias:

- El uso de un placebo, o ningún tratamiento, es aceptable en estudios para los que no hay una intervención probada existente.
- Cuando por razones metodológicas, científicas y apremiantes, el uso de un placebo es necesario para determinar la eficacia y seguridad de una intervención que no implique un riesgo, efectos adversos graves o daño irreversible para los pacientes que reciben el placebo o ningún tratamiento. Se debe tener muchísimo cuidado para evitar abusar de esta opción.

**33.** Al final de la investigación, todos los pacientes que participan en el estudio tienen derecho a ser informados sobre sus resultados y compartir cualquier beneficio, por ejemplo, acceso a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o a otra atención apropiada o beneficios.

**34.** El médico debe informar cabalmente al paciente los aspectos de la atención que tiene relación con la investigación. La negativa del paciente a participar en una investigación o su decisión de retirarse nunca debe perturbar la relación médico-paciente.

**35.** Cuando en la atención de un enfermo las intervenciones probadas han resultado ineficaces o no existen, el médico después de pedir consejo de experto, con el consentimiento informado del paciente o de un representante legal autorizado, puede permitirse usar dichas intervenciones no comprobadas, si, a su juicio, ella da alguna esperanza de salvar la vida, restituir la salud o aliviar el sufrimiento. Siempre que sea posible, tales intervenciones deben ser investigadas a fin de evaluar su seguridad y eficacia. En todos los casos, esa información nueva debe ser registrada y, cuando se a oportuno, puesta a disposición del público.

**Anexo 12: Cuestionario SF 36**

El cuestionario SF 36 es una encuesta de salud diseñada por el Health Institute New England Medical Center, de Boston Massachusetts, que a partir de 36 preguntas pretende medir ocho conceptos genéricos sobre la salud, no específicos sobre una patología, sino a nivel global. Las puntuaciones de cada una de las 8 dimensiones del SF-36 oscilan entre los valores 0 y 100. Siendo 100 un resultado que indica una salud óptima y 0 reflejaría un estado de salud muy malo.

<b>Dimensión</b>	<b>Significado</b>
<b>Función física</b>	Grado en el que la falta de salud limita las actividades físicas de la vida diaria, como el cuidado personal, caminar, subir escaleras, coger o transportar cargas, y realizar esfuerzos moderados e intensos.
<b>Rol físico</b>	Grado en el que la falta de salud interfiere en el trabajo y otras actividades diarias, produciendo como consecuencia un rendimiento menor del deseado, o limitando el tipo de actividades que se puede realizar o la dificultad de las mismas.
<b>Dolor corporal</b>	Medida de la intensidad del dolor padecido y su efecto en el trabajo habitual y en las actividades del hogar.
<b>Salud general</b>	Valoración personal del estado de salud, que incluye la situación actual y las perspectivas futuras y la resistencia a enfermar.
<b>Vitalidad</b>	Sentimiento de energía y vitalidad, frente al de cansancio y desánimo.
<b>Función social</b>	Grado en el que los problemas físicos o emocionales derivados de la falta de salud interfieren en la vida social habitual.
<b>Rol emocional</b>	Grado en el que los problemas emocionales afectan al trabajo y otras actividades diarias, considerando la reducción del tiempo dedicado, disminución del rendimiento y del esmero en el trabajo.
<b>Salud mental</b>	Valoración de la salud mental general, considerando la depresión, ansiedad, autocontrol, y bienestar general.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**





