

Presencia de *Escherichia coli* intracelular en mucosa intestinal de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal y su asociación con características clínicas y el uso de corticosteroides

MARJORIE DE LA FUENTE^{1,2,a,g}, ISIDORA CHAHUÁN^{1,b}, ROCÍO GUTIÉRREZ^{1,b}, DAVID DÍAZ-JIMÉNEZ^{1,c}, MAURICIO OLIVARES^{1,d,g}, ROBERTO VIDAL^{3,e,g}, DANIELA SIMIAN^{2,f}, CAROLINA FIGUEROA^{4,h}, RODRIGO QUERA^{4,h}, MARCELA A. HERMOSO^{1,a,g}

Presence of intracellular *Escherichia coli* in patients with inflammatory bowel disease

Background: Different strains of invasive *Escherichia coli* (*E. coli*), isolated from intestinal mucosa of patients, are related to the pathogenesis of inflammatory bowel diseases (IBD). **Aim:** To evaluate an association between intracellular *E. coli* and IBD; its clinical characteristics and use of steroids. **Material and Methods:** Sixty one patients with Crohn's disease and 83 with ulcerative colitis were studied. To determine the intracellular *E. coli* content, colonoscopy biopsies of these patients and 29 control subjects were processed using the gentamicin protection assay. Differences in the bacterial content between patient groups were evaluated using Mann-Whitney test, while the association between presence of *E. coli* with endoscopic activity, location/extension and use of corticosteroid as anti-inflammatory treatment were evaluated with Fisher's exact test or Chi-square test. **Results:** *E. coli* strains were detected in 36.1, 39.3 and 10.3% of patients with ulcerative colitis, Crohn's disease and controls, respectively. The number of bacteria per biopsy in Crohn's disease and ulcerative colitis was significantly higher than in controls ($p < 0.01$ between patients and controls). In ulcerative colitis, significant associations were found between the presence of bacteria and disease location and use of corticosteroids. In Crohn's disease, no association was found. **Conclusions:** IBD are associated with the presence of intracellular *E. coli* strains in the intestinal mucosa, suggesting an alteration in the microbiota or loss of integrity of the epithelial barrier. The association of intracellular *E. coli* with clinical features and the use of corticosteroids in ulcerative colitis suggests that different factors could promote colonization or proliferation of these bacteria.

(Rev Med Chile 2017; 145: 1129-1136)

Key words: Colitis, Ulcerative; Crohn Disease; *Escherichia coli*; Microbiota.

¹Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

²Subdirección de Investigación Clínica, Clínica Las Condes. Santiago, Chile.

³Programa Disciplinario de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

⁴Servicio de Gastroenterología, Clínica Las Condes. Santiago, Chile.

^aBioquímico.

^bEstudiante Medicina, Universidad de Chile.

^cBioquímico, PhDc.

^dTecnólogo Médico.

^eProfesor de Estado.

^fEnfermera de investigación.

^gPhD.

^hGastroenterólogo.

Financiamiento: Proyecto Fondecyt 1120577, Proyecto CLC P12012-DA015.

Los autores no declaran conflicto de interés.

Recibido el 13 de enero de 2017, aceptado el 3 de octubre de 2017.

Correspondencia a:
Dra. Marcela A. Hermoso.
Programa de Inmunología,
Facultad de Medicina,
Universidad de Chile.
Independencia 1027.
Teléfono: +56 22 9786572
mhermoso@med.uchile.cl

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una patología inflamatoria crónica de origen multifactorial que afecta principalmente al tracto gastrointestinal.¹ Sus principales

variantes son la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU)². Aunque a nivel nacional no existen datos sobre incidencia y prevalencia de las EII, estudios locales demuestran un au-

mento de pacientes diagnosticados en la última década³⁻⁵.

La EC puede comprometer cualquier área del tracto gastrointestinal, afectando más frecuentemente íleon terminal y colon. Está caracterizada por la presencia de lesiones transmurales discontinuas⁶, y puede presentar distintos fenotipos: inflamatorio, fistulizante o estenosante⁷. La CU se describe por una lesión en la mucosa que afecta en su inicio principalmente el recto, pudiendo extenderse en forma continua y difusa hacia el resto del colon².

Diversos factores han sido asociados con mayor riesgo de EII, destacando la genética, respuesta inmune y medioambiente^{1,8,9}.

