



EFFECTO DE LA CREATINA SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN



FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

ANA ROCÍO INFANTES GALLARDO



FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

EFFECTO DE LA CREATINA SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN

TRABAJO EXPERIMENTAL

Sevilla, 1 de julio de 2021

ANA ROCÍO INFANTES GALLARDO

TUTORES: PABLO GARCÍA MIRANDA Y MARIA JOSE PERAL RUBIO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN.....	5
1. Enfermedad inflamatoria intestinal	5
2. Eje intestino-cerebro	8
3. Inflamación intestinal y neuroinflamación	9
4. La creatina	9
OBJETIVOS.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
1. Aparatos	14
2. Animales de experimentación y material biológico	14
3. Inducción de la inflamación mediante DSS.....	15
4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real	16
5. Diseño experimental.....	17
6. Presentación de los resultados y análisis estadístico	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
1. Efecto de la creatina sobre el peso en el desarrollo de la colitis crónica	19
2. Efecto de la creatina sobre la neuroinflamación en hipocampo y corteza prefrontal.....	22
CONCLUSIÓN	28
BIBLIOGRAFÍA.....	29

RESUMEN

La colitis ulcerosa es una enfermedad intestinal inflamatoria (EII) que cursa con pérdida de peso, diarrea y sangrado rectal. Cuando se daña la barrera intestinal, se van a producir mediadores proinflamatorios en la zona, los cuales llegarán, vía nervio vago o vía sanguínea, al sistema nervioso central (SNC) dando lugar a neuroinflamación. Esta neuroinflamación podría derivar en enfermedades neurodegenerativas, trastornos cognitivos o de comportamiento. El objetivo de este trabajo fue estudiar si la colitis crónica produce neuroinflamación y cómo la creatina puede servir como neuroprotector o disminuir la sintomatología. Para ello, se utilizó un modelo de colitis crónica en ratas mediante la administración de tres ciclos de dextrano sulfato sódico (DSS) al 5%. Se evaluó diariamente la progresión de la enfermedad y, al finalizar el tratamiento, marcadores inflamatorios en el hipocampo y la corteza prefrontal mediante PCR en tiempo real. Los resultados muestran que el DSS produjo colitis debido a las manifestaciones clínicas que mostraron los animales. También se observó neuroinflamación, un aumento de la expresión de marcadores inflamatorios como la interleuquina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleuquina 1 β (IL-1 β) y la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). La suplementación con creatina atenuó las manifestaciones clínicas y disminuyó la expresión de TNF- α , IL-1 β e iNOS en el hipocampo. Sin embargo, en la corteza prefrontal solo se observó una tendencia de la creatina a disminuir la iNOS. Las conclusiones obtenidas en este estudio son preliminares pero los datos apuntan a que la creatina podría proteger del desarrollo de la colitis crónica y de la neuroinflamación, principalmente en el hipocampo.

PALABRAS CLAVE: Creatina, colitis ulcerosa, neuroinflamación, neuroprotección

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad inflamatoria intestinal

Las enfermedades inflamatorias intestinales son unas afecciones crónicas e idiopáticas caracterizadas por periodos de remisión y recaídas donde se destruye el tejido intestinal **(Ramos and Papadakis, 2018)**. Dentro de esta, se incluye la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. La colitis ulcerosa cursa con inflamación sobre la mucosa del colon y el recto, la cual puede llegar a extenderse por todo el intestino grueso con el paso del tiempo **(Figura 1)**. Los síntomas clínicos que se manifiestan son la pérdida de peso, diarrea, sangrado rectal, fiebre, dolor abdominal, anemia y pérdida del apetito. La patogénesis es multifactorial e incluye factores etiopatogénicos medioambientales, la microbiota intestinal, la genética y el factor principal, la desregulación de la respuesta inmune. El tratamiento principal para la colitis ulcerosa son los ácidos 5-aminosalicílicos, esteroides e inmunosupresores. A veces, se requiere de colostomía cuando la patología es muy refractaria **(Ungaro et al., 2018)**.

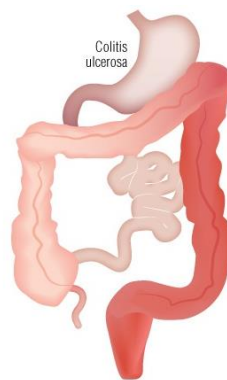


Figura 1. Localización de la inflamación en la colitis ulcerosa (Duelo, 2020).

Cuando existe esta patología, aumenta la permeabilidad de la barrera produciendo una infiltración de células inmunes innatas (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y natural killer) y adaptativas (linfocitos B y T) a la *lámina propia*. Los macrófagos y las células dañadas van a interactuar, provocando una respuesta inmune excesiva y haciendo que se secreten mediadores proinflamatorios como las interleuquinas (IL-6, IL-1 β), TFN- α , etc... **(Lertnimitphun et al., 2019)**.

El tracto gastrointestinal es una amplia área de exposición a antígenos. La barrera intestinal (**Figura 2**) tiene como función evitar la entrada de sustancias nocivas o patógenos, asegurando, al mismo tiempo, la entrada de nutrientes para que la homeostasis interna no se vea afectada.