## 8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Halverson AL, Hull TL, Fazio VW, Church J, Hammel J, Floruta C. Repair of recurrent rectovaginal fistulas. *Surgery* 2001 Oct; 130(4): 753-7; discussion 757-8.
- (2) Stecco C, Macchi V, Porzionato A, Tiengo C, Parenti A, Gardi M, et al. Histotopographic study of the rectovaginal septum. *Ital.J.Anat.Embryol.* 2005 Oct-Dec; 110(4):247-254.
- (3) Moore SW, Alexander A, Sidler D, Alves J, Hadley GP, Numanoglu A, et al. The spectrum of anorectal malformations in Africa. *Pediatr. Surg. Int.* 2008 Jun;24 (6):677-683.
- (4) Ekenze SO, Mbadiwe OM, Ezegwui HU. Lower genital tract lesions requiring surgical intervention in girls: perspective from a developing country. *J. Paediatr. Child Health* 2009 Oct;45(10):610-613.
- (5) Burgos L, Rivas S, Tovar JA. "Perineal canal": a rare anorectal malformation of variable complexity. *Eur.J.Pediatr.Surg.* 2008 Dec;18(6):392-394.
- (6) Singh S, Chandhiok N, Singh Dhillon B. Obstetric fistula in India: current scenario. *Int.Urogynecol.J.Pelvic Floor Dysfunct.* 2009 Dec;20(12):1403-1405.
- (7) Melah GS, Massa AA, Yahaya UR, Bukar M, Kizaya DD, El-Nafaty AU. Risk factors for obstetric fistulae in north-eastern Nigeria. *J.Obstet.Gynaecol.* 2007 Nov;27(8):819-823.
- (8) Hamilton S, Spencer C, Evans A. Vagino-rectal fistula caused by Bartholin's abscess. *J. Obstet. Gynaecol.* 2007 Apr;27(3):325-326.
- (9) Bassi R, Rademacher J, Savoia A. Rectovaginal fistula after STARR procedure complicated by haematoma of the posterior vaginal wall: report of a case. *Tech. Coloproctol* 2006 Dec;10(4):361-363.
- (10) Civelli EM, Gallino G, Valvo F, Cozzi G, Belli F, Bonfanti G, et al. Correlation between radiotherapy and suture fistulas following colo-anal anastomosis for carcinoma of the rectum evaluation of 152 consecutive patients. *Tumori* 2002 Jul-Aug;88(4):321-324.

- (11) Chung HJ, Goo BC, Lee JH, Bang D, Lee KH, Lee ES, et al. Behcet's disease combined with various types of fistula. *Yonsei Med. J.* 2005 Oct 31;46(5):625-628.
- (12) Chawla S, Smart CJ, Moots RJ. Recto-vaginal fistula: a refractory complication of Behcet's disease. *Colorectal Dis.* 2007 Sep;9(7):667-668.
- (13) Ley EJ, Vukasin P, Kaiser AM, Ault G, Beart RW. Delayed rectovaginal fistula: a potential complication of bevacizumab (avastin). *Dis. Colon Rectum* 2007 Jun;50(6):930.
- (14) Chereau E, Stefanescu D, Selle F, Rouzier R, Darai E. Spontaneous rectovaginal fistula during bevacizumab therapy for ovarian cancer: a case report. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2009 Jan;200(1):e15-6.
- (15) Shobeiri SA, Quiroz L, Nihira M. Rectovaginal fistulography: a technique for the identification of recurrent elusive fistulas. *Int. Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunct.* 2009 Jan 22.
- (16) Schmidt S, Chevallier P, Bessoud B, Meuwly JY, Felley C, Meuli R, et al. Diagnostic performance of MRI for detection of intestinal fistulas in patients with complicated inflammatory bowel conditions. *Eur. Radiol.* 2007 Nov;17(11):2957-2963.
- (17) Sombie I, Kambou T, Conombo SG, Sankara O, Ouedraogo L, Zoungrana T, et al. Retrospective study of urogenital fistula in Burkina Faso from 2001 to 2003. *Med. Trop. (Mars)* 2007 Feb;67(1):48-52.
- (18) Moore-Maxwell CA, Robboy SJ. Mucinous adenocarcinoma arising in rectovaginal fistulas associated with Crohn's disease. *Gynecol. Oncol.* 2004 Apr; 93(1):266-268.
- (19) Zinicola R, Nicholls RJ. Restorative proctocolectomy in patients with ulcerative colitis having a recto-vaginal fistula. *Colorectal Dis.* 2004 Jul;6(4):261-264.
- (20) Lefevre JH, Bretagnol F, Maggiori L, Alves A, Ferron M, Panis Y. Operative results and quality of life after gracilis muscle transposition for recurrent rectovaginal fistula. *Dis. Colon Rectum* 2009 Jul;52(7):1290-1295.