Factores ambientales como la dieta e influencia hormonal, han sido asociados con alteraciones en la microbiota intestinal y la integridad de la mucosa¹⁰. Es así como, fibras vegetales solubles favorecen el mantenimiento de la integridad epitelial y reducen la translocación de *E. coli* invasivas a través de las células M, lo que podría asociarse con un menor riesgo de EII¹¹.

La *E. coli* es un bacilo gram-negativo presente en la microbiota normal del colon humano¹². Sin embargo, algunas cepas han adquirido factores de virulencia permitiéndoles adaptarse a nuevos nichos y generar enfermedad. Seis patotipos diarreogénicos han sido descritos: *E. coli* entero-patogénica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC), y difusa-adherente (DAEC)¹².

Hace más de dos décadas la presencia de *E. coli* fue identificada en la mucosa de 57% de los pacientes con EC, dando los primeros indicios de que esta bacteria podría jugar un papel en la patología¹³.

Posteriormente, cepas de *E. coli* con características adherente-invasiva (AIEC) fueron aisladas de mucosa intestinal de pacientes con EII. Esta bacteria posee la capacidad de invadir células epiteliales, replicar en macrófagos e inducir la liberación de TNF- α ^{8,14}.

Actualmente, una de las terapias más utilizadas para lograr remisión en las EII es el uso de corticosteroides, los que poseen un efecto anti-inflamatorio e inmunosupresor¹⁵, por lo que en estos pacientes la respuesta a bacterias en la mucosa intestinal podría verse alterada.

Dado que estos antecedentes demuestran

una relación entre las EII con cepas de *E. coli* con características patogénicas, en este estudio evaluaremos la presencia de *E. coli* intracelular en mucosa intestinal de pacientes con EII y su asociación con las características clínicas/demográficas y el uso de corticosteroides como tratamiento anti-inflamatorio.

Materiales y Métodos

Pacientes

Pacientes con diagnóstico de EC y CU, de acuerdo a hallazgos endoscópicos, histológicos y radiológicos, y controles sometidos a colonoscopia fueron enrolados desde el Servicio de Gastroenterología de Clínica Las Condes (CLC).

Para el protocolo de obtención de bacterias intracelulares, presuntamente invasivas, 61 pacientes con EC, 83 con CU y 29 controles fueron incorporados al estudio prospectivo. La Tabla 1 muestra los pacientes agrupados de acuerdo a edad, género y actividad de la enfermedad. La localización/extensión y fenotipo de la patología, según corresponda, fue indicada en aquellos pacientes con actividad inflamatoria en la colonoscopia.

Pacientes con EC y CU de ambos géneros y mayores de 18 años edad fueron incluidos en el estudio, mientras que aquellos con tratamiento

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los pacientes y controles

| | EC | CU | Controles |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|
| n total de pacientes | 61 | 83 | 29 |
| Promedio de edad (rango) | 38,2 (18-83) | 40,4 (19-67) | 51,7 (24-71) |
| Género M/F | 28/33 | 32/51 | 9/20 |
| Activos/Remisión | 52/9 | 58/25 | - |
| Localización | | | |
| Íleon | 17 | - | - |
| Ileocolon | 16 | - | - |
| Colon | 19 | - | - |
| Extensión | | | |
| Proctitis | - | 14 | - |
| Izquierda | - | 7 | - |
| Extensa | - | 37 | - |
| Fenotipo | | | |
| Inflamatorio | 42 | - | - |
| Estenosante | 8 | - | - |
| Fistulizante | 2 | - | - |

antibiótico de hasta dos semanas previas al procedimiento, pacientes con EII no clasificable, colitis indeterminada, ileocolitis infecciosa, historia de enfermedad autoinmune, alergia alimentaria y enfermedad celíaca fueron excluidos.

Como grupo control, se incluyeron pacientes mayores de 18 años en pesquisa de programa de cáncer de colon con mucosa sana, excluyendo a todos aquellos con EII, diverticulitis, cáncer colorrectal y tratamiento antibiótico de hasta dos semanas previas a la colonoscopia.

Los pacientes con EII fueron categorizados según características clínicas, como actividad endoscópica, localización de lesiones intestinales, fenotipo y tratamiento.

La actividad endoscópica de pacientes con EC fue determinada de acuerdo a la graduación SES-CD donde una graduación ≤ 2 fue definida como remisión, 3-6 actividad leve, 7-15 moderada y ≥ 16 actividad severa^{16,17}.