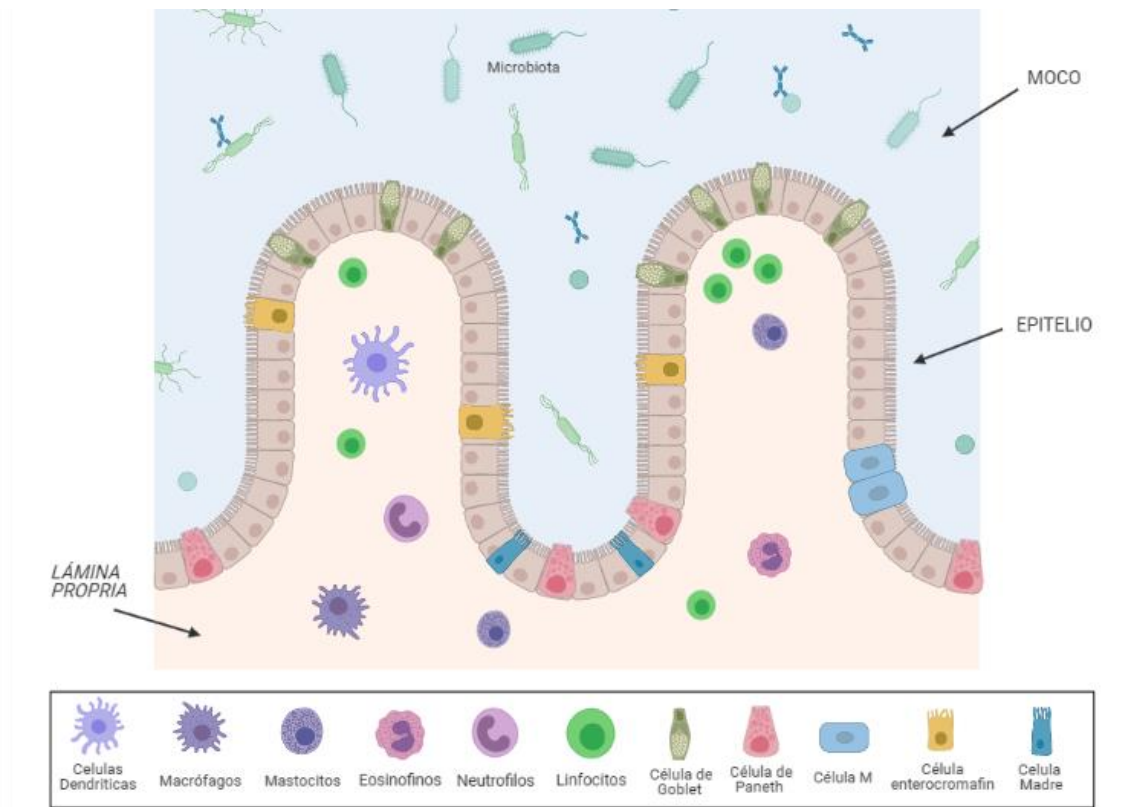


Figura 2. Componentes de la barrera intestinal. Dibujo esquematizado de los componentes de la barrera intestinal. Realizado en BioRender.com.

Esta barrera está compuesta por varias capas. El primer contacto con los antígenos se produce en las capas de moco, donde se encuentra, entre otras, la microbiota intestinal que ayuda a mantener el epitelio y limita la colonización de microorganismo patógenos. Tras esta, se localizan los colonocitos o células epiteliales intestinales que se sitúan en una sola capa de células polarizadas que se renuevan continuamente ejerciendo función de revestimiento e inmunológica. En esta misma capa hay presente otras células: Células de Goblet que secretan el moco, células Paneth que secretan defensinas, células cromafines que secretan hormonas y neuropéptidos, células M especializadas en la captación de antígenos y las células madre, progenitoras de las

células epiteliales. Otro componente importante del epitelio son las uniones intracelulares, cuya función es controlar el paso de moléculas. Bajo el epitelio, se sitúa la *lámina propia*, donde se encuentran tanto las células linfoides inductoras como células dendríticas, mastocitos o macrófagos y poblaciones de leucocitos, que son los efectores. Le sigue el tejido conectivo y el sistema nervioso entérico (SNE). El SNE permite el control de la homeostasis intestinal, entre otras formas, gracias a la actividad inmunológica y la microcirculación de neurotransmisores, citoquinas, factores de crecimiento y diferentes moléculas reguladoras **(Salvo-Romero et al., 2015)**.

La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria intestinal pero que, además, puede manifestar síntomas extraintestinales con una prevalencia del 6-47% de los casos de EII. Estas manifestaciones son problemas asociados a la actividad intestinal (artritis, aftas bucales, ...) o a la no actividad (uveítis, pioderma gangrenoso, ...), enfermedades autoinmunes no específicas de las EII (tiroides, anemia, vitíligo, diabetes mellitus, ...), complicaciones atribuidas a alteraciones metabólicas y anatómicas (osteopatía, tromboembolismos, nefrolitiasis, ...) **(Vavricka et al., 2015)** y por último, alteraciones en el cerebro, dando como resultado un aumento del riesgo de padecer depresión, ansiedad, estrés o déficits cognitivos **(Abautret-Daly et al., 2017)**.

Para estudiar la colitis ulcerosa, existe un modelo animal de colitis inducido por la administración al 5% de DSS en agua. Este modelo es el más utilizado y la enfermedad transcurrirá con una sintomatología bastante similar a la de los humanos. El mecanismo de acción de este compuesto se basa en el daño al epitelio intestinal permitiendo así la diseminación de elementos proinflamatorios. La utilización del modelo de colitis inducido por DSS tiene como ventaja sobre otros modelos la rapidez de la inducción, que es un modelo simple, bastante reproducible y además fácil de controlar **(Eichele and Kharbanda, 2017)**. De acuerdo con lo observado en humanos, la comunicación intestino-cerebro también explicaría que en modelos animales de colitis aguda hay alteraciones en la conducta en estos animales **(Chen et al., 2015; Hassan et al., 2014; Matisz et al., 2020; Nyuyki et al., 2018)**.

2. Eje intestino-cerebro

Entre el sistema nervioso central y el tracto gastrointestinal existe una comunicación bidireccional denominada “eje intestino-cerebro” (**Figura 3**) que va a tener relevante efecto en el SNC sobre comportamientos y patologías de la función cognitivas. En esta comunicación participa el sistema nervioso entérico, sistema nervioso autónomo, la médula espinal y el eje HPA (hipotálamo-pituitaria-glándula adrenal) (**Maqsood and Stone, 2016**).

La señal eferente al intestino es mediada a través del sistema nervioso autónomo y el eje HPA, modificando las secreciones, la motilidad del tracto digestivo o la permeabilidad de la barrera intestinal, entre otras (**Abautret-Daly et al., 2017**). Las señales aferentes del intestino se producen por dos vías: una neuronal, donde participa el nervio vago, y una hormonal por circulación sanguínea (**Maqsood and Stone, 2016**).

Los síntomas extraintestinales como los trastornos de la conducta observados en pacientes con EII podrían explicarse por esta comunicación intestino-cerebro. Los mediadores inflamatorios que se liberan en el intestino podrían llegar al SNC por vía vago o sanguínea (**Do and Woo, 2018**).

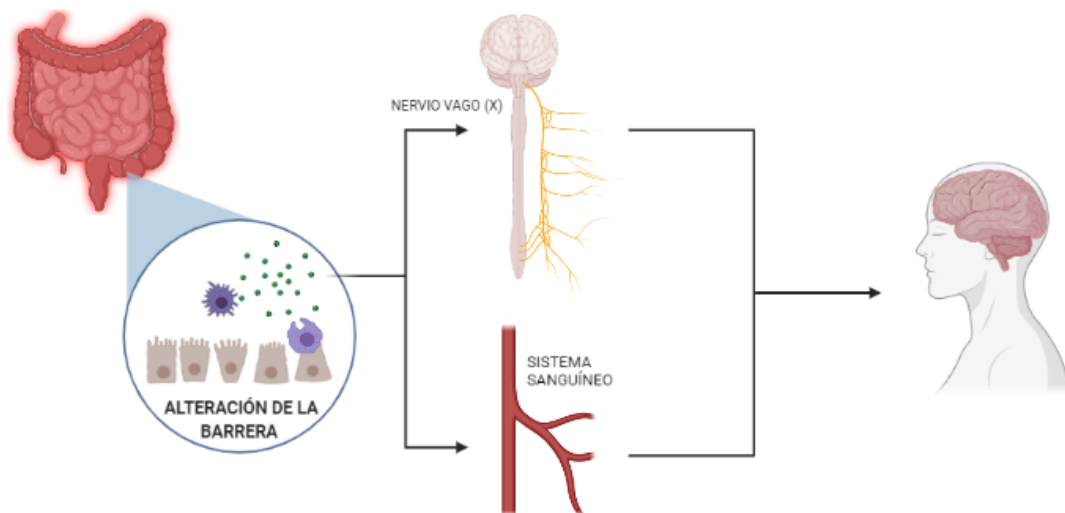


Figura 3. Eje intestino-cerebro esquematizado. Se muestran la interacción del eje en caso de daño en la barrera intestinal. Dibujo realizado en BioRender.com.

