

RAD: 8-78392- -9	FECHA: 2013-02-08 17:04:53
DEP: 2020 DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	EVE: 378 FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I
TRA: 11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	FOLIOS: 5
ACT: 519 PRESENTACION	

Abogado(a)/Señor(a)
DILIA MARIA RODRIGUEZ D´ALEMAN
NOTIFICACIONES@CLARKEMODET.COM.CO

Asunto:	Radicación:	8-78392- -9
	Trámite:	11
	Evento:	378
	Actuación:	519
	Oficio:	2543
	Folios:	5

Patente de Invención	X			Patente de Modelo de Utilidad	
Vía Nacional					
Vía PCT (Fase Nacional)	X	Capítulo I	X	Capítulo II	
No. Solicitud Internacional	pct/jp2007/051887				
Fecha de Presentación Internacional	05/02/2007				

Mediante oficio N° 22732 notificado por fijación en lista de fecha del 18 de diciembre del 2012 este Despacho en forma equivocada requirió a la doctora Jimena Escobar Uribe en los términos del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, para que dentro del plazo de sesenta días presentara respuesta a las observaciones de carácter técnico relacionadas con la patentabilidad o cumplimiento de los requisitos establecidos por esta Decisión, para la concesión de la patente que se tramita dentro del expediente de la referencia.

Teniendo en cuenta que mediante escrito radicado en esta entidad el 09 de marzo del 2010 bajo el número 08-078392-00004-0000, previamente la doctora Jimena Escobar Uribe informa el cambio de apoderado del solicitante a la doctora Dilia Rodríguez D´Alemán, adjuntando para tal efecto el documento de sustitución de poder debidamente diligenciado, es procedente revocar en su totalidad el oficio N° 22732 de fecha del 18 de diciembre del 2012 y en su lugar efectuar un nuevo requerimiento, en los siguientes términos:

Descripción:	Folios 09 a 30	29/julio/2008
Reivindicaciones:	Folios 31 a 36	29/julio/2008
	Folios 109	04/octubre/2012
Prioridad:	JP 2006 027 833	06/febrero/2006

2do Art 45

Se acepta la reivindicación de Prioridad porque esta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Objeto de la invención

De acuerdo con lo establecido en el numeral 1.2.2.2 del capítulo primero del Título 10 de la Circular Única para efectos del examen de patentabilidad, se tendrá en cuenta la tasa pagada por el solicitante al momento de comenzar el examen para las reivindicaciones adicionales; esto es que cuando la solicitud contenga más de diez (10) reivindicaciones y no se haya pagado la tasa complementaria, sólo se estudiarán las cubiertas por la tasa pagada. En el presente caso se estudiarán las reivindicaciones 1 a 2 del capítulo reivindicatorio (Fl. 109).

Título de la solicitud: “Agente terapéutico para la enfermedad de inflamación del intestino que contiene como ingrediente activo derivado de 2-amino-1,3-propanediol” (modificado en el folio 100).

El problema planteado en esta solicitud consiste en suministrar compuestos alternativos útiles para tratar enfermedades inflamatorias del intestino.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona una composición farmacéutica para una enfermedad inflamatoria del intestino que contiene, 2-amino-2-[4-(3-benciloxifeniltio)-2-clorofenil] etil-1,3-propanodiol, o un clorhidrato, acetato, trifluoroacetato, metanosulfonato, citrato o tartrato o hidrato del mismo en combinación con uno o más agentes terapéuticos.

El objeto de la presente Solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): A61K 31/137

4. Determinación del Estado de la Técnica

El Estado de la Técnica se determinó con base en la fecha de Presentación de la Solicitud de Prioridad: 06 de febrero de 2006 y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D3	Takahashi M. et al	A Novel Immunomodulator KRP-203 Combined With Cyclosporine Prolonged Graft Survival and Abrogated Transplant Vasculopathy in Rat Heart Allografts	Enero 2005
D4	Gisbert, Javier P.	Tratamiento farmacológico de en la enfermedad de Crohn	08/Febrero/2001

El documento D3¹ revela la necesidad de encontrar estrategias inmunosupresoras más eficaces y menos tóxicas para los pacientes de trasplante de órganos. Además, muestra los efectos en la supervivencia del aloinjerto de corazón de rata de un agonista de receptor de esfingosina-1-fosfato, KRP-203, en combinación con una dosis subterapéutica de ciclosporina (CsA) (resumen). Y revela que KRP-203 en combinación con una dosis subterapéutica de CsA conduce a una supervivencia prolongada del aloinjerto. Además revela la combinación de CsA con KRP-203 puede proporcionar una opción para prevenir el rechazo de aloinjertos y reducir los efectos adversos.

El documento D4² revela el tratamiento farmacológico que se emplea en la enfermedad de Crohn.

5. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Novedad (Art 16 D486)

La reivindicación 1 consiste en una composición farmacéutica para una enfermedad inflamatoria

¹ <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041134504015465>
² http://www.eiialdia.com/VolumenesPDF/EII%20vol%204%202005/Vol4_num3.pdf#page=23
Expediente 8-78392- -9 2do Art 45

del intestino que contiene, 2-amino-2-[4-(3-benciloxifeniltio)-2-clorofenil] etil-1,3-propanodiol, ver folio 109.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D3
una composición farmacéutica para una enfermedad inflamatoria del intestino que contiene, 2-amino-2-[4-(3-benciloxifeniltio)-2-clorofenil] etil-1,3-propanodiol I, o un clorhidrato, acetato, trifluoroacetato, metanosulfonato, citrato o tartrato o hidrato del mismo	KRP-203 (2-amino-2-[4-(3-benciloxifeniltio)-2-clorofenil] etil-1,3-propanodiol I) como nuevo agonista de los receptores de esfingosina-1-fosfato
En combinación con uno o más agentes terapéuticos para una enfermedad inflamatoria del intestino, seleccionado del grupo que consiste de la mesalazina, olsalazina, sulfasalazina, balsalazida, hidrocortisona, metilprednisolona, budesonida, betametasona fosfato, azatioprina, 6-mercaptopurina, ciclosporina , tacrolimus, anti-TNF-alfa y anti-integrina alfa4	Combinado con una dosis de ciclosporina

Las características **esenciales** de la composición de la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en D3, el cual enseña el efecto que contiene KRP-203 y ciclosporina, demostrando que un inmuno-modulador KRP-203 en combinación con una dosis subterapéutica de CsA sinérgicamente prolonga la supervivencia de ratas con aloinjerto de corazón. Los presentes hallazgos sugieren que la terapia de combinación de un inhibidor de la calcineurina con KRP-203 tiene potencial como estrategia inmunosupresora novedosa, no sólo para prevenir el rechazo de aloinjertos, sino también para reducir los efectos adversos en los pacientes sometidos a trasplante de órganos (pág. 145)

En consecuencia, la reivindicación 1 no es nueva ó carece de novedad, según lo divulgado en el documento D3.

La reivindicación dependiente 2 no menciona alguna característica que hagan nueva a las composiciones de la reivindicación 1, por lo cual se considera que no son nuevas.

Nivel Inventivo (Art18 D486)

La reivindicación 1 consiste en una composición farmacéutica para una enfermedad inflamatoria del intestino que contiene, 2-amino-2-[4-(3-benciloxifeniltio)-2-clorofenil] etil-1,3-propanodiol, ver folio 109.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D3	D4
una composición farmacéutica para una enfermedad inflamatoria del intestino que contiene, 2-amino-2-[4-(3-benciloxifeniltio)-2-clorofenil] etil-1,3-propanodiol I, o un clorhidrato, acetato, trifluoroacetato, metanosulfonato, citrato o tartrato o hidrato del mismo	KRP-203 (2-amino-2-[4-(3-benciloxifeniltio)-2-clorofenil] etil-1,3-propanodiol I) como nuevo agonista de los receptores de esfingosina-1-fosfato	
En combinación con uno o más agentes terapéuticos para una enfermedad inflamatoria del intestino, seleccionado del grupo que consiste de la mesalazina, olsalazina, sulfasalazina, balsalazida, hidrocortisona, metilprednisolona, budesonida, betametasona fosfato, azatioprina, 6-mercaptopurina, ciclosporina, tacrolimus, anti-TNF-alfa y anti-integrina alfa4	Combinado con una dosis de ciclosporina	Sulfasalazina, mesalazina, glucocorticoides, ciprofloxacina, infliximab (anti.TNFalfa), tacrolimus, azatioprina, 6-mercaptopurina,

El documento D4 se considera el documento más cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulga el tratamiento farmacológico de la enfermedad de Crohn, mientras que D3 divulga una combinación de compuestos que actúan modulando el sistema inmune que contienen el compuesto KRP-203.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y la composición farmacéutica de D4 consiste en el compuesto KRP-203.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y la composición farmacéutica de D3 consiste en el grupo de compuestos diferentes a la ciclosporina que pueden acompañar al compuesto KRP-203 (mesalazina, olsalazina, sulfasalazina, balsalazida, hidrocortisona, entre otros).

El efecto que logra el incluir el KRP-203 es mejorar la modulación de la respuesta inmune por lo cual es más eficiente en el tratamiento de la colitis ulcerosa.

Por lo tanto, el Problema Técnico Objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “cómo modificar las combinaciones y/o composiciones reveladas en D4 para modular la respuesta inmune hacerla más eficiente en el tratamiento de la colitis ulcerosa”.

Sin embargo, la utilización de la combinación del compuesto KRP-203 con ciclosporina ya había sido revelada por D3 en el cual se presenta como una mezcla con buenos resultados como modulador de la respuesta inmune.

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia habría incluido el compuesto KRP-203 revelado por D3 en combinación con otros compuestos de D4 para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

Conclusión:
La reivindicación 1 no cumple con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

6. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud están afectados así:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D3	Takahashi M. et al	1-2	Novedad/Nivel Inventivo
D4	Gisbert, Javier P.	1-2	Novedad/Nivel Inventivo

7. Respuesta a los argumentos del señor solicitante

Argumentos con respecto al estudio de novedad:

El solicitante afirma que: “...las características mostradas en el nuevo capítulo reivindicatorio modificado, especialmente la reivindicación 1 no son enseñadas ni sugeridas en la anterioridad D1.

Se considera que el documento D1 no afecta la novedad de la reivindicación modificada presentada en respuesta al oficio 12513.

Argumentos con respecto al estudio de nivel inventivo:

El solicitante afirma: “el KRP-203 tiene efecto superior sobre la enfermedad crónica de Chron (o colitis ulcerosa), que no se puede esperar sobre la base de los resultados de inmunocupresores comunes. Estos hechos no se enseñan o sugieren en D1 ni D2, y en consecuencia, el efecto ventajoso de la presente invención no se puede esperar sobre la base de las descripciones de D1 o D2”.