La localización de lesiones y fenotipo de la EC fueron definidas utilizando la Clasificación de Montreal, distinguiéndose los pacientes con lesiones en íleon, colon e ileocolon; y fenotipos inflamatorio, estenosante, fistulizante¹⁸.

En pacientes con CU, los hallazgos endoscópicos fueron graduados según el subíndice endoscópico de Mayo, donde el índice 0 indica una mucosa sin lesiones, 1 actividad leve, 2 moderada y 3 severa¹⁹. Adicionalmente, una enfermedad con un *score* ≥ 3 en EC y un subíndice ≥ 2 en CU se consideró como endoscópicamente activa.

La extensión de la CU también fue definida mediante la Clasificación de Montreal en proctitis, colitis izquierda y colitis extensa.¹⁸

El grupo control fue conformado por individuos sanos en programa de pesquisa de cáncer de colon.

La relación entre la presencia de cepas de *E. coli* intracelular en mucosa intestinal y tratamiento con corticosteroides (prednisona, hidrocortisona, budesonida), fue evaluada en un grupo de 55 pacientes con CU y 31 con EC (Tabla 2), que corresponden a un subgrupo de pacientes de la base de datos, en los que se cuenta con información completa de su terapia, excluyendo a pacientes derivados de segunda opinión.

Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética de CLC. Los pacientes fueron consultados sobre su participación y firmaron un consentimiento informado previo a la colonoscopia.

Obtención de bacterias invasivas

Cepas de *Escherichia coli* intracelulares, tanto en pacientes con EII como en grupo control, fueron aisladas desde biopsias de íleon mediante el ensayo de protección a gentamicina. Para esto, las biopsias fueron incubadas en medio HBSS (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) por 1 h a 37°C. Posteriormente, las muestras fueron lavadas 5 veces con PBS 1X (Calbiochem, Merck Biosciences Ltd, Nottingham, Darmstadt, Germany) y luego lisadas en 1% Triton-X-100/PBS. Diluciones seriadas del homogenizado del tejido fueron cultivadas en placas agar MacConkey (Oxoid Ltd, Wade Road, Basingstoke, Hampshire, UK) a 37°C durante la noche, para finalmente realizar el recuento de colonias.

Ensayos estadísticos

Las diferencias entre el número de bacterias identificadas entre grupos de pacientes fue evaluada con el test de Mann-Whitney. Mientras que la asociación entre la presencia de bacterias en mucosa intestinal, con características clínicas de los pacientes fue evaluada utilizando test de Fisher de dos colas o χ^2 . Diferencias estadísticamente significativas fueron consideradas aquellas con

Tabla 2. Tratamiento médico seguido por pacientes con EII

| | EC | CU |
|--|------|------|
| Número total de pacientes | 31 | 55 |
| Activos/Remisión | 27/4 | 46/9 |
| Tratamiento | | |
| Sin medicación | 5 | 8 |
| 5-ASA | 3 | 23 |
| AZA | 6 | 5 |
| Anti-TNF | 3 | 0 |
| 5-ASA + AZA | 2 | 3 |
| AZA + Anti-TNF | 5 | 1 |
| Anti-TNF + Metotrexato | 1 | 0 |
| 5-asa + AZA + Anti-TNF | 0 | 2 |
| Corticoesteroides | 4 | 1 |
| Corticoesteroides + 5-ASA | 0 | 5 |
| Corticoesteroides + AZA | 0 | 2 |
| Corticoesteroides + 5-ASA + AZA | 1 | 4 |
| Corticoesteroides + AZA + Anti-TNF | 1 | 0 |
| Corticoesteroides + 5-ASA + AZA + Anti-TNF | 0 | 1 |

valor de $p < 0,05$. Los análisis de los resultados fueron realizados empleando el programa Graphpad_Prism v5.

Resultados

En este trabajo, cepas de *E. coli* intracelular fueron identificadas en 24/61 pacientes con EC (39,3%), 30/83 pacientes con CU (36,1%) y 3/29 controles (10,3%). Una gran dispersión fue observada en el número de cepas aisladas de mucosa de pacientes con EII en comparación a los pacientes control, donde en su mayoría no se identificó bacterias o el contenido fue muy bajo (Figura 1). Diferencias estadísticamente significativas fueron identificadas en el contenido bacteriano de biopsias de pacientes con CU ($p = 0,0059$) y EC ($p = 0,0045$) comparado al grupo control, pero no al comparar EC y CU ($p = 0,7571$).