3. Inflamación intestinal y neuroinflamación

Si se produce una alteración de la barrera intestinal, es necesaria una rápida respuesta inflamatoria. El primer paso tras esto es la activación del sistema inmune innato, dando lugar a la respuesta inmune inespecífica llevada a cabo por las células epiteliales, células dendríticas, macrófagos y células *Natural Killer* (Salvo-Romero et al., 2015).

En el caso de que se produzca un proceso inflamatorio intestinal, las moléculas mediadoras de la inflamación viajarán a través del nervio vago o la sangre (Figura 3) hacia la barrera hematoencefálica, para llegar al cerebro. En un modelo animal de colitis crónica se ha observado un aumento de la expresión de IL-6, IL-1 β , iNOS o TNF- α , en hipocampo (Zonis et al., 2015). Cuando estos mediadores proinflamatorios llegan al cerebro, se va a producir la activación de los macrófagos del SNC, la microglía y los astrocitos, los cuales producirán sobre todo IL-6 e iNOS, dando lugar a neuroinflamación. Si este mecanismo de defensa sufre una activación continuada, se produce un estado de neurotoxicidad que conducirá a daño cerebral. Esta lesión podría derivar en alteraciones del sistema nervioso o enfermedades neurodegenerativas como es el caso del Alzheimer o la enfermedad de Parkinson entre otras (Kempuraj et al., 2017).

4. La creatina (Cr)

La creatina es un compuesto orgánico nitrogenado que está presente en el músculo esquelético en mayor parte, pero también en el cerebro, órgano de alta actividad metabólica (Roschel et al., 2021).

Los niveles de creatina corporal se mantienen mediante síntesis endógena o se obtienen de la dieta (Figura 4): El primer paso de la síntesis endógena de creatina se produce mayoritariamente en el riñón, donde la enzima glicina-amidino transferasa (AGAT) transfiere el grupo amino de una arginina a una glicina, dando lugar a guanidinoacetato (GAA) y L-ornitina. A continuación, la enzima N-guanidinoacetato metiltransferasa (GAMT) cataliza en el hígado la reacción de metilación de GAA, cuyo grupo metilo es cedido por S-adenosilmetionina. Esta reacción dará lugar a la creatina (Brosnan and Brosnan, 2016). Por otro lado, la mayor fuente de creatina en la dieta se encuentra en la carne roja y el pescado. La creatina que llegue en esta forma se absorberá en el

intestino mediante el cotransportador electrogénico de creatina dependiente de Na^+ y Cl^- (CrT1) (Wallimann et al., 2021).

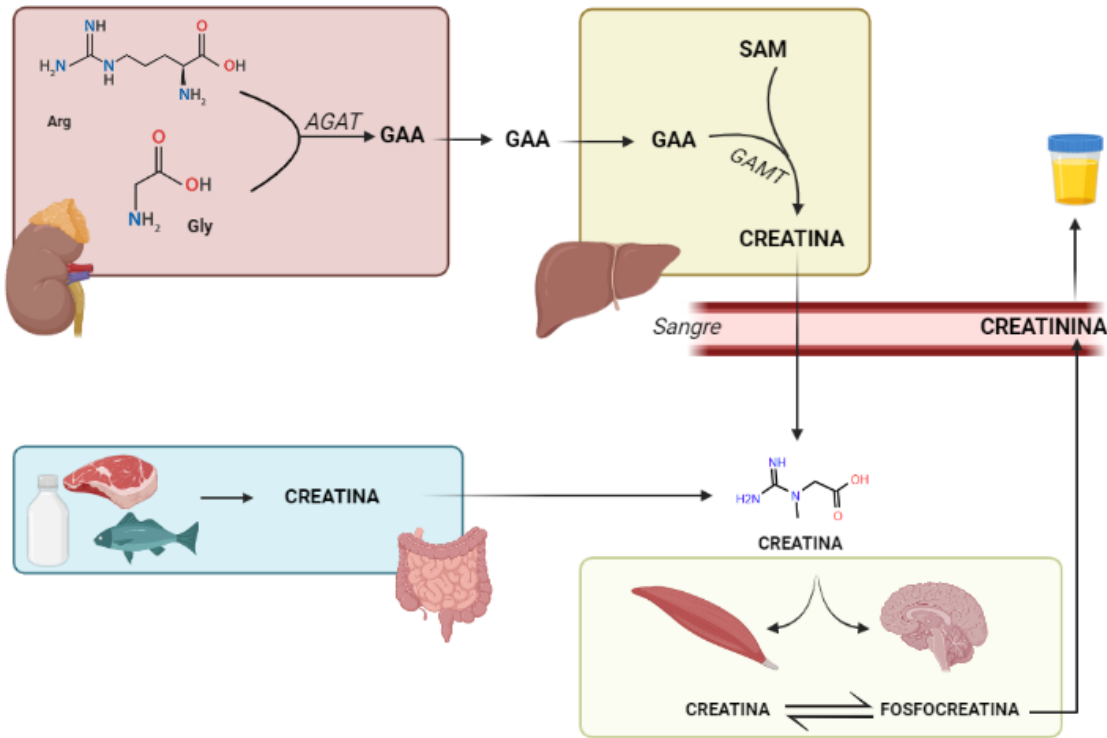


Figura 4. Esquema de la obtención de creatina por vía externa o síntesis endógena y metabolismo. Arg: Arginina / Gly: Glicina / AGAT: glicina-amidino transferasa / GAA: guanidinoacetato / GAMT: N-guanidinoacetato metiltransferasa / SAM: S-adenosilmetionina. Creado en BioRender.com.

La creatina de la dieta accede por vía sanguínea hasta el músculo esquelético y por vía barrera hematoencefálica hacia el cerebro. Esta es capaz de entrar en la célula gracias al Transportador Transmembrana de Creatina (CRCT) (Joncquel-Chevalier Curt et al., 2015). Los niveles de creatina en el músculo dependen únicamente de la dieta y de la síntesis endógena en otros órganos. Sin embargo, el sistema nervioso posee las enzimas necesarias para su síntesis y transporte, por lo que, además de mediante la dieta y la síntesis endógena en otros órganos, el cerebro podría sintetizarla por sí mismo (Roschel et al., 2021).

Una vez la creatina llega a sus lugares de almacenamiento, puede ser fosforilada por la creatina cinasa (CK) formando fosfocreatina de forma transitoria y reversible. Cuando existe una demanda energética elevada, la fosfocreatina va a ceder el grupo fosfato al ADP para regenerar ATP y este queda disponible directamente para su uso. La creatina y la fosfocreatina (**figura 5**) pueden sufrir una conversión no enzimática, dando creatinina. Este compuesto final difunde por la membrana celular y se eliminará por vía urinaria (**Joncquel-Chevalier Curt et al., 2015**).