- (21) Lesalnieks I, Glass H, Kilger A, Ott C, Klebl F, Agha A, et al. Perianal fistulas in Crohn's disease: treatment results at an interdisciplinary unit. *Chirurg* 2009 Jun; 80(6):549-558.
- (22) Zimmerman DD, Delemarre JB, Gosselink MP, Hop WC, Briel JW, Schouten WR. Smoking affects the outcome of transanal mucosal advancement flap repair of trans-sphincteric fistulas. *Br. J. Surg.* 2003 Mar;90(3):351-354.
- (23) Ellis CN, Clark S. Effect of tobacco smoking on advancement flap repair of complex anal fistulas. *Dis. Colon Rectum* 2007 Apr;50(4):459-463.
- (24) Hannaway CD, Hull TL. Current considerations in the management of rectovaginal fistula from Crohn's disease. *Colorectal Dis.* 2008 Oct;10(8):747-55; discussion 755-6.
- (25) Ruffolo C, Penninckx F, Van Assche G, Vermeire S, Rutgeerts P, Coremans G, et al. Outcome of surgery for rectovaginal fistula due to Crohn's disease. *Br. J. Surg.* 2009 Oct;96(10):1190-1195.
- (26) Levy C, Tremaine WJ. Management of internal fistulas in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2002 Mar;8(2):106-111.
- (27) Sands BE, Blank MA, Patel K, van Deventer SJ, ACCENT II Study. Long-term treatment of rectovaginal fistulas in Crohn's disease: response to infliximab in the ACCENT II Study. *Clin.Gastroenterol.Hepatol.* 2004 Oct;2(10):912-920.
- (28) Andreani SM, Dang HH, Grondona P, Khan AZ, Edwards DP. Rectovaginal fistula in Crohn's disease. *Dis. Colon Rectum* 2007 Dec;50(12):2215-2222.
- (29) Ruffolo C, Scarpa M, Bassi N, Angriman I. A systematic review on advancement flaps for rectovaginal fistula in Crohn's disease: transrectal versus transvaginal approach. *Colorectal Dis.* 2009 Aug 5.
- (30) Li Destri G, Scilletta B, Tomaselli TG, Zarbo G. Rectovaginal fistula: a new approach by stapled transanal rectal resection. *J. Gastrointest. Surg.* 2008 Mar;12(3):601-603.
- (31) John BK, Cortes RA, Feinerman A, Somnay K. Successful closure of a rectovaginal fistula by using an endoscopically placed Resolution clip. *Gastrointest. Endosc.* 2008 Jun;67(7):1192-1195.

- (32) Lindsey I, Smilgin-Humphreys MM, Cunningham C, Mortensen NJ, George BD. A randomized, controlled trial of fibrin glue vs. conventional treatment for anal fistula. *Dis. Colon Rectum* 2002 Dec;45(12):1608-1615.
- (33) Loungnarath R, Dietz DW, Mutch MG, Birnbaum EH, Kodner IJ, Fleshman JW. Fibrin glue treatment of complex anal fistulas has low success rate. *Dis. Colon Rectum* 2004 Apr;47(4):432-436.
- (34) Ellis CN. Bioprosthetic plugs for complex anal fistulas: an early experience. *J. Surg. Educ.* 2007 Jan-Feb;64(1):36-40.
- (35) Darwood RJ, Borley NR. TEMS: An alternative method for the repair of benign recto-vaginal fistulae. *Colorectal Dis.* 2008 Jul;10(6):619-620.
- (36) Vavra P, Dostalík J, Vavrova M, Gunkova P, Pai M, El-Gendi A, et al. Transanal endoscopic microsurgery: a novel technique for the repair of benign rectovaginal fistula. *Surgeon* 2009 Apr;7(2):126-127.
- (37) Lichtenstein GR., Hanauer SB, Sandborn W; Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol.* 2001 Mar;96(3):635-43.
- (38) Kulshrestha S, Kulshrestha M, Singh B, Sarkar B, Chandra M, Gangopadhyay AN. Anterior sagittal anorectoplasty for anovestibular fistula. *Pediatr. Surg. Int.* 2007 Dec;23(12):1191-1197.
- (39) Songne K, Scotte M, Lubrano J, Huet E, Lefebure B, Surlemont Y, et al. Treatment of anovaginal or rectovaginal fistulas with modified Martius graft. *Colorectal Dis.* 2007 Sep;9(7):653-656.
- (40) Cui L, Chen D, Chen W, Jiang H. Interposition of vital bulbocavernosus graft in the treatment of both simple and recurrent rectovaginal fistulas. *Int. J. Colorectal Dis.* 2009 Nov;24(11):1255-1259.
- (41) Wexner SD, Ruiz DE, Genua J, Noguerras JJ, Weiss EG, Zmora O. Gracilis muscle interposition for the treatment of rectourethral, rectovaginal, and pouch-vaginal fistulas: results in 53 patients. *Ann.Surg.* 2008 Jul;248(1):39-43.
- (42) Gonzalez-Contreras QH, Castaneda-Argaiz R, Rodriguez-Zentner HA, Tapia-Cid de Leon H, Mejia-Ovalle RR, Espinosa-de Los Monteros A.