Análisis de asociación de bacterias con género de los pacientes

De los pacientes con EII, 33/61 individuos con EC (54%), y 51/83 pacientes con CU (61,44%), son de género femenino. El ensayo estadístico no reflejó asociación entre presencia de *E. coli* intracelulares con género de pacientes con EC ($p = 0,0646$) o CU ($p = 0,6393$) (Tabla 3), sugiriendo que el género no se asocia a la colonización de estas bacterias en mucosa intestinal de pacientes con EII.

Análisis de asociación de bacterias con actividad en la EII

Del total de 83 pacientes con CU, 58 se encontraban en estado activo. En este grupo, 23/58 pacientes (39,7%) presentan cepas de *E. coli*, mientras que 35 (60,3%) no presentan. Por otra parte, de los 25 pacientes inactivos, 7 (28,0%) presentan bacterias (Tabla 3). El ensayo estadístico no arrojó una diferencia significativa entre ambos grupos ($p = 0,4555$).

En los pacientes con EC, 52 de los 61 pacientes enrolados se encontraban en estado activo. En este grupo 18/52 pacientes (34,6%) presentan cepas de *E. coli* intracelular. De los 9 pacientes inactivos, 6 de ellos (67%) presentan la bacteria. El test estadístico no arrojó significancia, ($p = 0,1358$), por lo que estas dos variables no estarían asociadas. (Tabla 3).

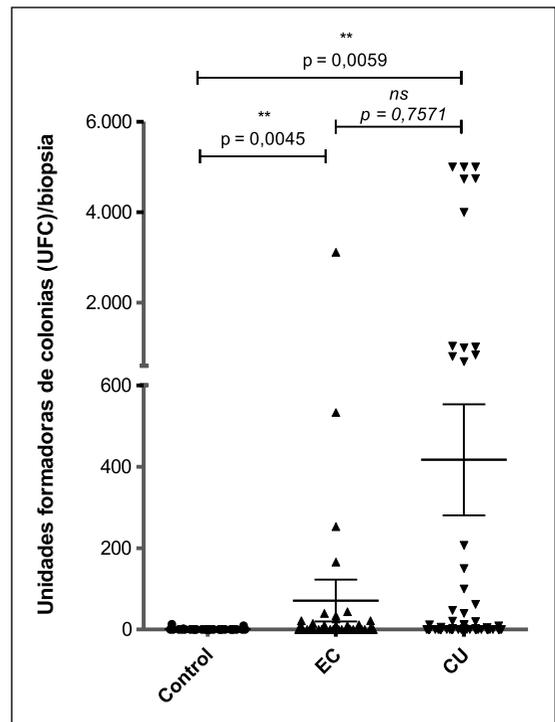


Figura 1. Contenido bacteriano en biopsias de pacientes. Cada punto representa las unidades formadoras de colonia identificada en las biopsias obtenidas de individuos control, y pacientes con CU y EC. Además se indica el promedio de bacterias y el error estándar de la media para cada grupo. Prueba estadística utilizada: Mann Whitney test de dos colas, nivel de significancia: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

Análisis de asociación de bacterias según localización/extensión de las lesiones en la EII

La asociación entre localización de lesiones en pacientes con CU y la presencia de bacterias fue evaluada en los 58 pacientes activos. En CU, 13/37 (35,1%), 6/7 (85,7%) y 4/14 (28,5%) pacientes con pancolitis, CU izquierda y proctitis presentaron bacterias respectivamente. El test estadístico para evaluar asociación entre las variables arrojó significancia ($p = 0,0268$) (Tabla 3).

De forma similar, la asociación entre bacterias y localización de las lesiones fue evaluada en un total de 52 pacientes activos con EC. Presentaron bacterias 6/17 (35,2%), 5/16 (31,25%) y 7/19 (36,8%) pacientes con compromiso de íleon, ileocolon y colon, respectivamente. El test estadístico no arrojó significancia ($p = 0,9393$), por lo que en EC las variables localización de lesiones y *E. coli* no están asociadas (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de asociación de bacterias con características clínicas de los pacientes con EII