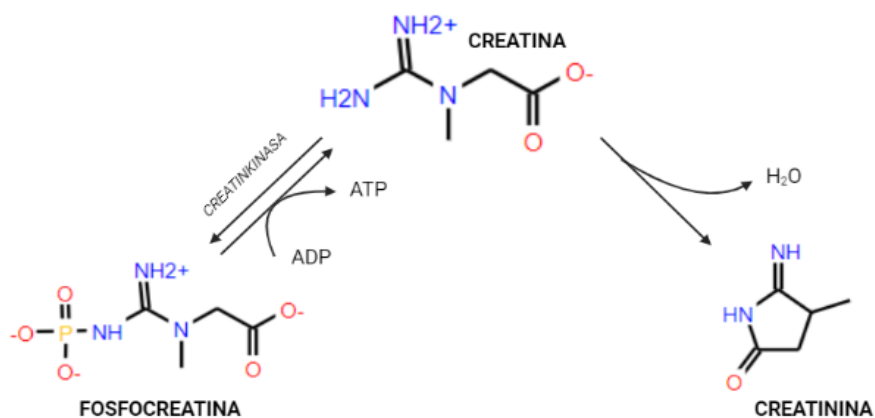


Figura 5. Conversiones de la creatina. Por una parte, se da la conversión enzimática a fosfocreatina gracias a la creatina cinasa. Mediante una conversión no enzimática con pérdida de una molécula de agua, se produce la creatinina, molécula que se eliminará vía renal.

Uno de los usos más frecuentes de la suplementación con creatina actualmente es en el deporte. La ingesta va a incrementar los niveles de creatina y fosfocreatina en el músculo. Esto hace que sea posible el aumento de la capacidad de realizar ejercicio intenso y mejora la adaptación en el entrenamiento además de ayudar a ganar masa muscular y fuerza (**Candow et al., 2008**).

A parte de los beneficiosos efectos que produce la creatina en el ámbito deportivo, podría usarse en forma de suplemento para múltiples patologías. Se había visto que la administración de creatina podría tener efectos neuroprotectores que supondrían una contribución a la prevención de múltiples enfermedades neurodegenerativas. Estudios realizados por **Beal (2011)**, **Wallimann and Harris (2016)** y **Roschel et al. (2021)** han

detectado una mejoría con el uso de creatina como suplemento en la enfermedad de Huntington, Parkinson o Alzheimer, entre otras. Cuando existe daño cerebral, una de las características es la alteración de la demanda de ATP, lo cual, podría considerar a la creatina una estrategia potencial para reducir la severidad o disminuir los síntomas de la enfermedad **(Roschel et al., 2021)**. La creatina va a facilitar una constante regeneración del ATP en el cerebro, mejorando así la capacidad cognitiva **(Marques and Wyse, 2019)**. Además, tiene un posible papel coadyuvante en terapias en enfermedades relacionadas con trastornos de la memoria, donde la creatina actúa potenciándola y atenuando la fatiga mental **(Kreider and Stout, 2021)**.

Otros beneficios que produce la creatina son frente a la inflamación. Algunos estudios en modelos animales **(Roy and Lee, 2016; Turer et al., 2017; Marques and Wyse, 2019 Wallimann et al., 2021)** han demostrado que la creatina tiene efectos en la respuesta inflamatoria. Esta molécula es capaz de inducir la reducción de citoquinas o marcadores proinflamatorios, como por ejemplo algunas interleuquinas como el TNF- α , ejerciendo un efecto antiinflamatorio. Incluso es posible que la suplementación con creatina reduzca la muerte celular y como consecuencia estos procesos inflamatorios.

Esto podría apoyar la teoría de su función neuroprotectora en enfermedades del SNC u otros casos, como sería la reducción de la inflamación en la mucosa del colon producida por colitis aguda **(Glover et al., 2013)**.

Aunque se esperen buenos resultados según los antecedentes, se necesitan más estudios de investigación. Quizás sobre todo en modelos animales ya que los ensayos, por ejemplo, en pacientes con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, son más complejos debido a que normalmente, estos no presentan síntomas de neurodegeneración hasta que ha perdido al menos un 70% de sus neuronas motoras alfa **(Kreider and Stout, 2021)**.

OBJETIVOS

Como se ha descrito anteriormente, un proceso inflamatorio intestinal puede producir un aumento de citoquinas en el SNC, originándose neuroinflamación. Debido a las propiedades de la creatina, podría utilizarse como complemento para mejorar o reducir estos procesos inflamatorios. Utilizando un modelo de colitis crónica en rata mediante la administración oral de DSS nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Describir la evolución de las manifestaciones clínicas de la inflamación intestinal producida por DSS.
- Evaluar el efecto de la colitis crónica en el hipocampo y la corteza prefrontal.
- Estudiar el efecto de la administración de creatina sobre el desarrollo de la colitis crónica y en los procesos inflamatorios producidos en el hipocampo y corteza prefrontal.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aparatos

Se emplearon los siguientes aparatos en todo el procedimiento:

- Baño termostático (Selecta, Precisdig).
- Cubeta de electroforesis para geles de agarosa (Sigma-Aldrich, SHU6).
- Espectrofotómetro (Thermo Fischer, NanoDrop 1000).
- Fuente de alimentación Power-Pac 200.
- Homogeneizador Politrón (Ystral, T-1500).
- Microcentrífuga (Eppendorf, 5415C).
- Termociclador para PCR en tiempo real (Bio-Rad, MJ MiniOpticon).

2. Animales de experimentación y material biológico

Para la realización de este trabajo se han utilizado ratas Wistar macho procedentes del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. Tenían aproximadamente 5 semanas y un peso inicial de 80-100 gramos. Todas las ratas se han mantenido en el Animalario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla en condiciones adecuadas de humedad y temperatura. Además, han tenido ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y libre acceso a pienso (Global Rodent Diet) y agua durante todo el día.

La anestesia y el sacrificio de las ratas se realizó mediante una inyección intraperitoneal de ketamina (50 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) de acuerdo con la Directiva Europea 2010/63/UE y al Real Decreto 53/2013 que trata sobre las normas éticas de experimentación con animales.

Tras el sacrificio, se extrae el cerebro y se disecciona el hipocampo y la corteza prefrontal. Se lavan con un poco de solución salina fisiológica fría. Las muestras se congelan en nitrógeno líquido inmediatamente y se conservan a - 80°C hasta su posterior uso para PCR.

3. Inducción de la inflamación mediante DSS

Para ello, se administró sulfato de dextrano sódico (DSS, MW 40 KDa; PanReac AppliChem) al 5% con el agua de bebida. Utilizando este compuesto sintético de alta solubilidad se reproduce el modelo animal en rata de colitis ulcerosa.

La evaluación de la inflamación se realiza mediante registros del peso corporal y valoración de las manifestaciones clínicas de la colitis para determinar el DAI.

Se registró el peso corporal. La ganancia se calculó teniendo como peso referencia el inicial de cada rata, siendo este el 100%. Además, se realizó un análisis diario de la consistencia de las heces y el sangrado rectal para evaluar el desarrollo de la enfermedad, asignándole valores de 0 a 3 (**Tabla 1**). Con la suma de estos tres valores, se obtuvo el índice de actividad de la enfermedad (DAI) que se va a utilizar para evaluar clínicamente la inflamación (**Wang et al., 2019**).