Transposition of gracilis muscle for treatment of recurrent anal and rectovaginal fistula. *Cir.Cir.* 2009 Jul-Aug;77(4):319-21; 297-9.

(43) Soper JT, Havrilesky LJ, Secord AA, Berchuck A, Clarke-Pearson DL. Rectus abdominis myocutaneous flaps for neovaginal reconstruction after radical pelvic surgery. *Int.J.Gynecol.Cancer* 2005 May-Jun;15(3):542-548.

(44) Pye PK, Dada T, Duthie G, Phillips K. Surgisistrade mark mesh: a novel approach to repair of a recurrent rectovaginal fistula. *Dis.Colon Rectum* 2004 Sep;47(9):1554-1556.

(45) Walfisch A, Zilberstein T, Walfisch S. Rectovaginal septal repair: case presentations and introduction of a modified reconstruction technique. *Tech. Coloproctol* 2004 Nov;8(3):192-194.

(46) Shelton AA, Welton ML. Transperineal repair of persistent rectovaginal fistulas using an acellular cadaveric dermal graft (AlloDerm). *Dis.Colon Rectum* 2006 Sep;49(9):1454-1457.

(47) Ellis CN. Outcomes after repair of rectovaginal fistulas using bioprosthesis. *Dis.Colon Rectum* 2008 Jul;51(7):1084-1088.

(48) Caquant F, Collinet P, Debodinance P, Berrocal J, Garbin O, Rosenthal C, et al. Safety of Trans Vaginal Mesh procedure: Retrospective study of 684 patients. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2008 Aug;34(4):449-456.

(49) Schwandner O, Fuerst A, Kunstreich K, Scherer R. Innovative technique for the closure of rectovaginal fistula using Surgisis mesh. *Tech.Coloproctol* 2009 Jun;13(2):135-140.

(50) Lee DT, Lee GK. Transverse Singapore flap for reconstruction of a congenital rectovaginal fistula in an 18-month-old infant. *Ann.Plast.Surg.* 2009 Dec;63(6):650-653.

(51) Penninckx F, Moneghini D, D'Hoore A, Wyndaele J, Coremans G, Rutgeerts P. Success and failure after repair of rectovaginal fistula in Crohn's disease: analysis of prognostic factors. *Colorectal Dis.* 2001 Nov;3(6):406-411.

(52) Galandiuk S, Kimberling J, Al-Mishlab TG, Stromberg AJ. Perianal Crohn disease: predictors of need for permanent diversion. *Ann. Surg.* 2005 May;241(5):796-801; discussion 801-2.