Se aclara que los documentos D1 y D2 no sugiereb el efecto inesperado del compuesto KRP-203 sobre la enfermedad de Crohn.

El solicitante afirma: “...D1 y D2 no enseñan o sugieren que KRP-203 tengan su efecto en la IBD grave, y en consecuencia, el efecto ventajoso de la presente invención no se puede esperar sobre la base de las descripciones D1 y D2”.

Se considera que los documentos D1 y D2 no afectan el nivel inventivo de la composiciones reclamadas en las reivindicaciones 1 y 2 modificadas.

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante de sesenta (60) días para dar respuesta a este requerimiento y presentarla por escrito.

Finalmente, se le recuerda al solicitante que si como respuesta a este requerimiento llegara a modificar el capítulo reivindicatorio y éste contenga más de diez (10) reivindicaciones, no pagará la tasa de modificación voluntaria pero sí la correspondiente al pago por reivindicación adicional.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 2013-02-12

Elaboró: Jeny Paola Villate Becerra

Revisó: Consuelo Leguizamon Leguizamon

A Novel Immunomodulator KRP-203 Combined With Cyclosporine Prolonged Graft Survival and Abrogated Transplant Vasculopathy in Rat Heart Allografts

M. Takahashi, H. Shimizu, T. Murakami, S. Enosawa, C. Suzuki, Y. Takeno, Y. Hakamata, S. Kudou, S. Izawa, T. Yasue, and E. Kobayashi

ABSTRACT

To find more effective and less toxic immunosuppressive strategies in long-term treatment for organ transplantation patients, we examined the effects on rat heart allograft survival of a novel sphingosine-1-phosphate receptor agonist, KRP-203, combined with a subtherapeutic dose of cyclosporine (CsA). Rat heart transplantation was performed across a major histocompatibility complex-incompatible (DA to LEW) rat combination. KRP-203 alone showed little or no effect on heart allograft survival. In contrast, KRP-203 combined with a subtherapeutic dose of CsA led to prolonged allograft survival. Histologic analyses showed that the combination completely suppressed acute rejection, as characterized by allograft vasculopathy, mononuclear cell infiltration, and myocardial necrosis in the heart allografts. RT-PCR analysis showed that the allografts treated with CsA or KRP-203 alone showed no suppression of IL-10, IFN- γ , and TNF- α mRNA expression, but when combined with a subtherapeutic dose of CsA it completely suppressed their mRNA expressions. Furthermore, the combination treatment reduced donor-specific antibody production. KRP-203 combined with a subtherapeutic dose of CsA synergistically prolonged rat heart allograft survival. The combination of CsA with KRP-203 may provide an option to prevent allograft rejection and reduce adverse effects.

IN SPITE OF improvements in short-term survival stemming from the use of calcineurin inhibitors, such as cyclosporine (CsA) and tacrolimus (FK506), clinical organ transplantation has not achieved its goals as a long-term treatment for patients suffering from end-stage organ failure. Chronic vasculopathy, which is characterized by neointimal formation and perivascular inflammatory cell infiltration, is now recognized as the primary cause of allograft failure after the first posttransplant year.¹⁻³ Also, long-term use of calcineurin inhibitors produces adverse effects, such as nephrotoxicity, hypertension, and hyperlipidemia, which may accelerate the onset of chronic vasculopathy.⁴ The current immunosuppressive protocol for organ transplantation therefore relies on multiple drug therapy based on a calcineurin inhibitor, using other immunosuppressants to minimize the side effects of individual agents. The possible development of a more effective and less toxic immunosuppressive strategy remains a hope for the long-term treatment of organ transplant patients.

We have recently discovered a new immunosuppressant, KRP-203 (2-amino-2-{2-[4-(3-benzyloxyphenylthio)-

2-chlorophenyl]ethyl}-1,3-propanediol hydrochloride, molecular weight 480.45 Da), which prolongs rat skin and heart allograft survival, and especially abrogates chronic vasculopathy.⁵ KRP-203 has some similarity of molecular structure to FYT720, which has unique biological effects on lymphocyte trafficking.⁶ Like FTY720, KRP-203 reduces

From the Division of Organ Replacement Research (M.T., H.S., T.M., Y.T., Y.H., E.K.), Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, Tochigi, Second Department of Surgery (H.S.), Gunma University School of Medicine, Gunma, Department of Organ Regeneration (M.T., C.S.), Shinshu University, Graduate School of Medicine, Matsumoto, Discovery Research Laboratories (S.K., S.I., T.Y.), and Kyorin Pharmaceutical Co., LTD., Tochigi, Department of Regeneration Surgery (S.E.), National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan.

Address reprint requests to Masafumi Takahashi, MD, PhD, Division of Organ Replacement Research, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, Minamikawachi-machi, Tochigi 329-0498, Japan. E-mail: masafumi@jichi.ac.jp

the number of peripheral lymphocytes and accelerates their homing into peripheral lymphoid organ. However, KRP-203 is less likely to cause bradycardia than FTY720. We therefore hypothesized that the combined use of KRP-203 with CsA would provide a more effective, less toxic immunosuppressive strategy for organ transplantation. In the present study, we examined whether KRP-203 combined with a subtherapeutic dose of CsA function potentiated prolongation of rat heart transplant survival.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Agents

Inbred male DA (major histocompatibility complex [MHC] haplotype: RT1^a) and LEW (RT1^l) rats were obtained from Japan SLC Inc. (Hamamatsu, Japan) and Japan Charles River Inc. (Kanagawa, Japan), respectively. With free access to standard food and drinking water, they were maintained on 12-hour light and dark cycles. All experiments in this study were performed in accordance with our Medical School Guide for Laboratory Animals. KRP-203 was synthesized by Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo, Japan). CsA was purchased from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan).

Rat Heart Allograft

Rat heterotopic abdominal heart transplantation was performed across an MHC-incompatible rat combination (DA to LEW) on 8- to 10-week-old male animals. The aorta and pulmonary artery of the donor heart were anastomosed to the infrarenal abdominal aorta and inferior vena cava of the recipients, respectively, using running 9-0 nylon suture. Allograft function was tested daily by palpation of the graft heartbeat; rejection was defined as its complete cessation. KRP-203 and CsA were administered daily by gavage beginning after the transplantation. Distilled water was given to the vehicle group of rats. Heart allograft survival was followed until the day of rejection or for 30 days after transplantation.

Histology and Immunohistochemistry

The samples obtained from heart allografts were fixed in 20% formalin and embedded in paraffin. Transverse paraffin sections (4- μ m thick) were stained with hematoxylin and eosin (HE) or Masson's trichrome (MT). To quantify the extent of acute rejection, the sections examined by light microscopy were evaluated using a previously described scoring system.⁷

RT-PCR Analysis

Total RNA was prepared from allograft tissues using the acid guanidine-phenol chloroform method (RNA-Bee isolation reagent; Tel Test, Inc.; Friendswood, Tex, USA). Reverse transcription and polymerase chain reactions (PCR) were performed using SuperScript One-Step with Platinum Taq (Invitrogen, Co., Carlsbad, Ala, USA) and a thermal cycler (TP2000, Takara Biomedicals, Tokyo, Japan). During this analysis, the optimum number of cycles was chosen to prevent saturation of PCR products. The primers and PCR conditions for interleukin (IL)-10, interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase have been previously reported.⁸⁻¹⁰ After PCR, an aliquot of each amplification mixture underwent electrophoresis on a 2.0% agarose gel. PCR products were visualized with ethidium bromide.

Donor-Specific Antibody Titers

Antibodies against donor cells in the recipient sera were determined by flow cytometry using donor strain splenocytes as described previously,¹¹ with the modification that, prior to analysis, sera were conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma, St. Louis, Mo, USA). Overall, 10 μ L of serum diluted with 100 nmol sodium carbonate (pH 9.0) were mixed with 5 μ g of FITC. The titer of the antibodies was determined as the median of the fluorescence intensity.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by Stat View Version 5.0 (Abacus Concepts Inc., Calif, USA). For the rat skin and heart allograft models, survival times were compared between groups by the log-rank test. Differences between the remaining data were compared by Tukey-Kramer's test. Differences were defined as significant if $P < .05$.

RESULTS AND DISCUSSION

We first examined the effect of KRP-203 alone or in combination with low doses of CsA on MHC-incompatible (DA to LEW) rat heart allograft survival. Allografts treated with vehicle or CsA (1 mg/kg) were rejected at 6 to 7 days after transplantation. Treatment with KRP-203 (1 and 3 mg/kg) or CsA (3 mg/kg) alone, or KRP-203 (1 mg/kg) plus CsA (1 mg/kg) significantly prolonged allograft survival compared to the vehicle group, but the immunosuppressive effects of these treatments were not so potent. The mean survival times (MST) of KRP-203 (1 and 3 mg/kg), CsA (3 mg/kg) alone, or KRP-203 (1 mg/kg) combined with CsA (1 mg/kg) treatments were 9.7, 10.2, 12.5, or 9.3 days, respectively. However, KRP-203 (1 mg/kg) in combination with CsA (3 mg/kg) clearly prolonged the heart allograft survival with an MST >30 days. The histology of heart allografts treated with vehicle, showed severe acute rejection, which was characterized by a diffuse mononuclear cell infiltration, severe hemorrhage, and myocardial necrosis. Allograft vasculopathy, mononuclear cell infiltration, and focal hemorrhage were also observed in allografts treated with CsA (3 mg/kg) or KRP-203 (1 and 3 mg/kg) alone. However, these findings were all markedly suppressed when KRP-203 (1 mg/kg) was combined with CsA (3 mg/kg). The histologic grade scores for rejection of the vehicle, KRP-203 (1 mg/kg) alone, or CsA (3 mg/kg) alone groups were 3.00 ± 0.00 , 2.67 ± 0.21 , or 2.50 ± 0.50 , respectively. The score of the KRP-203 (1 mg/kg) combined with CsA (3 mg/kg) treatment was significantly lower than any other treatments (1.00 ± 0.57 , $P < .05$). These results indicate that KRP-203 combined with a subtherapeutic CsA dose markedly enhances the survival of rat heart allografts and abrogates allograft vasculopathy.