VALOR	% GANANCIA DE PESO	CONSISTENCIA DE LAS HECES	SANGRADO RECTAL
0	Mayor del 75%	Heces formales, normales.	No hay sangrado.
1	50 % - 75 %	Heces blandas pero que no quedan adheridas al ano.	Hay pequeñas manchas de sangre en las heces, pero la región anal está seca.
2	25 % - 50 %	Heces muy blandas que se adhieren al ano.	Las heces contienen grandes manchas de sangre. Además, aparece sangre en el orificio anal.
3	Menor del 25%	Heces líquidas y ano húmedo.	Las heces son de un rojo oscuro. La sangre se extiende por zonas alrededor del ano.

Tabla 1. Tabla para la valoración del DAI. Explica cada valor que puede asignarse a los síntomas provocados por el DSS.

4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

Se extrae el ARN total del hipocampo y la corteza prefrontal mediante el kit comercial “RNeasy® Mini” (Método Quiagen). Mediante espectrofotometría con absorbancia 260 nm y 280 nm y electroforesis en gel de agarosa al 1% se obtiene la pureza, concentración e integridad del ARN total. Este ARN se somete a una transcripción reversa. Para ello se utilizará 1 µg de ARN total y el kit comercial “QuantiTect® Reverse Transcription” (Método Quiagen), obteniendo así el ADN complementario (ADNc).

Para la amplificación se usó 1 µl de ADNc problema, 0,4 µM de cebadores específicos y 10 µl de la enzima SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad). Se van a utilizar en todos los casos blancos sin ADNc. El gen de referencia utilizado para normalizar los valores de ARNm en las muestras fue la β-actina.

Utilizando el programa informático PerlPrimer v1.1.14 (Parkville, Vic., Australia) y de acuerdo con la secuencia de ADNc disponible en la base de datos Genbank, se diseñaron los cebadores resumidos en la **tabla 2**.

Gen	Sentido (5' ... 3')	Antisentido (5'... 3')
IL-6	ACAAGTCGGAGGCTTAATTACA	GAAAAGAGTTGTGCAATGGCAA
IL-1β	CTTTCGACAGTGAGGAGAATGAC	CCACAGCCACAATGAGTGAC
TNF- α	CTCACACTCAGATCATCTTCTC	TGGTATGAAATGGCAAATCGG
iNOS	GATGTTGAACTACGTCCTATCTCC	GTCTTGGTGAAAGCGGTGTTC
β-actina	ACCCACACTGTGCCCATCTA-	CGGAACCGCTCATTGCC

Tabla 2. Cebadores específicos para PCR en tiempo real. El gen de β-actina se utiliza como gen de referencia.

La amplificación realizada en el termociclador MiniOpticon™ (Bio-Rad) va a seguir el siguiente protocolo:

- 3 minutos a 95°C para desnaturalizar el ADN
- 35 ciclos de 40 segundos a 95°C
- 40 segundos a 58°C

- 40 segundos a 72°C
- 3 minutos a 72°C (etapa de elongación).

Tras esto, se procede al análisis de curvas de disociación. Se calentó la muestra desde los 65°C hasta los 95°C en intervalos de 1°C y se monitorizó la fluorescencia. Esta curva representa la temperatura de separación de las cadenas de ADN o temperatura de fusión frente a la fluorescencia emitida por el producto de PCR. Cada fragmento de ADN amplificado tiene una temperatura de fusión específica. Si solo se obtiene un pico durante este ensayo, corresponde con un único producto de PCR.

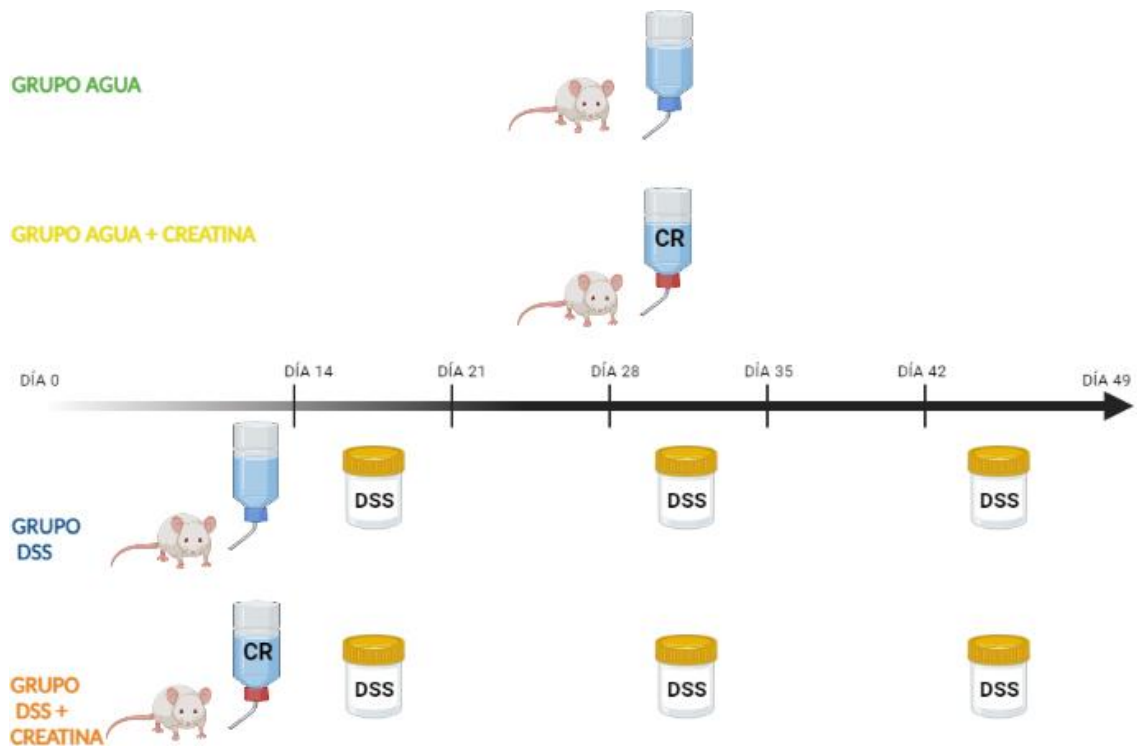
La PCR se hace por triplicado para cada ADNc. Se determinó para cada muestra el número de ciclos necesarios para alcanzar el nivel de fluorescencia umbral (Ct). Los resultados se analizan usando el método comparativo de Ct en una hoja de cálculo (*Gene Expression Macro*) proporcionada por BioRad.

5. Diseño experimental

Las ratas fueron separadas en cuatro grupos (**figura 6**) de forma aleatoria:

- *Grupo agua*, donde solo se administra agua.
- *Grupo agua + creatina*. A este grupo se le administra a diario una cantidad de 0,5 g de creatina por cada kilogramo de peso. Esto se calcula según el peso de las ratas y el volumen bebido por estas.
- *Grupo DSS*. Este recibirá tratamiento con DSS al 5% en agua. El día 14 empiezan con el tratamiento y se completan tres ciclos intercalándolos con una semana de descanso.
- *Grupo DSS + creatina*. Este recibirá tratamiento con DSS al 5% en agua. El día 14 empiezan a tomar el tratamiento y se completan tres ciclos intercalándolos con una semana de descanso a la vez que ingiere creatina a dosis de 0,5 g/kg/día durante todo el periodo.