- (53) Piekarski JH, Jereczek-Fossa BA, Nejc D, Pluta P, Szymczak W, Sek P, et al. Does fecal diversion offer any chance for spontaneous closure of the radiation-induced rectovaginal fistula? *Int. J. Gynecol. Cancer* 2008 Jan-Feb; 18 (1): 66-70.
- (54) Yan-Fei Zhu, Guo-Qing Tao, Ning Zhou, Chen Xiang. *World J Gastroenterol* 2011 February 28; 17(8): 963-967
- (55) Ciga M.A., Oteiza F., Marzo J., Armendáriz P., De Miguel M., Ortiz.H. Treatment of perianal Crohn's disease. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2006; 29 (3): 367-386.
- (56) Van Assche G, Vanbeckevoort D, Bielen D, et al. Magnetic resonance imaging of the effects of Infliximab on perianal fistulizing Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(2): 332-9.
- (57) Ursing B, Kamme C. Metronidazole for Crohn's disease. *Lancet* 1975; 1: 775-7.
- (58) Bernstein LH, Frank MS, Brandt LJ, Boley SJ. Healing of perineal Crohn's disease with metronidazole. *Gastroenterology* 1980; 79(2): 357-65.
- (59) Peppercorn MA. Is there a role for antibiotics as primary therapy in Crohn's ileitis? *J Clin Gastroenterol* 1993; 17(3): 235-7.
- (60) Turunen U, Farkkila M, Valtonen V. Long-term outcome of ciprofloxacin treatment in severe perianal or fistulous Crohn's disease. *Gastroenterology* 1993; 104: A793.
- (61) Dejaco C, Harrer M, Waldhoer T, Miehsler W, Vogelsang H, Reinisch W. Antibiotics and azathioprine for the treatment of perianal fistulas in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18(11-12): 1113.
- (62) Nos Mateu P. Corticoides de acción «local» en la enfermedad inflamatoria intestinal. ¿Son eficaces? ¿Son realmente menos tóxicos?. *Gastroenterol Hepatol.* 2008;31(Supl 3):16-21
- (63) Guillermo B, Muñoz F. Corticoides sistémicos en las enfermedades inflamatorias intestinales: ¿son realmente eficaces? ¿Cuál es su toxicidad real?. *Gastroenterol Hepatol.* 2008;31(Supl 3):3-9

- (64) Rodrigo Saez L. Infliximab in Crohn's disease. *Rev esp enferm dig* vol. 96, n.º 6, pp. 359-368, 2004.
- (65) D.A. Schwartz, C.R. Herdman The Medical Treatment of Crohn's Perianal Fistulas. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;19(9)
- (66) Aydin F., Ferdinand Eisenberger C., Raffel A., Rehders A., Benedikt Hosh S., Trudo Knoefel W. Recurrent fistula between ileal pouch and vagina-successful treatment with a gracilis muscle flap. *Case reports in Medicine.* Volume 2009, art ID 676394.
- (67) Hernández Ramírez P, Dorticós Balea E. Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. *Revista Cubana Hematología* 2004; 20(3)
- (68) Prosper F, Verfaillie CM. Células madre adultas. *An Sist Sanit Navar* 2003;26:345-56.
- (69) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-González XP, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-9.
- (70) Fu X, Sun X, Li X, Sheng Z. Dedifferentiation of epidermal cells to stem cells in vivo. *Lancet* 2001;358:1067.
- (71) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-González XP, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-9.
- (72) Hawkey, Snowden, Lobo, et al. Stem cell transplantation for inflammatory bowel disease: practical and ethical issues. *Gut* 2000 46: 869-872
- (73) R. K. Burt, A. Traynor, Y Oyama, R. Craig. High-dose immune suppression and autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory Crohn disease. *Blood.* 2003 101: 2064. 2066
- (74) deBeche-Adams T H., Bohl J L., Rectovaginal Fistulas. *Clin Colon Rectal Surg.* 2010; 23 (2): 99-103.
- (75) Fernández Albor G. Historia sucinta de la proctología. En: Lentini J. *Temas de Coloproctología.* Tomo I. Foltalba. Barcelona, España 1982. pp 25 - 32.
- (76) Viso Pons L. Primeras citas de una Historia. La proctología en el antiguo Egipto. *Rev Esp Enf Dig.* 1991; 79 (3): 227 - 231.