We next investigated the role of inflammatory cytokines in rat heart allografts among hosts treated with this combination by performing mRNA expression profiling of representative cytokines in the allografts using RT-PCR analysis. The allografts treated with vehicle showed substantial mRNA expression of IL-10, IFN- γ , TNF- α , and MCP-1 (Fig 1A). Suppression of these expressions of cytokine was not observed among allografts treated with CsA (3 mg/kg)

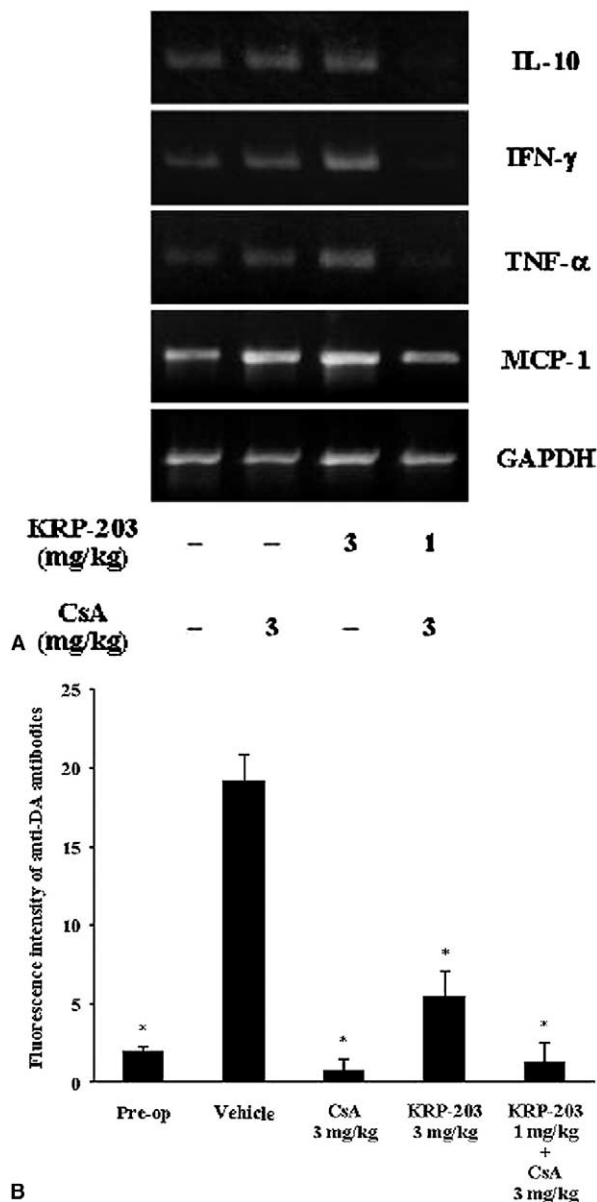


Fig 1. A. Effect of KRP-203 combined with CsA on cytokine expression. RT-PCR analysis found that KRP-203 (1 mg/kg) combined with CsA (3 mg/kg) resulted in a complete suppression of IL-10, IFN- γ , and TNF- α expression, but not MCP-1 mRNA expression. Results are representative of two independent experiments. **B.** Effect of KRP-203 combined with CsA on donor-specific antibody titers. Treatment with KRP-203 (3 mg/kg) alone showed significant reduction of donor-specific antibody titers, and further reduction of these titers was observed in the recipients treated with CsA (3 mg/kg) alone or KRP-203 (1 mg/kg) combined with CsA (3 mg/kg). * $P < .05$ versus vehicle treatment.

or KRP-203 (3 mg/kg) alone. In contrast, treatment with KRP-203 (1 mg/kg) combined with CsA (3 mg/kg) caused

complete suppression of IL-10, IFN- γ , and TNF- α , but not of MCP-1 mRNA expression.

Our previous reports demonstrated that KRP-203 reduces the number not only of peripheral T cells but also B cells in a dose-dependent manner. Herein we determined donor-specific antibody titers. The antibody titers were markedly elevated in allografted recipients treated with vehicle (Fig 1B). Treatment with KRP-203 (3 mg/kg) alone led to a 72% reduction in donor-specific antibody titers. Further reduction of these titers was observed among recipients treated with CsA (3 mg/kg) alone or with KRP-203 (1 mg/kg). Thus, the combination therapy of KRP-203 with a subtherapeutic dose of CsA may suppress the recruitment of peripheral mononuclear cells, including T cells, B cells, and monocytes, thereby preventing both cellular and humoral immune responses.

In conclusion, we demonstrated that a novel immunomodulator KRP-203 combined with a subtherapeutic dose of CsA synergistically prolonged rat heart allograft survival. The present findings suggest that combination therapy of a calcineurin inhibitor with KRP-203 has potential as a novel immunosuppressive strategy, not only to prevent allograft rejection but also to reduce adverse effects among patients undergoing organ transplantation.

REFERENCES

1. Azuma H, Tilney NL: Chronic graft rejection. *Curr Opin Immunol* 6:770, 1994
2. Hayry P, Aavik E, Savolainen H: Mechanisms of chronic rejection. *Transplant Proc* 31:5S, 1999
3. Hillebrands JL, Rozing J: Chronic transplant dysfunction and transplant arteriosclerosis: new insights into underlying mechanisms. *Expert Rev Mol Med* 2003:1, 2003
4. Stepkowski SM: Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Rev Mol Med* 2000:1, 2000
5. Shimizu H, Takahashi M, Kaneko T, et al: KRP-203, a novel synthetic immunosuppressant, prolongs graft survival and abrogates chronic rejection in rat skin and heart allografts. *Circulation* 111:222, 2005
6. Yanagawa Y, Sugahara K, Kataoka H, et al: FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats II. FTY720 prolongs skin allograft survival by decreasing T cell infiltration into grafts but not cytokine production in vivo. *J Immunol* 160:5493, 1998
7. Holschermann H, Bohle RM, Schmidt H, et al: Hirudin reduces tissue factor expression and attenuates graft arteriosclerosis in rat cardiac allografts. *Circulation* 102:357, 2000
8. Suda T, Osajima A, Tamura M, et al: Pressure-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 through activation of MAP kinase. *Kidney Int* 60:1705, 2001
9. Takahashi M, Nishihira J, Shimpo M, et al: Macrophage migration inhibitory factor as a redox-sensitive cytokine in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 52:438, 2001
10. Siegling A, Lehmann M, Platzer C, et al: A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats. *J Immunol Meth* 177:23, 1994
11. Suzuki S, Nishimori H, Ohdan H, et al: Prolongation of cardiac xenograft survival in a hamster-to-rat combination by recipient treatment with deoxymethylspargualin. *Transplantation* 56:1257, 1993

Tratamiento farmacológico de las fístulas en la enfermedad de Crohn

Javier P. Gisbert, Fernando Gomollón^a, José Maté y José María Pajares

Servicios de Aparato Digestivo. Hospital Universitario de la Princesa. Madrid.

^aHospital Miguel Servet. Zaragoza.

La naturaleza transmural del proceso inflamatorio en la enfermedad de Crohn (EC) predispone a la formación de fístulas y hace que éstas constituyan una complicación frecuente¹. Actualmente se acepta la forma «fistulizante» como un subgrupo fenotípico de la EC, mientras que la forma «inflamatoria» y la «estenotante» completarían el espectro de la enfermedad. La descripción de fístulas en los pacientes con EC se remonta a 1931, cuando Crohn et al² identificaron la presencia de esta complicación en 6 de los 14 pacientes estudiados. El riesgo de desarrollar una complicación fistulizante en los pacientes con EC oscila generalmente entre el 20 y el 40%, si bien algunos estudios han descrito cifras menores o mayores³. En los pacientes con EC las fístulas se forman por la extensión transmural del proceso inflamatorio, con aparición de fisuras profundas que pueden producir perforaciones locales en el intestino y la extensión de la inflamación a órganos vecinos. Las fístulas se originan en el intestino enfermo (fundamentalmente en el íleon terminal) y terminan en zonas que pueden estar afectadas o no por el proceso inflamatorio⁴. La clasificación de las fístulas se basa en su localización y en la comunicación de los órganos contiguos. Así, se han clasificado en: a) fístulas internas, cuando desembocan en órganos adyacentes (entre ellas se encuentran las enteroentéricas, enterourinarias y enterogénitales, y b) fístulas externas (enterocutáneas o perianales). Son numerosos los artículos que evalúan la presencia de enfermedad fistulizante en los pacientes con EC, especialmente desde el punto de vista epidemiológico. Sin embargo, son muy pocos los estudios que han examinado la eficacia del tratamiento –en especial el farmacológico– específicamente en este grupo de pacientes, que son precisamente los que plantean con frecuencia las decisiones terapéuticas más difíciles. Además, resulta difícil encontrar, incluso en los textos más prestigiosos, información sistematizada sobre el tratamiento de las fístulas, del que suele haber referencias aisladas en diversos capítulos, pero sin un enfoque específico.

Con estos antecedentes, nuestro objetivo fue revisar sistemáticamente los estudios publicados sobre el tratamiento farmacológico de las fístulas en la EC. Para ello se efectuó una búsqueda bibliográfica en Internet hasta septiembre del

2000 utilizando el motor de búsqueda Pubmed. Se emplearon los siguientes descriptores o palabras clave (en todos los campos de búsqueda): *Crohn's disease* o *inflammatory bowel disease*, y *fistula* o *fistulae* o *fistulous*. Así mismo, se evaluaron las referencias bibliográficas incluidas en las revisiones sobre el tratamiento de la EC fistulizante, así como las referencias empleadas en los artículos que fueron identificados inicialmente. Tan sólo se incluyeron las publicaciones que evaluaban aspectos del tratamiento farmacológico de la EC fistulizante. Se incluyeron artículos publicados en cualquier idioma.

A continuación se comentan brevemente, en primer lugar, algunos aspectos clínicos, diagnósticos y de indicación de tratamiento médico/quirúrgico en los distintos subgrupos de fístulas, para posteriormente revisar en profundidad los tratamientos farmacológicos disponibles.