La ingesta de agua fue controlada a diario para realizar el cálculo exacto de la dosis de creatina y DSS.



H ₂ O					
Creatina					
H ₂ O	DSS	H ₂ O	DSS	H ₂ O	DSS
Cr	DSS + Cr	Cr	DSS + Cr	Cr	DSS + Cr

Figura 6. Procedimiento del ensayo. Imagen creada en BioRender.com.

6. Presentación de los resultados y análisis estadístico

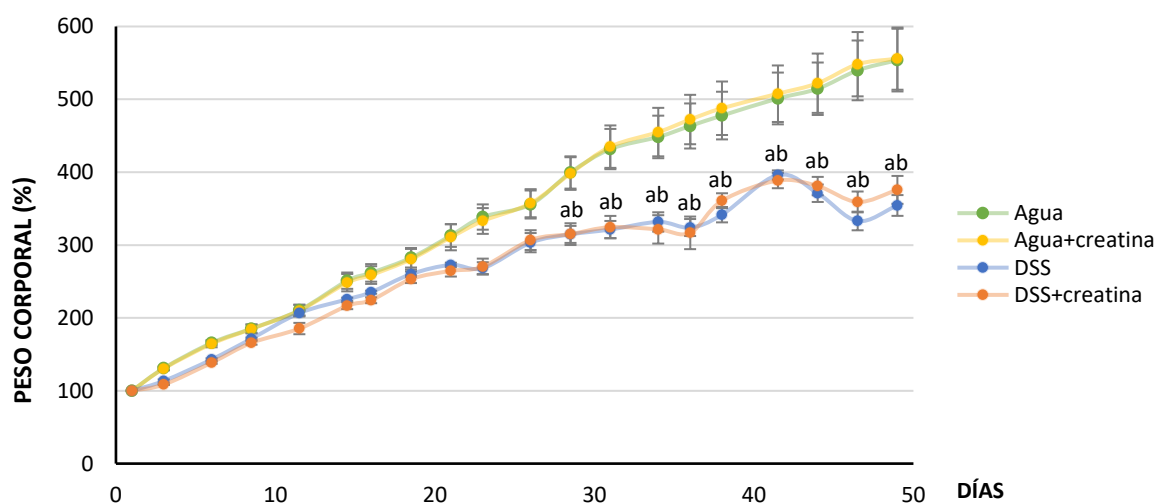
Los resultados fueron presentados como la media, acompañada de su error estándar. La comparación estadística entre los diferentes grupos experimentales fue realizada mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y el test de Tukey ($p < 0.05$). Para el análisis estadístico se ha utilizado el programa informático GraphPad Prism 8.4.2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para llevar a cabo los objetivos planteados, se ha valorado: 1º - la evolución de la colitis ulcerosa inducida por el tratamiento con DSS al 5% en ratas ; 2º - el efecto de la creatina sobre el desarrollo de la colitis ulcerosa inducida por la administración de DSS ; 3º - el efecto de la inflamación del colon sobre la expresión de IL-6, TNF- α , IL-1 β y iNOS en hipocampo y corteza prefrontal y 4º - el efecto neuroprotector de la creatina frente a la neuroinflamación provocada por la inflamación intestinal.

1. Efecto de la creatina sobre el peso en el desarrollo de la colitis crónica

La evolución de la colitis crónica se analizó mediante un registro de síntomas característicos de la inflamación y con el cálculo del índice de actividad de la enfermedad (DAI). Este índice incluye la evaluación de la ganancia de peso corporal junto con la consistencia de las heces y el sangrado rectal. A continuación, primero se representan los pesos relativos en la siguiente gráfica (**figura 7**), que indican la ganancia de peso a lo largo de todo el periodo de suplementación con creatina y/o tratamiento con DSS.



H ₂ O					
Creatina					
H ₂ O	DSS	H ₂ O	DSS	H ₂ O	DSS
Cr	DSS + Cr	Cr	DSS + Cr	Cr	DSS + Cr

Figura 7. Evolución del peso corporal de cada grupo experimental. Los datos se expresan como ganancia de peso en % del peso corporal inicial (100%) de cada rata. Media \pm EEM (n=6). El

ANOVA reveló un efecto del DSS sobre la ganancia de peso ($p < 0,001$). Test de Tukey: $p < 0,05$, *a vs agua, b vs. agua+Creatina*.

Según la **figura 7**, en las ratas sin tratamiento de DSS, se observa que la suplementación con creatina no ha afectado a la ganancia de peso de las ratas. Comparando el *grupo agua*, al cual solo se le suministra agua, frente al grupo con suplementación con creatina, se ve que ambos han ido aumentando su peso de forma constante hasta casi seis veces su peso inicial (aproximadamente el 550%). Solo se podría destacar una ligera diferencia en la última semana del tratamiento, donde se aprecia que el *grupo agua+creatina* está muy levemente por encima del *grupo agua*, aunque de forma no significativa. Hay algunos estudios donde la suplementación con creatina a corto plazo produce un aumento extra de peso (**Ferrante et al., 2000; Roy and Lee, 2016**). No obstante, y de acuerdo con nuestros resultados, **Wallimann and Harris (2016)**, no observan ninguna variación en el peso corporal.

La primera semana, los cuatro grupos tienen un aumento prácticamente similar. A partir del día catorce (cuando se comienza a tratar con DSS), empiezan a variar, haciéndose notable la diferencia entre los grupos control (*agua y agua+creatina*) y los dos grupos tratados con DSS. Si el aumento de peso en los *grupos agua y agua+creatina* es alrededor del 550%, en los animales tratados con DSS solo llegará al 400% como pico máximo. Esto se debe a que las ratas tratadas con DSS no ganan peso al nivel de los grupos control debido a la colitis inducida. Además de que no existe tal ganancia normal de peso, se puede observar una leve pérdida tras dos ciclos de tratamiento con DSS.

Según describe **Zaremba and Smoleński (1999)**, la menor ratio de ganancia de peso se observa después del inicio de los síntomas. Cuando los síntomas desaparecen, el ritmo de ganancia de peso será algo mayor, pero seguirán siendo más bajo que el de los grupos control.

En el caso de los grupos de animales tratados con DSS, se observa una evolución del peso similar en ambos, siendo esta siempre inferior a los grupos control. Sin embargo, la última semana (cuando la enfermedad ya se hace crónica) se aprecia una leve diferencia en el peso, donde el *grupo DSS+creatina* se encuentra ligeramente por encima

del grupo DSS, aunque estos datos no fueron significativos. En modelos de colitis aguda se ha visto que la suplementación con creatina disminuye la pérdida de peso (Glover et al., 2013; Turer et al., 2017).

En relación con el DAI, se obtienen los siguientes datos, donde se puede apreciar el desarrollo de la patología intestinal inducida (figura 8).