- (77) Viso Pons L. Análisis de una herencia básica. Hipócrates y la Proctología. *Re Esp Enf Dig.* 1992; 80 (5): 348 - 351.
- (78) Boyet J. Ces malades qui nous gouvernaient. Le fistule de Louis XIV. *Prat Méd Quot.* 1985; 227: 1 - 3.
- (79) Gèrard A. De la Gastroentérologie à la politique. La fistule du grand Roi. *Larc Méd.*1983; 3(5): 341 - 348
- (80) García Olmo, D; García Arranz, M.; Gómez García, L; Serna Cuellar, E.; Asensio Prianes, L.; et al. Autologous stem cell transplantation for treatment of recto-vaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy. *Int.J. Colorectal Dis,* 18 (5): 451-4. 2003.
- (81) García Olmo, D; García Arranz, M.; Herreros Marcos, D; Peiró C.; Blázquez Martínez, A.; RodríguezMontes M.D. Feasibility and safety of a Phase I clinical trial for the treatment of Crohn's fistula by autologous adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis. Colon Rectum* 2005; 48(7):1416-1423.
- (82) Herreros Marcos D, Garcia-Arranz M,Pascual Miguelañez I, Garcia-Olmo D. The role of stem cells in suppurative environments. *Experimental Dermatology* 2006, 15 (6): 482.
- (83) Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual M, Garcia-Arranz M. Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: A comparison of protocols with and without expansion. *Int J Colorectal Dis* 2008.
- (84) Díaz-Agero P, García-Arranz M, Hristov T, García-Olmo D. A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells: a case report. *Thorax* 2008 63(4):374-6
- (85) Villalta M., Dégado I. R., Bagó J., Gould D. , Santos M., García-Arranz M., Ayats R. , Fuster C., Chernajovsky Y. , García-Olmo D., Rubio N. , Blanco J. Biodistribution, long term survival and safety of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells in nude mice by non-invasive bioluminescence imaging.2008 *Stem Cells and Development* 17(5):993-1003
- (86) Garcia-Olmo, D. Herreros, I. Pascual, J. M. Pascual, E. Del-Valle, J. Zorrilla, P. De-La-Quintana, M. Garcia-Arranz, M. Pascual. Expanded adipose-



derived stem cells (cx401) for the treatment of complex perianal fistula. A phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 2008.

(87) Pascual I, De Miguel Fernández G, García-Arranz M, De Miguel Pedrero F, García-Olmo D. Adipose-derived mesenchymal stem cells in biosutures do not improve healing of rat colonic anastomoses. *2008 Br J Surg*.2008;95(9):1180-4.

(88) García-Olmo D, Trébol J, Herreros D, Garcia-Arranz M, Gonzalez M. Treatment of fistulas using adipose-derived stem cells. *Cell therapy* . Ed. Mac Graw Hill. Madrid 2007

(89) García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2008; 8(9):1417-23.

(90) Pearson, D. C.; May, G. R.; Fick, G. H.; and Sutherland, L. R.: Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis. *Ann Intern Med*, 123(2): 132-42, 1995.

(91) Sandborn, W. J.; Fazio, V. W.; Feagan, B. G.; and Hanauer, S. B.: AGA technical review on perianal Crohn's disease. *Gastroenterology*, 125(5): 1508-30, 2003.

(92) Egan, L. J.; Sandborn, W. J.; Tremaine, W. J.: Clinical outcome following treatment of refractory inflammatory and fistulizing Crohn's disease with intravenous cyclosporine. *Am J Gastroenterol*, 93(3): 442-8, 1998.

(93) Gurudu, S. R.; Griffel, L. H.; Gialanella, R. J.; Das, K. M.: Cyclosporine therapy in inflammatory bowel disease: short-term and long-term results. *J Clin Gastroenterol*, 29(2): 151-4, 1999.

(94) Present, D. H., Lichtiger, S.: Efficacy of cyclosporine in treatment of fistula of Crohn's disease. *Dig Dis Sci*, 39(2): 374-80, 1994.

(95) Sandborn, W. J. et al.: Tacrolimus for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease: a randomized, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, 125(2): 380-8, 2003.

(96) Sandborn, W. J., and Hanauer, S. B.: Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents, pharmacology, clinical results, and safety. *Inflamm Bowel Dis*, 5(2): 119-33, 1999.