Fístulas enteroentéricas

Las fístulas enteroentéricas pueden ser causa de un síndrome de malabsorción, ya sea debido al cortocircuito intestinal que provocan (típicamente en las fístulas gastrocólicas o ileosigmoideas de gran tamaño) o por un sobrecrecimiento bacteriano secundario. En las fístulas ileosigmoideas puede producirse una diarrea secretora debido al paso de sales biliares a través del tracto fistuloso, para cuyo tratamiento se ha propuesto la administración de colestiramina, un quelante de las sales biliares⁴. Por su parte, las fístulas gastrocólicas pueden causar la tríada típica de halitosis o vómitos fecaloideos, diarrea y pérdida de peso⁵⁻⁸. No obstante, la mayoría de las fístulas enteroentéricas no producen sintomatología clínica alguna (típicamente las fístulas ileocecales o ileoileales), por lo que en general constituyen un hallazgo casual en el examen radiológico baritado^{9,10}. El análisis de la historia natural de las fístulas enteroentéricas ha demostrado que su evolución es con frecuencia benigna, por lo que el hallazgo de este tipo de fístulas no debe considerarse *per se* indicación de tratamiento quirúrgico¹¹. De hecho, la mayoría de los síntomas que se describen en el momento del diagnóstico de la fístula (dolor abdominal, diarrea y pérdida de peso) probablemente traducen, en realidad, la actividad de la EC¹¹, por lo que el tratamiento estándar debe incluir el de la actividad inflamatoria intestinal. El tratamiento específico de la fístula será preciso tan sólo en caso de que existan manifestaciones clínicas, y deberá ser inicialmente farmacológico, reservando la cirugía para los casos que no respondan o que presenten recidivas⁹⁻¹¹. Afortunadamente, los pacientes que no responden al tratamiento médico inicial y que al final requieren tratamiento quirúrgico no presentan una mayor mortalidad ni morbilidad, en comparación con aquellos que son operados de forma temprana. La excepción a esta regla de comenzar con tratamiento médico conservador la representan los pacientes con obstrucción intestinal, situación en la que existe riesgo de perforación o

Palabras clave: Azatioprina. Ciclosporina. Enfermedad de Crohn. Enfermedad inflamatoria intestinal. Fístula. Infiximab. Metronidazol. Tratamiento. 6-mercaptopurina.

Key words: Azathioprine. Cyclosporin. Crohn's disease. Fistula. Inflammatory bowel disease. Infiximab. Metronidazole. Treatment. 6-mercaptopurine.

Correspondencia: Dr. J.P. Gisbert.
Playa de Mojácar, 29. Urb. Bonanza.
28669 Boadilla del Monte. Madrid.
Correo electrónico: gisbert@meditex.es

Recibido el 4-1-2001; aceptado para su publicación el 8-2-2001

Med Clin (Barc) 2001; 116: 664-671

formación de un absceso al administrar altas dosis de esteroides¹². La localización de la fístula puede en ocasiones determinar la indicación quirúrgica, como ocurre en la mayoría de las fístulas gastroentéricas^{5,8}. Por último, hay dos circunstancias en las que la cirugía parece la opción más razonable: la presencia de un absceso abdominal y la demostración de una estenosis intestinal por debajo de la fístula¹².

Fístulas enterourinarias

La prevalencia de las fístulas enterovesicales entre los pacientes con EC es de aproximadamente el 3 al 6%¹³⁻¹⁶. Pueden originar neumaturia, fecaluria e infecciones urinarias de repetición (a menudo con identificación de múltiples gérmenes)^{9,15-22}. Así, una infección urinaria en un varón con EC, o si este mismo proceso en una mujer es refractario al tratamiento antibiótico, debe hacernos pensar en la posibilidad de una fístula enterovesical. Antes del tratamiento se debe evaluar con detalle el tracto digestivo, por métodos radiológicos o endoscópicos, aunque no es infrecuente que éstos no sean capaces de detectar la lesión fistulizante^{16,21,22}. La cistoscopia (que tiene sobre todo un papel diagnóstico de confirmación) y la tomografía computarizada suelen ayudar al diagnóstico, mientras que otras exploraciones como la pielografía intravenosa tienen una utilidad más limitada (su finalidad es detectar cualquier obstrucción urinaria concurrente que pueda predisponer a la infección)^{15,16,19,23}. Aunque se pueda intentar inicialmente un tratamiento farmacológico (con azatioprina/6-mercaptopurina, por ejemplo)^{9,21,22,24}, la mayoría de los casos requerirán finalmente tratamiento quirúrgico^{13,16,25} debido a la progresión de la enfermedad intestinal subyacente (y no como consecuencia de complicaciones renales o infecciosas, estas últimas controladas habitualmente con tratamiento antibiótico^{1,9,13,15,20,21,26}).

Fístulas rectovaginales

Se ha estimado que las fístulas rectovaginales aparecen aproximadamente en el 10% de las mujeres con EC anal²⁷ y que la EC es la causa de hasta una cuarta parte de este tipo de fístulas²⁸, que típicamente se asocian con una ulceración rectal profunda o con una proctitis. Las molestias y problemas que ocasionan estas fístulas dependen del tamaño del orificio fistuloso, de las características de las heces y de la actitud y entorno social de la paciente²⁹. Entre los síntomas que causa se encuentra la eliminación de gas o heces por la vagina y la dispareunia. Los pacientes asintomáticos o con síntomas mínimos no precisan tratamiento. Cuando éste ha sido necesario, se han empleado fármacos inmunodepresores, aunque en la mayoría de los casos será precisa la cirugía, ya que las fístulas rectovaginales difícilmente se cierran de manera espontánea debido a que el epitelio rectal y el vaginal se encuentran en contacto^{27,29}. En cualquier caso, el tratamiento debe prescribirse con la intención de cerrar la fístula y evitar la intervención quirúrgica, o para mejorar el resultado de ésta en caso de que sea precisa³⁰. En casos seleccionados de fístula rectovaginal en los que la afección rectal es mínima o la EC está quiescente, se puede intentar una reparación local de la fístula sin necesidad de acometer la resección del recto^{31,32}, si bien algunos autores han observado que la proctectomía será necesaria en la mayoría de los pacientes con fístulas rectovaginales.

Fístulas enterocutáneas

Aparecen casi siempre después de la cirugía y desembocan en la piel en el lugar donde se localiza la incisión quirúrgica, como consecuencia de la adherencia de un asa de intestino

enfermo o de la zona de anastomosis. Aunque también pueden aparecer espontáneamente, esto es, sin el antecedente de cirugía previa, es mucho más infrecuente³. Las fístulas enterocutáneas espontáneas con frecuencia son refractarias al tratamiento médico, por lo que generalmente requieren cirugía³³⁻³⁶; por el contrario, las fístulas enterocutáneas posquirúrgicas tienden a curar espontáneamente, precisando tan sólo cuidados de la piel, control hidroelectrolítico y antibióticos³³. En las fístulas externas, aunque el tránsito intestinal o el enema opaco pueden ser diagnósticos, se ha aconsejado realizar un fistulograma, dado que su capacidad diagnóstica es mayor^{33,35}. En general, las fístulas enterocutáneas suelen ser más problemáticas que las enteroentéricas (que, como hemos visto, son frecuentemente asintomáticas), pues aunque su presencia no es una indicación absoluta de cirugía, la mayoría de los pacientes no toleran la salida de contenido intestinal por dicha fístula. Así, se indicará tratamiento médico inicialmente y quirúrgico si no existe respuesta a éste, cuando el drenaje de la fístula no sea tolerado por el paciente, o bien cuando se produzca irritación de la piel o dificultad para mantener la higiene personal.

Fístulas perianales

La mayoría tienen su origen en las glándulas de la línea de criptas, igual que en la población general, pero en algunos casos el punto de partida es una úlcera rectal, por lo que la fístula resultante será rectocutánea y tendrá un recorrido extraesfinteriano²⁹. La prevalencia de fístulas perianales en pacientes afectados de EC es muy elevada, oscilando entre el 25 y el 45%, si bien su historia natural es hacia la curación espontánea en una elevada proporción de los casos^{29,37}. Las fístulas perianales asintomáticas y que no drenan material (es decir, en las que únicamente se visualiza el orificio fistuloso) no requieren terapia alguna³⁸. En caso de precisar tratamiento, éste debe ser inicialmente farmacológico, mientras que el tratamiento quirúrgico quedará reservado para los casos en los que exista además un absceso acompañante, una estenosis anal que requiera dilatación, una incontinencia, o cuando la fístula sea recidivante y no responda a la terapia farmacológica. Si la EC se encuentra en fase activa (en especial si existe una proctitis), además del tratamiento específico para la fístula deben asociarse los fármacos encaminados a controlar la actividad de la enfermedad¹. Así, el correcto control de la enfermedad perianal precisa del buen control de la enfermedad rectocolónica. En este sentido, deberá intentarse la remisión de la actividad intestinal de la EC (con tratamiento farmacológico) antes de cualquier consideración quirúrgica de la enfermedad perianal, entre otras razones porque, mientras la afectación rectal continúa activa, la cicatrización de la herida quirúrgica se verá comprometida³⁸. En este sentido, se ha descrito que el tratamiento quirúrgico de las lesiones fistulizantes perianales es igualmente efectivo en los pacientes con EC que en aquellos que no tienen esta enfermedad, a condición de que la actividad de la lesión inflamatoria esté controlada³⁹. No obstante, cuando la indicación quirúrgica quede establecida, no deberá ser innecesariamente retrasada, ya que se ha descrito que puede comportar una peor evolución y una mayor probabilidad de requerir una proctectomía o colectomía⁴⁰.

El tratamiento de las fístulas dependerá de su historia natural, de su localización y de los síntomas que cause. Así, según su curso clínico las fístulas se han dividido en «benignas», de «gravedad intermedia» y fístulas «graves o complicadas»⁴. Las primeras no producen síntomas importantes o complicaciones, en general se descubren de forma

accidental, provocan un cortocircuito de segmentos cortos de intestino y no añaden síntomas a los propios de la actividad inflamatoria de la EC^{9,11}. Estas fístulas de curso clínico benigno incluyen la mayoría de las ileoileales, ileocecales e ileosigmoideas. No requieren ningún tratamiento específico diferente del de la actividad inflamatoria de la EC. Las fístulas de gravedad intermedia producen síntomas desagradables o molestos, pero la enfermedad subyacente no es suficientemente grave como para requerir tratamiento quirúrgico. Entre estas fístulas se encuentran las colagástricas, pues hasta un tercio de estos pacientes pueden presentar vómitos fecaloideos o eructos de olor fétido, además de poder cursar con diarrea y pérdida de peso⁵. Las fístulas enterovesicales que causan síntomas de cistitis recurrente o disuria, así como las fístulas enterocutáneas que originan irritación cutánea, también se podrían incluir dentro de este grupo intermedio. El tratamiento médico es de primera elección en la mayoría de las fístulas de gravedad intermedia, e incluye tanto la nutrición parenteral o enteral como el tratamiento farmacológico, que se revisará con detalle más adelante. Las fístulas graves o complicadas se asocian con actividad inflamatoria grave de la EC intestinal, a la presencia de un absceso o a la existencia de obstrucción intestinal distal⁴. En estos casos tradicionalmente se ha considerado que el papel del tratamiento médico debe limitarse al control del proceso inflamatorio antes de proceder al tratamiento quirúrgico definitivo. Sin embargo, como se verá más adelante, el empleo de la ciclosporina y del infliximab, fármacos ambos de acción rápida, está modificando el mencionado algoritmo terapéutico. Así, actualmente la cirugía sólo estaría indicada en la fase aguda cuando fracasa el tratamiento farmacológico (incluidos la ciclosporina y el infliximab), o cuando se demuestra la presencia de un absceso que complica la fístula. Ambos enfoques, médico y quirúrgico, no son mutuamente excluyentes, y en algunos casos el tratamiento combinado es probablemente el más razonable. De este modo, es probable que la disponibilidad de tratamientos médicos de rápida eficacia permita que el gesto quirúrgico se lleve a cabo en mejores condiciones locales, disminuyendo las dificultades técnicas y las complicaciones posquirúrgicas.