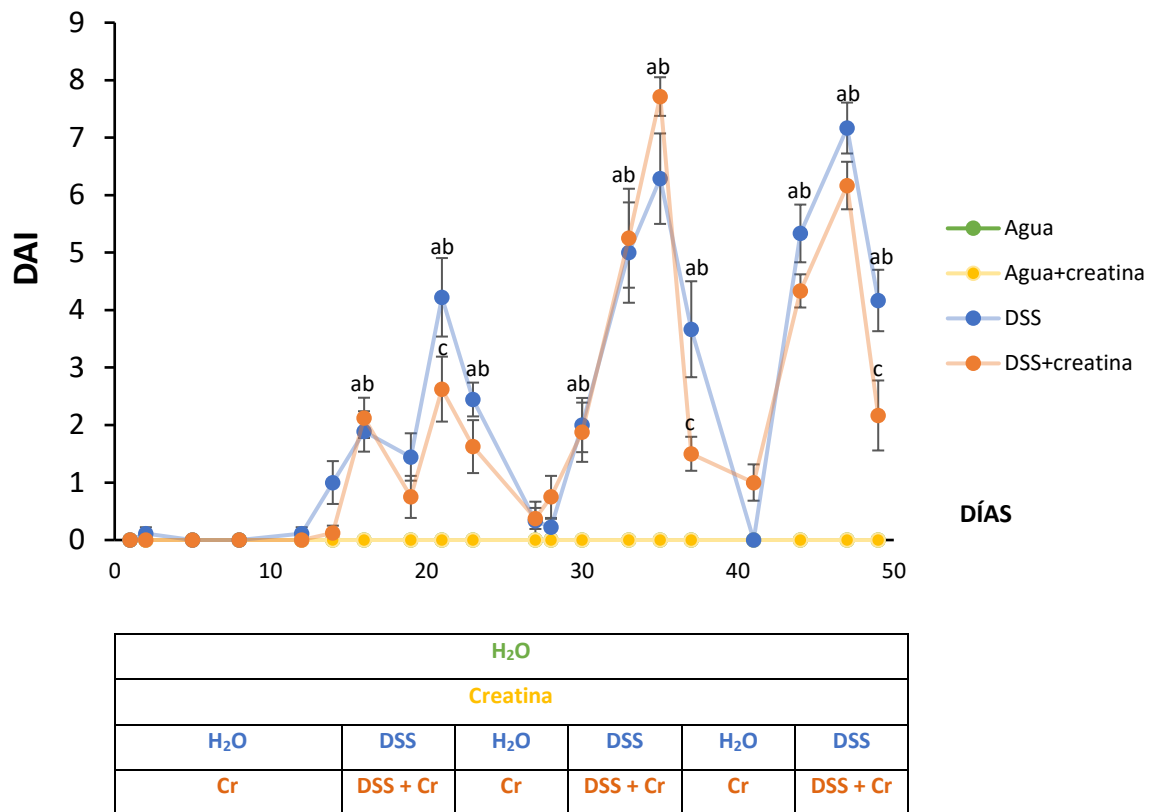


Figura 8. Índice de Actividad de la Enfermedad durante el procedimiento. Media ± EEM (n=6). El ANOVA reveló un efecto del DSS y de la creatina en relación con la sintomatología (p<0,001). Test de Tukey: p< 0,05, a vs agua, b vs. agua+Creatina, c vs. DSS.

Se diferencian claramente tres picos donde se observa un aumento de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Esto sucede durante los tres ciclos de tratamiento con DSS, más concretamente, alcanzando máximos en los días 21, 35 y 47 del tratamiento. Si comparamos la figura 7 con la figura 8, se aprecia que los puntos donde existe pérdida de peso coinciden con aquellos días en los que se alcanza un pico máximo de sintomatología de cada ciclo. El segundo pico que corresponde al segundo

ciclo de tratamiento es el que alcanza mayor valor, lo que indica que se produjeron síntomas más severos.

Tras el primer ciclo, se van a recuperar rápidamente, volviendo a un DAI = 0 en dos días. Sin embargo, después de los siguientes ciclos, la recuperación fue bastante más lenta.

Durante la mayoría del periodo de tiempo que dura el ensayo, las ratas suplementadas con creatina (*grupo DSS+Creatina*) van a tener un DAI o una manifestación de la sintomatología menor que las no suplementadas (*grupo DSS*), siendo la diferencia significativa en los días 21, 35 y 47. Por tanto, se podría razonar que la suplementación con creatina disminuyó la severidad de los síntomas de la colitis crónica inducida con DSS.

La atenuación de los síntomas debida a la suplementación con creatina es descrita por **Roy and Lee (2016)** en un caso clínico, y en **Wallimann et al. (2021)** donde muestran que además, disminuye el dolor abdominal y la inflamación en el colon.

2. Efecto de la creatina sobre la neuroinflamación en hipocampo y corteza prefrontal

Para evaluar el efecto de la creatina sobre el SNC, se realiza un análisis de PCR a tiempo real para medir la expresión relativa de las citoquinas IL-6, IL-1 β , TNF- α y el marcador inflamatorio iNOS en hipocampo y corteza prefrontal.

En la medida de expresión de la IL-6 en el hipocampo (**figura 9**) no se observan diferencias significativas entre los grupos. Es decir, no hay diferencias entre grupos control y DSS, ni la creatina ha producido ningún efecto frente a la neuroinflamación.

Sin embargo, en la corteza prefrontal, sí se aprecian diferencias en la expresión de esta citoquina. En el *grupo DSS* la expresión de IL-6 es aproximadamente el doble que la expresión en el *grupo agua* y el *grupo agua+creatina*. Tampoco se observa un efecto de la creatina.

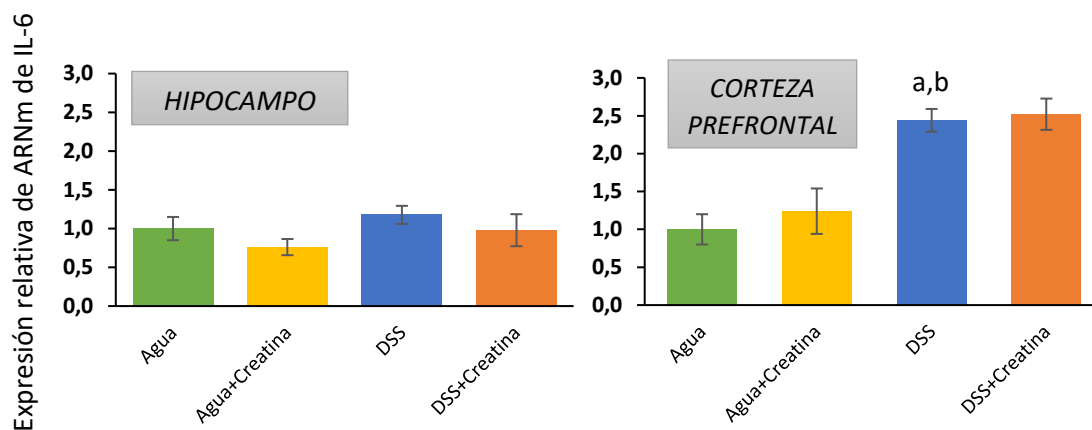


Figura 9. Expresión relativa de ARNm de la citoquina proinflamatoria IL-6 en el hipocampo y corteza prefrontal. Media \pm EMM ($n=6$). El ANOVA reveló un efecto del DSS sobre la abundancia relativa del ARNm de la IL-6 en la corteza prefrontal ($p<0,001$). Test de Tukey: $p<0,05$, a vs agua, b vs. agua+Creatina, c vs. DSS.