| Características | Enfermedad de Crohn | | | Colitis ulcerosa | | |
|-----------------------------|---------------------|------------|---------|------------------|------------|----------------|
| | + bacteria | - bacteria | p value | + bacteria | - bacteria | p value |
| Género | | | | | | |
| Femenino | 9 | 24 | 0,0646 | 17 | 34 | 0,6393 |
| Masculino | 15 | 13 | | 13 | 19 | |
| Actividad | | | | | | |
| Activo | 18 | 34 | 0,1358 | 23 | 35 | 0,4555 |
| Remisión | 6 | 3 | | 7 | 18 | |
| Localización ⁽⁺⁾ | | | | | | |
| Ileon | 6 | 11 | 0,9393 | | | |
| Ileocolon | 5 | 11 | | | | |
| Colon | 7 | 12 | | | | |
| Extensión ⁽⁺⁾ | | | | | | |
| Proctitis | | | | 4 | 10 | 0,0268* |
| Izquierda | | | | 6 | 1 | |
| Extensa | | | | 13 | 24 | |

Se indica el número de pacientes con EC o CU que presentaron o no bacterias de acuerdo a características clínicas como género, actividad y localización/extensión. Se utilizó la prueba estadística test de Fisher o Chi cuadrado, de dos colas, con nivel de significancia: $p < 0,05$. ⁽⁺⁾ χ^2 .

Tabla 4. Análisis de asociación de bacterias en pacientes con o sin uso de corticosteroides

| Características Tratamiento | Enfermedad de Crohn | | | Colitis ulcerosa | | |
|--------------------------------|---------------------|------------|---------|------------------|------------|---------|
| | + bacteria | - bacteria | p value | + bacteria | - bacteria | p value |
| Con corticosteroides | 1 | 5 | 0,6342 | 10 | 3 | 0,0009* |
| Sin corticosteroides | 9 | 16 | | 10 | 32 | |

Se utilizó la prueba estadística test de Fisher de dos colas, nivel de significancia: $p < 0,05$.

Análisis de asociación de bacterias y fenotipo en EC

El fenotipo en EC fue evaluado para los 52 pacientes activos. Las bacterias fueron identificadas en 15/42 (35,7%), 3/8 (37,5%) y 0/2 pacientes con fenotipo inflamatorio, estenosante y fistulizante, respectivamente. Dada la baja representatividad del fenotipo estenosante y fistulizante, no se realizó análisis comparativo entre estos grupos.

Análisis de asociación de bacterias con tratamiento de corticoesteroides

La relación entre presencia de *E. coli* intracelular y el uso de corticosteroides fue evaluada en 31 pacientes con EC y 55 pacientes con CU. En pacientes con EC la presencia de bacterias fue

detectada en 1/6 (16,6%) y 9/25 (36%) pacientes, recibiendo o no tratamiento de corticosteroides, respectivamente; sin encontrarse asociación entre las variables ($p = 0,6342$). Por otro lado, presencia de bacterias en paciente con CU fue identificada en 10/13 (76,9%) y 10/42 (23,8%), con y sin tratamiento respectivamente, encontrando diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0,0009$) (Tabla 4).

Discusión

Este estudio demostró que la presencia de *E. coli* intracelular en pacientes con EII está asociada

a ciertas características clínicas de los pacientes, tales como extensión de las lesiones y tratamiento con corticosteroides.

La presencia de *E. coli* con propiedades adherente-invasivas (AIEC) fue demostrada previamente en pacientes con EII^{20,21}. Estudios realizados en Europa identificaron la presencia de AIEC principalmente en pacientes con EC versus CU. Incluso, cepas AIEC fueron asociadas con compromiso de íleon en pacientes con EC²⁰. Recientemente, en una muestra acotada de pacientes con EII, nuestro grupo demostró que una alta proporción de casos con CU y EC presentan cepas de *E. coli* con características patogénicas, sin embargo, no se identificaron relaciones significativas con características clínicas y demográficas²¹, por lo que el presente trabajo constituye el primer estudio en Chile que relaciona estas variables.

En este estudio identificamos una alta proporción de pacientes con CU y EC que presentaron *E. coli* intracelular en comparación a controles. Estos resultados sugieren que la presencia de bacteria en la mucosa intestinal estaría asociada a EII, probablemente por una alteración en la microbiota intestinal o en la integridad de la barrera epitelial de los pacientes con posibles consecuencias en la regulación de la respuesta inmune local²². No obstante, sería interesante proyectar el análisis de la variación del número de bacterias en un protocolo de seguimiento de los pacientes y de su enfermedad, en relación a los períodos de actividad/remisión.