¿Cuándo se considera «cerrada» la lesión fistulosa? Existe una notable heterogeneidad entre los diversos estudios a la hora de definir la «curación» de la fístula. No disponemos de un índice aceptado de actividad de la enfermedad fistulizante (el equivalente al Crohn's Disease Activity Index [CDAI], que cuantifica la actividad de la EC intestinal) que permita valorar la eficacia terapéutica. Aunque existen diversos índices de actividad de la enfermedad perianal, su utilización está poco extendida y únicamente se han empleado en una minoría de estudios. Si bien algunos autores han propuesto que la curación completa de la fístula podría definirse como «la ausencia de drenaje a pesar de la compresión suave del orificio externo fistuloso, al menos durante un mes», dicha definición no está universalmente aceptada³.

Tratamiento farmacológico de las fístulas en la enfermedad de Crohn

Aminosalicilatos

Si bien es cierto que diversos estudios han demostrado que la sulfasalazina y la mesalazina son (discretamente) efectivas tanto para inducir la remisión como para mantenerla en los pacientes con EC, no existe ningún estudio que haya probado el papel beneficioso de dichos fármacos, por vía

oral o tópica, en la forma fistulizante en concreto. Más bien parece que estos fármacos no tendrían efecto alguno sobre la curación de las fístulas. En este sentido, en un estudio aleatorizado Schneider et al⁴¹ compararon metronidazol en monoterapia frente a una combinación de este antibiótico junto con esteroides o salazopirina, y un tercer grupo en el que se administraban los tres fármacos. Los autores describen cómo el porcentaje de curación de las fístulas alcanzado con metronidazol aisladamente no se incrementa al añadir alguno de los otros dos fármacos.

Glucocorticoides

A pesar de que los esteroides han demostrado repetidamente ser muy eficaces en el tratamiento del brote agudo de la EC, no tienen efecto alguno sobre la forma fistulizante en concreto. Es decir, estos fármacos no favorecen el cierre de las fístulas, únicamente disminuyen la inflamación mucosa. En el estudio antes mencionado de Schneider et al⁴¹, veíamos cómo la eficacia terapéutica del metronidazol en monoterapia no se incrementaba al añadir esteroides. Incluso se ha apuntado que los esteroides podrían tener un papel pernicioso en algunos pacientes con enfermedad fistulizante. Así, dos estudios indican que el empleo de estos fármacos se asocia con una mayor probabilidad de precisar cirugía^{42,43}, mientras que en otro estudio se observó que las muertes únicamente ocurrían en pacientes que tenían una masa abdominal, consecuencia probable de una fístula, que recibían esteroides⁴⁴. No obstante, este hecho se observó en un número muy reducido de pacientes, con una EC muy compleja, en la que probablemente influían numerosas variables además del tratamiento esteroide.

Antibióticos

Las fístulas de la EC ponen en contacto el contenido intestinal, rico en bacterias, con otras zonas anatómicas habitualmente estériles. La infección de estas últimas forma parte fundamental del cuadro clínico y de las complicaciones de la enfermedad fistulizante, particularmente los abscesos, lo que representa el sustrato teórico para la utilización de antibióticos en estos pacientes. La importancia de la flora anaeróbica justifica que el metronidazol haya sido el fármaco más utilizado en este contexto, mientras que, más recientemente, se ha acumulado cierta experiencia clínica con el ciprofloxacino.

Metronidazol. Se desconoce si el efecto de este fármaco es debido a sus propiedades antibacterianas o si posee alguna acción beneficiosa específica sobre la EC, tal vez por un mecanismo inmunomodulador. Bernstein et al⁴⁵ efectuaron un estudio no controlado en el que se incluyó a 21 pacientes con EC fistulizante perineal de más de 5 años de evolución que no habían respondido a diversos tratamientos. Se administró metronidazol a dosis de 20 mg/kg/día y se obtuvo una respuesta clínica en la mayoría (95%) de los pacientes, aunque la curación total de las fístulas sólo se alcanzó aproximadamente en la mitad de éstos; además, tras un seguimiento más prolongado se comprobó cómo el metronidazol podía retirarse con éxito en tan sólo el 28% de los casos. Por su parte, Brandt et al⁴⁶ llevaron a cabo un seguimiento de este grupo de pacientes y comprobaron que la recurrencia era la norma (78% de los casos) cuando se suspendía el metronidazol. Jakobovits y Schuster⁴⁷ demostraron una curación completa en el 50% de sus 8 pacientes con EC perianal fistulizante refractaria al tratamiento previo (esteroides, azatioprina e incluso cirugía), mientras que en el estudio de Schneider et al⁴¹ este porcentaje fue del 40% (y en un 20%

adicional se constató una disminución del drenaje fistuloso). Otros autores han empleado metronidazol en casos aislados de EC fistulizante con más o menos éxito^{48,49}. No obstante, es preciso señalar que ninguno de los estudios antes mencionados fue controlado, lo que limita considerablemente sus conclusiones. Se ha recomendado administrar el metronidazol a dosis iniciales de 10 mg/kg/día, para incrementarse hasta 20 mg/kg/día cuando no se objeive una respuesta clínica al cabo de un mes^{41,45,46}. Se ha descrito que el tiempo medio para alcanzar la máxima mejoría es de alrededor de 10 semanas, con unos límites que oscilan entre uno y 6 meses⁴⁷. Así mismo se ha indicado que el metronidazol en la enfermedad perianal estaría especialmente indicado durante la fase aguda de la EC, mientras que el tratamiento inmunodepresor sería más apropiado cuando la EC no estuviera en brote agudo⁵⁰. Por último, este fármaco ha sido también aparentemente eficaz en el tratamiento de pacientes aislados con fístulas de localizaciones más atípicas, como es el caso de las fístulas rectouretrales²³.

En resumen, el tratamiento con metronidazol parece ser efectivo en una considerable proporción de los pacientes con EC fistulizante, aunque la recidiva de las lesiones es muy frecuente cuando se retira el fármaco (si bien los síntomas mejoran de nuevo con su reintroducción). Por otra parte, puesto que no disponemos de datos provenientes de estudios clínicos metodológicamente adecuados, es evidente que se precisan más estudios, fundamentalmente controlados con placebo y con períodos de seguimiento más prolongados, para establecer definitivamente la verdadera utilidad del metronidazol en la EC fistulizante.

Ciprofloxacino. En un estudio presentado únicamente en forma de resumen, Turunen et al⁵¹ emplearon ciprofloxacino (1.000-1.500 mg/día durante 3-12 meses) en 8 pacientes con EC perineal activa refractaria al metronidazol y a la cirugía, demostrando una mejoría clínica, tanto objetiva por parte del médico como subjetiva por parte del paciente. Algunos autores han demostrado que la asociación de metronidazol y ciprofloxacino posee una elevada eficacia terapéutica. De este modo, Solomon et al⁵² evaluaron retrospectivamente una serie de 14 pacientes (nueve con fístulas complejas y uno con una fístula rectovaginal) tratados con metronidazol (500-1.500 mg/día) y ciprofloxacino (1.000-1.500 mg/día) durante 3 meses. Las fístulas mejoraron en 9 casos, y se curaron en tres. Sin embargo, al suspender el tratamiento antibiótico se comprobó la recidiva en la mayoría de los pacientes. En resumen, la combinación de metronidazol y ciprofloxacino constituye una opción prometedora en el tratamiento de la EC fistulizante, aunque son necesarios estudios comparativos que demuestren el beneficio de esta asociación frente a cualquiera de dichos fármacos aisladamente, además de, obviamente, frente a placebo.

Inmunodepresores

Azatioprina y 6-mercaptopurina. Estos son, dentro de los fármacos inmunodepresores, los que más frecuentemente se han empleado en el tratamiento de las fístulas de la EC. Inicialmente su uso se basaba en los resultados de estudios no controlados^{26,53-55}. Aún hoy, la experiencia basada en estudios controlados frente a placebo es muy limitada. En un metaanálisis⁵⁶ que valoraba la eficacia de la 6-mercaptopurina en la EC se describió una respuesta favorable de las fístulas en 5 de los estudios incluidos⁵⁷⁻⁶¹. Así, la respuesta en los pacientes que recibían 6-mercaptopurina fue del 54% y del 21% en el grupo que recibió placebo, resultando una *odds ratio* global de 4,4 (intervalo de confianza del 95%, 1,5-13) a

favor de este fármaco en la curación o mejoría de las fístulas. No obstante, la mayoría de los pacientes incluidos en este metaanálisis provenían de un solo estudio, el llevado a cabo por Present et al⁵⁹, por lo que sus resultados deben interpretarse con cautela. Por otra parte, dicho estudio fue el más prolongado en el tiempo y, dada la lentitud en la aparición del efecto cuando se utilizan estos fármacos, este aspecto del diseño es fundamental. Por último, hay que tener presente que los datos de dos estudios que no demostraron una mejoría estadísticamente significativa de la 6-mercaptopurina frente a placebo^{62,63} no pudieron ser incluidos en dicho metaanálisis.