- (97) Present, D. H. et al.: Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med*, 340(18): 1398-405, 1999.
- (98) Morelli, J., Wilson, F.A.: Does administration of Infliximab increase susceptibility to listeriosis? *Am J Gastroenterol*, 95(3): 841-2, 2000.
- (99) Schwieterman, W.D.; Siegel, J.N.; Braun, M.M.: Tuberculosis associated with Infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med*, 345(15): 1098-104, 2001.
- (100) Warris, A.; Bjorneklett, A.; Gaustad, P.: Invasive pulmonary aspergillosis associated with Infliximab therapy. *N Engl J Med*, 344(14): 1099- 100, 2001.
- (101) Kamath B.M.; Mamula, P.; Baldassano, R.N.; Markowitz, J.E.: Listeria meningitis after treatment with Infliximab. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 34(4): 410-2, 2002.
- (102) Nakelchik M., Mangino, J.E.: Reactivation of Histoplasmosis after treatment with Infliximab. *Am J Med*, 112(1): 78, 2002.
- (103) Poritz, L.S.; Rowe, W.A.; Koltun, W.A.: Remicade does not abolish the need for surgery in fistulizing Crohn's disease. *Dis Colon Rectum*, 45(6): 771-5, 2002.
- (104) Sandborn, W.J., Hanauer, S.B.: Infliximab in the treatment of Crohn's disease: a user's guide for clinicians. *Am J Gastroenterol*, 97(12): 2962-72, 2002.
- (105) Sands, B.E. et al.: Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med*, 350(9): 876-85, 2004.
- (106) García-Olmo D., Herreros D., De-La-Quintana P., Guadalajara H., Trebol J., Georgiev- Hirstov T., García-Arranz M. Adipose-Derived Stem Cells in Crohn's Rectovaginal Fistula. Case report in Medicine. Vol 2010, art ID 961758. 10.1155/2010/961758.
- (107) Keane, J., Gershon, S., Wise, R.P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., McNamara, D. A., Brophy, S., Hyland, J. M.: Perianal Crohn's disease and Infliximab therapy. *Surgeon*, 2(5): 258-63, 2004.

- (108) Rasul, I.; Wilson, S.R.; MacRae, H.; Irwin, S.; Greenberg, G.R.: Clinical and radiological responses after Infliximab treatment for perianal fistulizing Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 99(1): 82-8, 2004.
- (109) Sands, B.E.; Blank, M.A.; Patel, K.; Van Deventer, S.J.: Long-term treatment of rectovaginal fistulas in Crohn's disease: response to Infliximab in the ACCENT II Study. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2(10): 912-20, 2004.
- (110) Tozer P, Ng SC, Siddiqui MR, Plamondon S, Burling D, Gupta A, Swatton A, Tripoli S, Vaizey CJ, Kamm MA, Phillips R, Hart A. Long-term MRI-guided combined anti-TNF- $\alpha$  and Thiopurine therapy for Crohn's perianal fistulas. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Jan 4. doi: 10.1002/ibd.21940.
- (111) Tabry H, Farrands PA. Update on anal fistulae: Surgical perspectives for the gastroenterologist. *Can J Gastroenterol*. 2011 Dec;25(12):675-80.
- (112) Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L., Büscher D., Delgado M. Adipose-derived Mesenchymal stem Cells Alleviate Experimental Colitis by Inhibiting Inflammatory and Autoimmune Responses. *Gastroenterology* (2009)136, 978-89.
- (113) Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N. O'Valle F., Hernandez. Cortes P., Rico L., Büscher D., Delgado M. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T-cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. (2009)
- (114) Taxonera C, Schwartz DA, García-Olmo D. Emerging treatments for complex perianal fistula in Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2009;15:4263-72.
- (115) Hayashi R, Ishikawa Y, Ito M, Kageyama T, Takashiba K, et al. (2012) Generation of Corneal Epithelial Cells from Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Human Dermal Fibroblast and Corneal Limbal Epithelium. *PLoS ONE* 7(9): e45435. doi:10.1371/journal.pone.0045435.
- (116) Gurdon, JB (1962). *Dev. Biol.* 4:256-273.
- (117) Gurdon J (1962). *J Embryol. Exp. Morph.* 10:622-640.
- (118) Takahashi K, Yamanaka S (2006) *Cell* 126(4):663-676.