En pacientes con EII no observamos asociación entre presencia de bacteria en mucosa intestinal con el género de los pacientes. Sin embargo, se debe reconocer que el género puede afectar la composición de la microbiota, ya que diferencias entre hombres y mujeres han sido descritas^{23,24}. Asimismo, algunos trabajos sugieren que el género puede tener una influencia en la microbiota intestinal en distintas patologías, tales como síndrome de intestino irritable y EII^{25,26}.

En pacientes con EII, no se encontró asociación entre bacterias y actividad de la enfermedad. Sin embargo, en el grupo con CU un mayor porcentaje de pacientes en estado activo (40%) presenta bacterias en comparación a aquellos en estado inactivo (28%). Cuando consideramos pacientes activos a aquellos con un índice de Mayo ≥ 1 , es decir, incluimos a aquellos que tengan un compromiso leve de la enfermedad, si encontramos

asociación ($p = 0,0411$) (datos no mostrados). Esto sugiere que las bacterias podrían participar en la alteración de la mucosa, incluso cuando cursa con lesiones leves. No observamos esta tendencia en pacientes con EC, probablemente por el bajo número en estado inactivo.

Antecedentes de la literatura muestran un mayor contenido bacteriano en íleon terminal de pacientes con EC, esto asociado a una mayor expresión de CEACAM6 en células epiteliales que serviría de ligando para la adhesión de la bacteria²⁷. En este trabajo no se identificó asociación de bacterias y localización de las lesiones en pacientes con EC. Sin embargo, hubo asociación entre la presencia de bacterias con la extensión de CU, esto posiblemente debido a que 85,7% de los pacientes con colitis izquierda presentan bacterias, mientras que se encontraron bacterias en 28% y 35,1% de los pacientes con proctitis y compromiso extenso, respectivamente. Estas observaciones podrían ser consecuencia de una diferencia en los mecanismos de adhesión de las cepas de nuestra población comparado con otras poblaciones reportadas²⁸.

En cuanto al tratamiento, se encontró asociación entre la presencia de bacterias y el uso de corticosteroides en CU. Los corticosteroides poseen un efecto inmunosupresor que podría afectar células del sistema inmune encargadas del reconocimiento y eliminación de patógenos, alterando la eliminación eficiente de la bacteria^{29,30}. Además, en un modelo murino de colitis, se demostró que los corticosteroides pueden afectar la microbiota intestinal y la expresión del gen *muc2*, disminuyendo la secreción de mucina y alterando la barrera intestinal³¹.

En el análisis para pacientes con EC, no se identificó asociación de bacterias con el uso de corticosteroides. Esta observación puede ser un reflejo de diferencias en las cepas involucradas en EC versus CU. Estudios de comparación genético/molecular de las cepas aisladas en los distintos pacientes EII podrían aclarar esta hipótesis.

Las EII son enfermedades multifactoriales, en las que alteraciones en la microbiota, y la colonización de bacterias como *E. coli*, podrían cumplir un papel importante en estas enfermedades. Es posible que otras bacterias, virus u hongos con características patogénicas afecten la microbiota intestinal de estos pacientes, sin embargo, es necesario la utilización de técnicas complementarias para identificarlos. Estudios similares permitirán

ahondar en otros factores que puedan estar ligados a estas enfermedades crónicas, sin cura hasta la fecha, con énfasis en la manera de mejorar el manejo de los pacientes y su calidad de vida.