En el estudio ya mencionado de Present et al⁵⁹, los autores trataron a 36 pacientes con 6-mercaptopurina y lograron el cierre completo de la fístula en el 31% de los casos, frente a tan sólo el 6% con placebo; sin embargo, esta diferencia no alcanzó significación estadística, lo que probablemente se deba a un error «tipo beta» consecuencia del reducido número de pacientes incluidos en este estudio. Por otra parte, se demostró una respuesta parcial en el 24 y el 18% de los casos, respectivamente, con 6-mercaptopurina y con placebo. Por consiguiente, la respuesta global, tanto parcial como completa, fue del 55% en los pacientes que recibieron el tratamiento inmunodepresor, frente al 24% en aquellos que recibieron placebo. En un estudio posterior, el mismo grupo de autores²⁶ administraron 6-mercaptopurina (a dosis de 1,5 mg/kg/día) a 34 pacientes con EC fistulizante y lograron una tasa de curación completa del 39% y una mejoría en un 26% adicional. En este estudio, el tiempo medio necesario para observar el efecto beneficioso fue largo, de aproximadamente 3 meses, y una cuarta parte de los pacientes requirió más de 4 meses. De los 6 pacientes que presentaban una fístula rectovaginal, en dos se logró el cierre completo de la lesión, y en uno más la mejoría. Por su parte, O'Brien et al⁶⁴ administraron azatioprina a 26 pacientes con EC fistulizante y comprobaron el cierre completo de las fístulas en el 31% de los casos, mientras que en el 54% la curación fue parcial. La mayoría de los pacientes que responden inicialmente al tratamiento con azatioprina/6-mercaptopurina continúan haciéndolo mientras reciben el fármaco; sin embargo, en un porcentaje elevado de los casos la fístula recidiva al suspender el tratamiento inmunodepresor, aunque los pacientes habitualmente responden bien al reintroducirlo²⁶.

Estos fármacos inmunodepresores se han empleado fundamentalmente en el tratamiento de las fístulas de localización perineal, pero también se han evaluado en pacientes con otros tipos de fístulas. Por ejemplo, algunos autores han obtenido unos buenos resultados al emplear estos fármacos en algún paciente aislado con fístulas gastrocómicas^{5,22}. Por otra parte, de los 6 pacientes con fístula rectovaginal tratados con 6-mercaptopurina por Koreliz y Present²⁶, se logró el cierre completo de la lesión en dos de ellos, y en uno más la mejoría. Margolin y Korelitz²¹ administraron 6-mercaptopurina a 12 pacientes con fístula enterovesical que no habían respondido al tratamiento previo con sulfasalazina, esteroides y antibióticos, con lo que consiguieron el control de la actividad de la EC intestinal y de las manifestaciones de la fístula en nueve de los casos. Por último, Glass et al⁹ han comunicado la desaparición de la neumaturia en tres pacientes con fístulas enterovesicales tratados con azatioprina. En resumen, la azatioprina y la 6-mercaptopurina parecen ser útiles en el tratamiento de la EC fistulizante aunque, hasta ahora, la experiencia basada en estudios controlados frente a placebo es muy reducida. Por otra parte, el problema fundamental de estos fármacos es su lento comienzo de acción, lo que limita considerablemente su uso, en especial en los casos más graves.

Ciclosporina A. Aunque no se ha publicado ningún estudio aleatorizado que compare ciclosporina A con placebo, disponemos de algunas interesantes experiencias no controladas. Hanauer y Smith⁶⁵ trataron con ciclosporina (4 mg/kg/día i.v.) a 5 pacientes con EC complicada con fístulas que no habían respondido al tratamiento médico (con diversos fármacos) o quirúrgico previo. Tras 6-10 días de tratamiento intravenoso, la ciclosporina se administró por vía oral (8 mg/kg/día, ajustándose la dosis para mantener unos valores séricos de 100-200 ng/ml). Todas las fístulas respondieron al tratamiento y se alcanzó su cierre completo en más del 80% de los casos. El tiempo medio requerido para comenzar a percibirse el efecto positivo fue de 3,6 días. El tratamiento oral se mantuvo durante una media de aproximadamente 6 meses, y se constató la recidiva de dos fístulas perianales y de dos enterovaginales. Present y Lichtiger⁶⁶ incluyeron a 16 pacientes con EC con fístulas en los que había fracasado el tratamiento previo con aminosalicilatos, esteroides, antibióticos y, en algunos casos, azatioprina. La ciclosporina se administró a dosis de 4 mg/kg/día i.v., con lo que se logró el cierre de la fístula en el 44% de los casos, y en otro 44% una mejoría significativa de la misma, comprobándose generalmente una rápida respuesta. Durante el seguimiento, ya con ciclosporina oral, se comprobó la recidiva de la fístula aproximadamente en un tercio de los pacientes. Egan et al⁶⁷ administraron ciclosporina (4 mg/kg/día i.v.) a 9 pacientes con EC fistulizante compleja y observaron una mejoría en siete de ellos. En los pacientes que respondieron, la ciclosporina se administró por vía oral, lo que en la mayoría de los casos no se siguió de la recidiva de la fístula. Sin embargo, la recidiva fue la norma cuando se suspendió el tratamiento con ciclosporina oral, a pesar del tratamiento concomitante con azatioprina o 6-mercaptopurina, lo que indica que el solapamiento entre la ciclosporina y estos últimos fármacos, que tienen una prolongada latencia en su efecto, probablemente no fue la adecuada (p. ej., 3 o 4 meses de tratamiento conjunto podría ser una estrategia razonable). Precisamente para valorar este aspecto, Hinterleitner et al⁶⁸ administraron ciclosporina i.v. (5 mg/kg/día) durante 2 semanas a 9 pacientes con EC fistulizante, a la vez que se comenzaba tratamiento con prednisona y azatioprina. Posteriormente la ciclosporina se administró por vía oral durante 10 semanas más, mientras la azatioprina y los esteroides (a dosis decrecientes) se seguían pautando. Finalmente, la ciclosporina se suspendió a los 3 meses, mientras que la azatioprina y los esteroides (a dosis reducidas) se continuaban administrando. Con la pauta intravenosa todos los pacientes alcanzaron la remisión y, más importante aún, posteriormente (con ciclosporina oral) sólo se observó recurrencia de la enfermedad en 2 pacientes (aunque tres más presentaron un deterioro leve). Los autores concluyen, por tanto, que la remisión alcanzada con la ciclosporina por vía intravenosa puede mantenerse en la mayoría de los pacientes mediante la administración conjunta de esteroides y azatioprina. Estos hallazgos, no obstante, deben interpretarse con precaución, sin dejar de valorar el considerable riesgo asociado a la utilización de una inmunodepresión triple en el contexto de una entidad benigna.

La ciclosporina se ha empleado también en el tratamiento de fístulas de localizaciones menos frecuentes. Por ejemplo, Hanauer y Smith⁶⁵ administraron este fármaco a 5 pacientes con fístulas rectovaginales y constataron una disminución del drenaje de éstas en todos los casos, aunque dos de ellas recidivaron posteriormente. Por su parte, Present y Lichtiger⁶⁶ demostraron el cierre de la fístula en uno de los dos pacientes con fístula rectovaginal que fueron tratados con ciclosporina intravenosa, aunque se comprobó la recidiva posterior en dicho paciente.

En resumen, los datos mencionados indican que la ciclosporina A por vía intravenosa es efectiva en un considerable porcentaje de los pacientes con fístulas, aunque el cambio de esta medicación a vía oral se sigue de la recidiva de la enfermedad fistulizante en aproximadamente un tercio de los casos. La rapidez de acción de la ciclosporina hace pensar que podría ser útil para alcanzar una pronta mejoría en la EC fistulizante y servir de «puente» hasta que otros fármacos inmunodepresores (como la azatioprina, 6-mercaptopurina o metotrexato) comiencen a desarrollar su efecto.

Metotrexato. Únicamente un estudio, no controlado y publicado en forma de resumen, ha valorado la eficacia del metotrexato (por vía i.m.) en un grupo de 16 pacientes con EC fistulizante⁶⁹. Se logró el cierre total de las fístulas en 4 pacientes, y la mejoría en cinco más, con lo que la respuesta global fue del 56%. Sin embargo, cuando se redujo la dosis de la medicación o ésta se pasó a vía oral, se evidenció una recidiva en muchos de los pacientes. El tiempo de respuesta fue inferior al descrito para la 6-mercaptopurina, pero algo mayor que con la ciclosporina.

Infliximab. Es un anticuerpo monoclonal quimérico, compuesto por una región constante humana y una región variable murina, dirigido contra el factor de necrosis tumoral (TNF)⁷⁰. El infliximab es el único fármaco que hasta ahora ha demostrado, en un estudio multicéntrico, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, ser eficaz específicamente para el tratamiento de la EC fistulizante⁷¹. En dicho estudio, 94 pacientes recibieron tres infusiones de 5 mg/kg de infliximab, 10 mg/kg de infliximab o placebo, en el momento inicial, y a las 2 y 6 semanas del comienzo. Los criterios de inclusión exigían presentar una o varias fístulas enterocutáneas (incluidas las perianales) activas de, al menos, 3 meses de evolución. Se permitió el tratamiento concomitante con otros fármacos, como aminosalicilatos, esteroides, azatioprina/6-mercaptopurina o antibióticos, si éstos formaban parte de su tratamiento previo (finalmente se demostró que esta variable no influía en el efecto del infliximab). Con respecto a los resultados, ambas dosis de infliximab fueron estadísticamente más eficaces que el placebo; así, el objetivo primario de eficacia de este estudio, esto es, la reducción de al menos el 50% en el número de fístulas activas, fue del 62% con infliximab, comparado con el 26% del grupo control. Con 5 mg/kg se obtuvo el éxito terapéutico en el 68% de los casos, de lo que se deduce que dicha posología es al menos tan efectiva como 10 mg/kg. Por otra parte, el objetivo secundario del estudio, el cierre completo de todas las fístulas, se alcanzó en el 46% en el grupo tratado con infliximab y tan sólo en el 13% de aquellos que recibieron placebo (diferencias estadísticamente significativas). Otros autores⁷² han demostrado la eficacia de este agente en el tratamiento de las fístulas perianales de los pacientes con EC sometidos a proctocolectomía con anastomosis ileoanal y reservorio por un diagnóstico inicial de colitis ulcerosa. Por último, se ha comunicado también el caso de una fístula esofágica refractaria al tratamiento con prednisona y 6-mercaptopurina que se resolvió casi completamente tras una única infusión de infliximab⁷³.