- (119) Han Yoo J, Ho Shin J., Sung An W., Kwun Ha T., Hee Kim k., Beom Bae K., Hyeon Kim T., Soo Choi C., Hee Hong K., Kim J., Jin Jung S., Hee Kim S., Hwan Rhon K., Tae Kim J., Il Yang Y., Adipose-tissue-derived Stem Cells Enhance the Healing of Ischemic Colonic Anastomoses: An Experimental Study in Rats. *J Korean Soc Coloproctol* 2012;28(3):132-139.
- (120) Guo Y, Lu N, Bai A. Treatment of inflammatory bowel disease with neural stem cells expressing choline acetyltransferase. 2012 Nov; *79(5)*:627-9. doi: 10.1016/j.mehy.2012.07.038. Epub 2012 Aug 24.
- (121) Herreros, M.D., Garcia-Arranz M., Guadalajara H., De-La-Quintana P., Garcia-Olmo D., and the FATT Collaborative Group. Autologous Expanded Adipose-Derived Stem Cells for the Treatment of Complex Cryptoglandular Perianal Fistulas: A Phase III Randomized Clinical Trial (FATT 1: Fistula Advanced Therapy Trial 1) and Long-term Evaluation. *Diseases of the Colon & Rectum* Volume 55: 7 (2012).
- (122) Langman et al. *Embriología médica con orientación clínica*. 9ª edición. Editorial Panamericana. Capítulo 2. Pag 333-338.
- (123) García-Paredes J., Peña A.S. Aproximación de la enfermedad inflamatoria intestinal crónica a comienzos del nuevo siglo.
- (124) Platell C, Mackay J, Collopy B, Fink R, Ryan P, Woods R. Anal pathology in patients with Crohn's disease. *Aust N Z J Surg* 1996; 66: 5-9.
- (125) Hughes L.E. Surgical pathology and management of anorectal Crohn's disease. *J Roy Soc Med* 644–651.
- (126) Scott A. Strong, M.D., Walter A. Koltun, M.D., Neil H. Hyman, M.D., W. Donald Buie, M.D., and the Standards Practice Task Force of The American Society of Colon and Rectal Surgeons. Practice Parameters for the Surgical Management of Crohn's Disease. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 1735–1746.
- (127) Parks A.G., Gordon P.H., Hardcastle J.D. A classification of fistula-in-ano. *Br J Surg* 1976; 63(1): 1-12.
- (128) Crohn's disease. Artículo obtenido en <http://www.mayoclinic.com/health/crohns-disease/DS00104> consultado el 02/01/2013.

- (129) Burra P, Bizzaro D, Ciccocioppo R, Marra F, Piscaglia AC, Porretti L, Gasbarrini A, Russo FP. Therapeutic application of stem cells in gastroenterology: an up-date. *World J Gastroenterol*. 2011 Sep 14;17(34):3870-80. doi: 10.3748/wjg.v17.i34.3870.
- (130) Ciccocioppo R., Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C, Minelli A, Alvisini C, Vanoli A, Calliada F, Dionigi P, Perotti C, Locatelli F, Corazza GR. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut* 2011 Jun; 60 (6): 788-98
- (131) Cho YB, Cho HH, Jang S, Jeong HS, Park JS. Transplantation of Neural Differentiated Human Mesenchymal Stem Cells into the Cochlea of an Auditory-neuropathy Guinea Pig Model. *J Korean Med Sci*. 2011 April; 26(4): 492–498.
- (132) Cho YB, Lee WY, Park KJ, Kim M, Yoo HW, Yu Cs. Autologous adipose tissue-derived stem cells for the treatment of Crohn's fistula: A Phase I clinical study. *Cell Transplant* 2012 Sept 21.
- (133) Hughes LE. Clinical classification of perianal Crohn's diseases. *Dis Colon Rectum* 1992; 35: 928-932.
- (134) de la Portilla F, Alba F, García-Olmo D, Herrerías JM, González FX, Galindo A. Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: results from a multicenter phase I/IIa clinical trial. *Int J Colorectal Dis*. 2012 Sep 29.
- (135) Casteilla L., Planat-Benard V., Laharrague P., Cousin B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells* 2011 April 26; 3(4): 25-33.
- (136) Zuk P.A. The Adipose-derived Stem Cell: Looking Back and Looking Ahead. *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 21, 1783–1787, June 1, 2010