Referencias

1. Sepúlveda SE, Beltrán CJ, Peralta A, Rivas P, Rojas N, Figueroa C, et al. [Inflammatory bowel diseases: an immunological approach]. *Rev Med Chile* 2008; 136 (3): 367-75.
2. Abraham C, Cho JH. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* 2009; 21361 (19): 2066-78.
3. Figueroa CC, Quera PR, Valenzuela EJ, Jensen BC. [Inflammatory bowel disease: experience of two Chilean centers]. *Rev Med Chile* 2005; 133 (11): 1295-304.
4. Simian D, Estay C, Lubascher J, Acuña R, Kronberg U, Figueroa C, et al. Enfermedad inflamatoria intestinal a partir de una experiencia local. *Rev Med Chile* 2014; 142 (8): 1006-13.
5. Simian D, Fluxá D, Flores L, Lubascher J, Ibáñez P, Figueroa C, et al. Inflammatory bowel disease: A descriptive study of 716 local Chilean patients. *World J Gastroenterol* 2016; 22 (22): 5267-75.
6. Marks DJB, Harbord MWN, MacAllister R, Rahman FZ, Young J, Al-Lazikani B, et al. Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *Lancet (London, England)* 2006; 367 (9511): 668-78.
7. Rodrigo L, Martínez-Borra J, Garrote JA, Niño P, León AJ, Riestra V, et al. [CARD15 mutations are poorly related to Crohn's disease phenotypes in Asturias]. *Rev española enfermedades Dig organo Of la Soc Española Patol Dig* 2007; 99 (10): 570-757.
8. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev. Elsevier B.V.* 2014; 13 (1): 3-10.
9. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Impact of New Keys in Pathophysiology on IBD Treatment Genes and Environment: How Will Our Concepts on the Pathophysiology of IBD Develop in the Future? *Dig Dis* 2010; 28: 395-405.
10. Ananthakrishnan AN. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: A Review. *Dig Dis Sci* 2015; 60 (2): 290-8.
11. Roberts CL, Keita AV, Duncan SH, O'Kennedy N, Soderholm JD, Rhodes JM, et al. Translocation of Crohn's disease *Escherichia coli* across M-cells: contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers. *Gut* 2010; 59 (10): 1331-9.
12. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2 (2): 123-40.
13. Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A, Colombel JF. Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus antigens* in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995; 108 (5): 1396-404.
14. Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int J Med Microbiol* 2002; 292 (193).
15. Ford AC, Bernstein CN, Khan KJ, Abreu MT, Marshall JK, Talley NJ, et al. Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol. Nature Publishing Group* 2011; 106 (4): 590-9.
16. Koutroumpakis E, Katsanos K. Implementation of the simple endoscopic activity score in crohn's disease. *Saudi J Gastroenterol* 2016; 22 (3): 183.
17. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* 2004; 60 (4): 505-12.
18. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel J-F. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006; 55 (6): 749-53.
19. D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, Geboes K, Hanauer SB, Irvine EJ, et al. A Review of Activity Indices and Efficacy End Points for Clinical Trials of Medical Therapy in Adults With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 2007; 132 (2): 763-86.
20. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser A-L, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 127 (2): 412-21.
21. De La Fuente M, Franchi L, Araya D, Díaz-Jiménez D, Olivares M, Álvarez-Lobos M, et al. *Escherichia coli* isolates from inflammatory bowel diseases patients survive in macrophages and activate NLRP3 inflammasome. *Int J Med Microbiol* 2014; 304: 384-92.
22. Alarcón P, González M, Castro É. Rol de la microbiota gastrointestinal en la regulación de la respuesta inmune. *Rev Med Chile* 2016; 144: 910-6.
23. Dominianni C, Sinha R, Goedert JJ, Pei Z, Yang L, Hayes RB, et al. Sex, body mass index, and dietary fiber intake influence the human gut microbiome. *PLoS One* 2015; 10 (4): 1-14.
24. Haro C, Rangel-Zúñiga OA, Alcalá-Díaz JF, Gómez-Delgado F, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, et al. Intesti-

- nal Microbiota Is Influenced by Gender and Body Mass Index. *PLoS Biol* 2016; 1-16.
25. Mulak A, Taché Y, Larauche M. Sex hormones in the modulation of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2014; 20 (10): 2433-48.
 26. Kozik AJ. Sex, Age, and TNF Influence the Gut Microbiota in a Mouse Model of TNBS Colitis. *FASEB J* 2017; 31 (1): Supplement 657.12.
 27. Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, Chan CHF, Stanners CP, et al. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* 2009; 206 (10): 2179-89.
 28. Barnich N, Boudeau J, Claret L, Darfeuille-Michaud A. Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol Microbiol* 2003; 48 (3): 781-94.
 29. Skornik WA, Dressler DP. The effects of short-term steroid therapy on lung bacterial clearance and survival in rats. *Ann Surg* 1974; 179 (4): 415-21.
 30. Schaffner A. Therapeutic concentrations of glucocorticoids suppress the antimicrobial activity of human macrophages without impairing their responsiveness to gamma interferon. *J Clin Invest* 1985; 76 (5): 1755-64.
 31. Huang EY, Inoue T, Leone VA, Dalal S, Touw K, Wang Y, et al. Using corticosteroids to reshape the gut microbiome: implications for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2015; 21 (5): 963-72.