Un aspecto interesante de este novedoso tratamiento es su rapidez de acción; así, el efecto terapéutico se objetiva generalmente en las primeras 2 semanas. Por tanto, el infliximab, si bien en el momento actual estaría indicado en el tratamiento de la EC fistulizante (fístulas enterocutáneas o perianales) únicamente cuando hubiera fracasado la terapia previa con antibióticos e inmunodepresores, podría en un futuro próximo ser el fármaco de primera elección en los

TABLA 1

Papel de diversos agentes farmacológicos sobre la enfermedad fistulosa en la enfermedad de Crohn (EC)

Fármaco	Eficacia	Estudios controlados	Ventajas	Inconvenientes	Dosis
Aminosalicilatos	No	Si ⁴¹	Eficacia en inducción de remisión y mantenimiento	Ineficacia en la EC fistulizante	–
Glucocorticoides	No	Si ⁴¹	Eficacia en inducción de remisión y mantenimiento	Ineficacia en la EC fistulizante (evolución desfavorable?)	–
Antibióticos (metronidazol ± ciprofloxacino)	Si ^a	No	Comienzo de acción más rápido que la azatioprina	Frecuente recidiva al suspenderlos	Metronidazol: 10-20 mg/kg/día Ciprofloxacino: 1.000-1.500 mg/día
Azatioprina y 6-mercaptopurina	Si ^a	Si ^{57-61,b}	Amplia experiencia con estos fármacos en la EC	Comienzo de acción lento	Azatioprina: 2,5 mg/kg/día 6-mercaptopurina: 1,5 mg/kg/día
Ciclosporina	Si ^a	No	Rapidez de acción	Frecuente recidiva al suspenderlos	4 mg/kg/día (i.v.)
Infliximab	Si ^a	Si ^{71,c}	Rapidez de acción	Frecuente recidiva al cambiar a tratamiento oral Escasa experiencia Interrogantes (¿duración del efecto, número de dosis, efectos adversos?)	5 mg/kg (0, 2 y 6 semanas)

^aExperiencia limitada, se precisan más estudios; ^bestudios no específicamente diseñados para evaluar el efecto del tratamiento sobre las fístulas; ^cestudio multicéntrico, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo.

pacientes con EC fistulizante grave, a la espera de que la azatioprina/6-mercaptopurina, con un comienzo de acción más lento, tengan efecto. El infliximab podría servir también de fármaco «puente» hasta el tratamiento quirúrgico en algunos casos complejos.

En resumen, el infliximab es el primer fármaco que ha demostrado ser útil para el cierre de las fístulas (perianal o a pared abdominal) de la EC en un estudio controlado con placebo. Evidentemente, es preciso confirmar estos alentadores resultados antes de poder recomendar el empleo generalizado de este fármaco en la EC fistulizante. Además, quedan por resolver múltiples cuestiones como, por ejemplo, la verdadera duración del efecto terapéutico (si se entiende por tal la reducción de al menos el 50% de las fístulas, ésta parece ser de aproximadamente 3 meses) y el momento en el que se precisará repetir las dosis «de mantenimiento» para evitar la recidiva de las fístulas. Otro aspecto pendiente de clarificar es el papel del infliximab en las fístulas de una u otra determinada localización, ya que en el estudio anteriormente mencionado⁷¹, y debido al reducido tamaño muestral, se consideraron conjuntamente las fístulas enterocutáneas abdominales y las perianales. Así, dicho estudio incluyó tan sólo a 9 pacientes con fístulas abdominales, por lo que la indicación del infliximab en este subgrupo de fístulas debería reservarse para los casos con elevado riesgo quirúrgico o que hayan sufrido una EC fistulizante recurrente tras la cirugía. Otra cuestión pendiente de dilucidar es si, en los pacientes que estaban recibiendo tratamiento inmunodepresor (p. ej., con azatioprina) previo, es preciso mantener dichos fármacos cuando se administra infliximab, actitud que actualmente parece razonable. Por último, se ha propuesto que el rápido cierre de la zona superficial del orificio fistuloso antes de que se produzca el cierre del trayecto fistuloso podría asociarse con un mayor riesgo de formación de abscesos⁷⁴. De este modo, en el estudio de Present et al⁷¹ se diagnosticó la presencia de abscesos abdominales en el 11% de los pacientes tratados con infliximab, en comparación con tan sólo el 3% en el grupo control. Por otro lado, antes de emplear este fármaco se debe haber excluido la presencia de un absceso, y cualquier colección debe haber sido previamente drenada quirúrgicamente.

Tacrolimus (FK 506). Únicamente se han publicado casos aislados y series retrospectivas y no controladas de pacientes tratados eficazmente con este fármaco⁷⁵⁻⁷⁸, por lo que deberemos esperar a los resultados de futuros estudios para poder extraer alguna conclusión definitiva respecto a este

prometedor fármaco, que tiene la ventaja de poder administrarse por vía oral. Es preciso señalar que, si bien el número de pacientes tratados con tacrolimus es aún muy reducido, éstos sufren por lo general una enfermedad fistulizante especialmente compleja y refractaria, lo que en parte justifica las expectativas creadas por este fármaco.

Micofenolato mofetil. Se trata de un potente inmunodepresor que únicamente se ha evaluado en un estudio no controlado en el que se demostró una mejoría sustancial en 4 pacientes con EC perianal⁷⁹.

Talidomida. Dos estudios recientes han indicado que la talidomida es eficaz en el tratamiento de las fístulas de la EC^{80,81}, aunque el diseño abierto de éstos limita considerablemente sus conclusiones.

Para finalizar, en la tabla 1 se resume el papel actual de los distintos agentes farmacológicos sobre las fístulas en la EC.

Conclusiones

La experiencia acumulada actualmente nos permite afirmar que ni los aminosalicilatos ni los esteroides parecen tener efecto alguno sobre la curación de la enfermedad fistulizante. De entre los fármacos antibacterianos, el metronidazol parece ser efectivo en una considerable proporción de los pacientes con EC fistulizante, aunque la recidiva de las lesiones es muy frecuente cuando se interrumpe su administración. El ciprofloxacino podría ser también efectivo, mientras que la combinación de ambos antibióticos representa una prometedora alternativa para el tratamiento de la EC fistulizante. La azatioprina y la 6-mercaptopurina son, de entre los fármacos inmunodepresores, los que más frecuentemente se han empleado en los pacientes con EC fistulizante, situación en la que parecen ser efectivos, aunque hasta ahora la experiencia basada en estudios controlados frente a placebo es muy reducida. Por otra parte, el problema fundamental de estos fármacos es su lento comienzo de acción, lo que limita sobremanera su uso, especialmente en los casos más graves. La ciclosporina A por vía intravenosa es efectiva en un elevado porcentaje de los pacientes con EC fistulizante, aunque el cambio de esta medicación a vía oral se sigue de una recidiva en aproximadamente un tercio de los casos. El infliximab es el primer fármaco que ha demostrado ser útil para el cierre de las fístulas (perianal o a pared abdominal) de la EC en un estudio multicéntrico, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, por lo que constituye una prometedora opción terapéutica, aun-

que es preciso confirmar estos alentadores resultados y resolver algunos interrogantes (como la duración de su efecto y la necesidad de repetir las infusiones para evitar las recidivas) antes de poder recomendar su empleo generalizado en la EC fistulizante. La rapidez de acción de la ciclosporina y del infliximab sugiere que ambos podrían ser útiles para alcanzar una pronta mejoría en la EC fistulizante y servir de «puente» hasta que otros fármacos (como la azatioprina o la 6-mercaptopurina) comiencen a desarrollar su efecto. Por último, otros fármacos inmunodepresores como el metotrexato, el tacrolimus, el mofetil micofenolato o la talidomida han obtenido resultados esperanzadores únicamente en estudios de casos aislados y no controlados, por lo que se precisa una mayor experiencia con ellos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Michetti P, Peppercorn MA. Medical therapy of specific clinical presentations. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28: 353-370.
2. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *JAMA* 1932; 99: 1323-1329.
3. Lichtenstein GR. Treatment of fistulizing Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000; 119: 1132-1147.
4. Fernández-Bañares F, Cabré E, Gasull MA. Tratamiento médico de las fistulas en la enfermedad de Crohn. En: Gasull MA, Obrador A, Chantar C, editores. *Enfermedad inflamatoria intestinal*. Barcelona: Prous, S.A., 1994; 254-264.
5. Pichney LS, Fantry GT, Graham SM. Gastrocolic and duodenocolic fistulas in Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 1992; 15: 205-211.
6. McDaniel NT Jr., Bluth EI, Ray JE. Gastrocolic fistula in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1982; 77: 588-589.
7. Kokal W, Pickleman J, Steinberg JJ, Banich FE. Gastrocolic fistula in Crohn's disease. *Surg Gynecol Obstet* 1978; 146: 701-704.
8. Logio T, Chaiken B, Roth J, Newman E, Siegel T. The management of Crohn's colitis with colonogastric fistula. Report of a case. *Dis Colon Rectum* 1987; 30: 699-704.
9. Glass RE, Ritchie JK, Lennard-Jones JE, Hawley PR, Todd IP. Internal fistulas in Crohn's diseases. *Dis Colon Rectum* 1985; 28: 557-561.
10. Givel JC, Hawker P, Allan R, Keighley MR, Alexander-Williams J. Enterointestinal fistula complicating Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 1983; 5: 321-323.
11. Broe PJ, Bayless TM, Cameron JL. Crohn's disease: are enteroenteral fistulas an indication for surgery? *Surgery* 1982; 91: 249-253.
12. Farmer RG, Hawk WA, Turnbull RB Jr. Indications for surgery in Crohn's disease: analysis of 500 cases. *Gastroenterology* 1976; 71: 245-250.
13. Greenstein AJ, Sachar DB, Tzakis A, Sher L, Heimann T, Aufses AH Jr. Course of enterovesical fistulas in Crohn's disease. *Am J Surg* 1984; 147: 788-792.
14. Kyle J, Murray CM. Ileovesical fistula in Crohn's disease. *Surgery* 1969; 66: 497-501.
15. Talamini MA, Broe PJ, Cameron JL. Urinary fistulas in Crohn's disease. *Surg Gynecol Obstet* 1982; 154: 553-556.
16. Schraut WH, Block GE. Enterovesical fistula complicating Crohn's ileocolitis. *Am J Gastroenterol* 1984; 79: 186-190.
17. Muñoz M, Nelson H, Harrington J, Tsiotos G, Devine R, Engen D. Management of acquired rectourinary fistulas: outcome according to cause. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 1230-1238.
18. Pollard SG, Macfarlane R, Greatorex R, Everett WG, Hartfall WG. Colovesical fistula. *Ann R Coll Surg Engl* 1987; 69: 163-165.
19. Pontari MA, McMillen MA, Garvey RH, Ballantyne GH. Diagnosis and treatment of enterovesical fistulae. *Am Surg* 1992; 58: 258-263.
20. McNamara MJ, Fazio VW, Lavery IC, Weakley FL, Farmer RG. Surgical treatment of enterovesical fistulas in Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 1990; 33: 271-276.
21. Margolin ML, Korelitz BI. Management of bladder fistulas in Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 1989; 11: 399-402.
22. Greenstein AJ, Present DH, Sachar DB, Slater G, Heimann T, Lachman P et al. Gastric fistulas in Crohn's disease. Report of cases. *Dis Colon Rectum* 1989; 32: 888-892.
23. Santoro GA, Bucci L, Frizelle FA. Management of rectourethral fistulas in Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* 1995; 10: 183-188.
24. Suzuki H, Yamanishi T, Isaka S, Yasuda K, Shimazaki J, Sarashina H. Vesicoenteric fistula complicating Crohn's disease, responded to medical treatment: a case report. *Hinyokika Kiyo* 1992; 38: 337-341.
25. Fazio VW. Regional enteritis (Crohn's disease): indications for surgery and operative strategy. *Surg Clin North Am* 1983; 63: 27-48.
26. Korelitz BI, Present DH. Favorable effect of 6-mercaptopurine on fistulae of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1985; 30: 58-64.
27. Radcliffe AG, Ritchie JK, Hawley PR, Lennard-Jones JE, Northover JM. Anovaginal and rectovaginal fistulas in Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 1988; 31: 94-99.
28. Given FT Jr. Rectovaginal fistula. A review of 20 years' experience in a community hospital. *Am J Obstet Gynecol* 1970; 108: 41-46.
29. Martí Ragé J, Ramos Rubio E. Enfermedad perianal y perineal. En: Gasull MA, Obrador A, Chantar C, editores. *Enfermedad inflamatoria intestinal*. Barcelona: Prous, S.A., 1994; 265-274.
30. Senatore PJ Jr. Anovaginal fistulae. *Surg Clin North Am* 1994; 74: 1361-1375.
31. Rothenberger DA, Goldberg SM. The management of rectovaginal fistulae. *Surg Clin North Am* 1983; 63: 61-79.
32. Cohen JL, Stricker JW, Schoetz DJ Jr, Collier JA, Veidenheimer MC. Rectovaginal fistula in Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 1989; 32: 825-828.
33. Hawker PC, Givel JC, Keighley MR, Alexander-Williams J, Allan RN. Management of enterocutaneous fistulae in Crohn's disease. *Gut* 1983; 24: 284-287.
34. Hill GL, Bourchier RG, Witney GB. Surgical and metabolic management of patients with external fistulas of the small intestine associated with Crohn's disease. *World J Surg* 1988; 12: 191-197.
35. Morales V, Enríquez JM, Camuñas J, Fernández J, Carda P, Devesa M et al. Intestinal fistula in Crohn disease. *Rev Esp Enferm Apar Dig* 1989; 76: 115-119.
36. McIntyre PB, Ritchie JK, Hawley PR, Bartram CI, Lennard-Jones JE. Management of enterocutaneous fistulas: a review of 132 cases. *Br J Surg* 1984; 71: 293-296.
37. McLeod RS. Management of fistula-in-ano: 1990 Roussel Lecture. *Can J Surg* 1991; 34: 581-585.
38. Van Dongen LM, Lubbers EJ. Perianal fistulas in patients with Crohn's disease. *Arch Surg* 1986; 121: 1187-1190.
39. Hobbiss JH, Schofield PF. Management of perianal Crohn's disease. *J R Soc Med* 1982; 75: 414-417.
40. Fuhrman GM, Larach SW. Experience with perirectal fistulas in patients with Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 1989; 32: 847-848.
41. Schneider MU, Laudage G, Guggenmoos-Holzmann I, Riemann JF. Metronidazole in the treatment of Crohn disease. Results of a controlled randomized prospective study. *Dtsch Med Wochenschr* 1985; 110: 1724-1730.
42. Jones JH, Lennard-Jones JF. Corticosteroids and corticotropin in the treatment of Crohn's disease. *Gut* 1966; 7: 181-187.
43. Sparberg M, Kirsner JB. Long-term corticosteroid therapy for regional enteritis: an analysis of 58 courses in 54 patients. *Am J Dig Dis* 1966; 11: 865-880.
44. Malchow H, Ewe K, Brandes JW, Goebell H, Ehms H, Sommer H et al. European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): results of drug treatment. *Gastroenterology* 1984; 86: 249-266.
45. Bernstein LH, Frank MS, Brandt LJ, Boley SJ. Healing of perineal Crohn's disease with metronidazole. *Gastroenterology* 1980; 79: 357-365.
46. Brandt LJ, Bernstein LH, Boley SJ, Frank MS. Metronidazole therapy for perineal Crohn's disease: a follow-up study. *Gastroenterology* 1982; 83: 383-387.
47. Jakobovits J, Schuster MM. Metronidazole therapy for Crohn's disease and associated fistulae. *Am J Gastroenterol* 1984; 79: 533-540.
48. Ursing B, Kamme C. Metronidazole for Crohn's disease. *Lancet* 1975; 1: 775-777.
49. Kasper H, Sommer H, Kuhn HA. Therapy of Crohn's disease with metronidazole – an uncontrolled trial. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)* 1979; 26: 217-221.
50. Peitz U, Brucks U, Malfertheiner P. Conservative therapy of fistulas of the anorectal area in Crohn disease. *Zentralbl Chir* 1999; 124: 42-44.
51. Turunen U, Farkkila M, Seppala L. Long-term treatment of perianal or fistulous Crohn's disease with Ciprofloxacin. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24 (Supl 148): 144.
52. Solomon M, McLeod R, O'Connor B, Steinhart A, Grnberg G, Cohen Z. Combination ciprofloxacin and metronidazole in severe perianal Crohn's disease. *Can J Gastroenterol* 1993; 7: 571-573.
53. Brown CH, Achkar E. Azathioprine therapy for inflammatory bowel disease. A preliminary report. *Am J Gastroenterol* 1970; 54: 363-377.
54. Drucker WR, Jeejeebhoy KN. Azathioprine: an adjunct to surgical therapy of granulomatous enteritis. *Ann Surg* 1970; 172: 618-626.
55. Brooke BN, Javett SL, Davison OW. Further experience with azathioprine for Crohn's disease. *Lancet* 1970; 2: 1050-1053.
56. Pearson DC, May GR, Fick GH, Sutherland LR. Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1995; 123: 132-142.
57. Rhodes J, Bainton D, Beck P, Campbell H. Controlled trial of azathioprine in Crohn's disease. *Lancet* 1971; 2: 1273-1276.
58. Willoughby JM, Beckett J, Kumar PJ, Dawson AM. Controlled trial of azathioprine in Crohn's disease. *Lancet* 1971; 2: 944-947.
59. Present DH, Korelitz BI, Wisch N, Glass JL, Sachar DB, Pasternack BS. Treatment of Crohn's disease with 6-mercaptopurine. A long-term, randomized, double-blind study. *N Engl J Med* 1980; 302: 981-987.
60. Klein M, Binder HJ, Mitchell M, Aaronson R, Spiro H. Treatment of Crohn's disease with azathioprine: a controlled evaluation. *Gastroenterology* 1974; 66: 916-922.
61. Rosenberg JL, Levin B, Wall AJ, Kirsner JB. A controlled trial of azathioprine in Crohn's disease. *Am J Dig Dis* 1975; 20: 721-726.
62. Ewe K, Press AG, Singe CC, Stuffer M, Ueberschaer B, Hommel G et al. Azathioprine combined with prednisolone or monotherapy with prednisolone in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 1993; 105: 367-372.

63. Summers RW, Switz DM, Sessions JT Jr, Beektel JM, Best WR, Kern F Jr et al. National Cooperative Crohn's Disease Study: results of drug treatment. *Gastroenterology* 1979; 77: 847-869.
64. O'Brien JJ, Bayless TM, Bayless JA. Use of azathioprine or 6-mercaptopurine in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1991; 101: 39-46.
65. Hannauer SB, Smith MB. Rapid closure of Crohn's disease fistulas with continuous intravenous cyclosporin A. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 646-649.
66. Present DH, Lichtiger S. Efficacy of cyclosporine in treatment of fistula of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 374-380.
67. Egan LJ, Sandborn WJ, Tremaine WJ. Clinical outcome following treatment of refractory inflammatory and fistulizing Crohn's disease with intravenous cyclosporine. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 442-448.
68. Hinterleitner TA, Petritsch W, Aichbichler B, Fickert P, Ranner G, Krejs GJ. Combination of cyclosporine, azathioprine and prednisolone for perianal fistulas in Crohn's disease. *Z Gastroenterol* 1997; 35: 603-608.
69. Muhadevan U, Marion J, Present DH. The place of methotrexate in the treatment of refractory Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997; 112: A1031.
70. Hinojosa J. Anti-TNF antibodies in the treatment of intestinal inflammatory disease. *Gastroenterol Hepatol* 2000; 23: 250-257.
71. Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, Van Hogezand RA et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 1398-1405.
72. Ricart E, Panaccione R, Loftus EV, Tremaine WJ, Sandborn WJ. Successful management of Crohn's disease of the ileoanal pouch with infliximab. *Gastroenterology* 1999; 117: 429-432.
73. Heller T, James SP, Drachenberg C, Hernández C, Darwin PE. Treatment of severe esophageal Crohn's disease with infliximab. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5: 279-282.
74. Bell SJ, Kamm MA. Review article: the clinical role of anti-TNFalpha antibody treatment in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 501-514.
75. Sandborn WJ. Preliminary report on the use of oral tacrolimus (FK506) in the treatment of complicated proximal small bowel and fistulizing Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 876-879.
76. Lowry PW, Weaver AL, Tremaine WJ, Sandborn WJ. Combination therapy with oral tacrolimus (FK 506) and azathioprine or 6-mercaptopurine for treatment-refractory Crohn's disease perianal fistulae. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5: 239-245.
77. Fellermann K, Ludwig D, Stahl M, David-Ralek T, Stange EF. Steroid-unresponsive acute attacks of inflammatory bowel disease: immunomodulation by tacrolimus (FK506). *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1860-1866.
78. Ierardi E, Principi M, Rendina M, Francavilla R, Ingrosso M, Pisani A et al. Oral tacrolimus (FK 506) in Crohn's disease complicated by fistulae of the perineum. *J Clin Gastroenterol* 2000; 30: 200-202.
79. Fickert P, Hinterleitner TA, Wenzl HH, Aichbichler BW, Petritsch W. Mycophenolate mofetil in patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2529-2532.
80. Ehrenpreis ED, Kane SV, Cohen LB, Cohen RD, Hanauer SB. Thalidomide therapy for patients with refractory Crohn's disease: an open-label trial. *Gastroenterology* 1999; 117: 1271-1277.
81. Vasilias EA, Kam LY, Abreu-Martin MT, Hassard PV, Papadakis KA, Yang H et al. An open-label pilot study of low-dose thalidomide in chronically active, steroid-dependent Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999; 117: 1278-1287.