Al analizar el gen para la citoquina TNF- α en el hipocampo (**figura 10**), se detectan diferencias significativas. Se observa un aumento en la expresión de esta citoquina en el grupo DSS, indicativo de un proceso inflamatorio, que no se da en el caso de los grupos controles (*agua* y *agua+creatina*). También se podría sugerir que la creatina ha prevenido la neuroinflamación derivada de la colitis inducida por DSS, ya que los niveles de expresión relativa en el *grupo DSS+creatina* son significativamente inferiores al *grupo DSS*. Además, a pesar de que el *grupo DSS+creatina* está levemente por encima los niveles de expresión respecto a los grupos en los que no se ha inducido la colitis, no existen diferencias significativas.

En cambio, en la expresión relativa de TNF- α para la corteza prefrontal no hay ninguna diferencia significativa respecto a ninguno de los grupos.

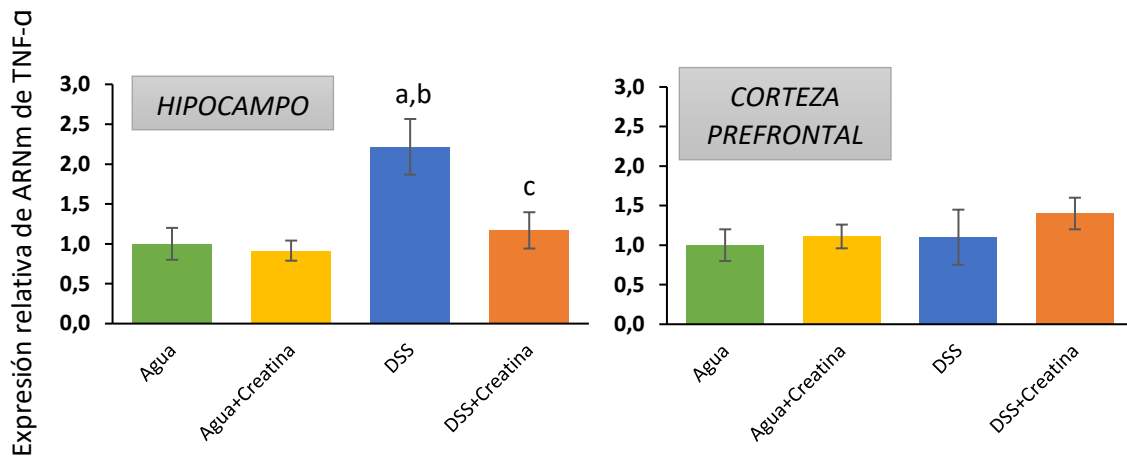


Figura 10. Expresión relativa de ARNm de la citoquina proinflamatoria TNF- α en el hipocampo y corteza prefrontal. Media \pm EMM (n=6). El ANOVA reveló un efecto del DSS y de la creatina sobre la abundancia relativa del ARNm de TNF- α en el hipocampo ($p < 0,001$). Test de Tukey: $p < 0,05$, a vs agua, b vs. agua+Creatina, c vs. DSS.

Por otro lado, en el análisis de IL-1 β en hipocampo, se van a detectar diferencias significativas entre varios grupos (**Figura 11**). En el grupo DSS se observa una expresión relativa mayor que en el resto de los grupos. La expresión en el grupo DSS+creatina es similar a los grupos controles indicando un efecto neuroprotector por parte de la creatina.

Respecto a la expresión de IL-1 β en la corteza prefrontal, no se aprecian diferencias significativas entre los grupos experimentales.

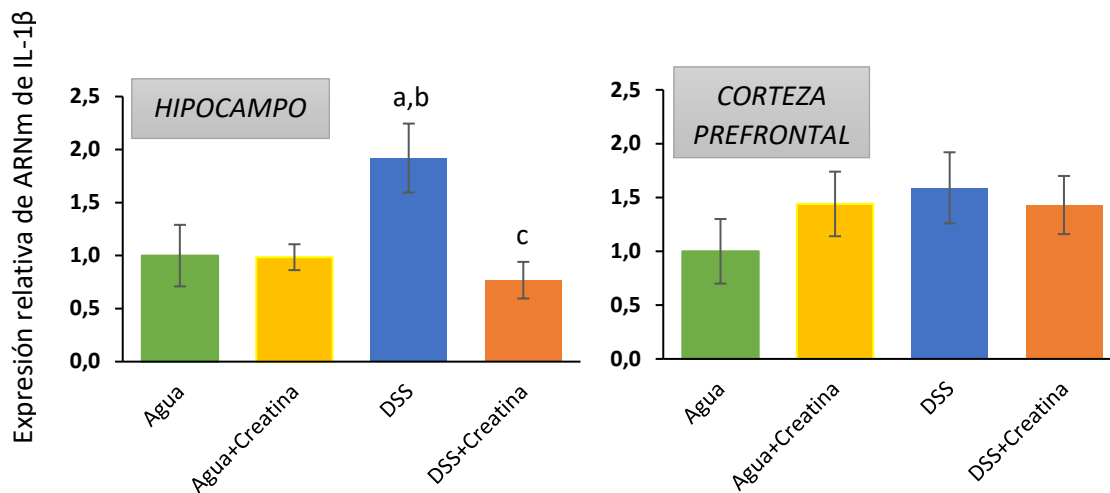


Figura 11. Expresión relativa de ARNm de la citoquina proinflamatoria IL1- β en el hipocampo y corteza prefrontal. Media \pm EMM ($n=6$). El ANOVA reveló un efecto del DSS y de la creatina sobre la abundancia relativa de IL1- β en el hipocampo ($p<0,001$). Test de Tukey: $p<0,05$, a vs agua, b vs. agua+Creatina, c vs. DSS.

Por último, se midió la expresión del marcador inflamatorio y de estrés oxidativo iNOS (**Figura 12**). Como se muestra en la gráfica, la expresión de iNOS en hipocampo y corteza prefrontal en el *grupo DSS* es significativamente superior al resto de grupos.

Además, en el hipocampo, la expresión relativa en el caso de las ratas del *grupo DSS+creatina* es menor que en el *grupo DSS* y semejante a los grupos control, e incluso, levemente inferior (aunque no es significativo). Esto supondría una protección por parte de la creatina sobre la inflamación, bajando la expresión a los niveles normales.

Sin embargo, a nivel de corteza prefrontal no existe esa diferencia. Solo hay una tendencia a disminuir la expresión de iNOS y, por tanto, no permite afirmar que la creatina sea neuroprotectora en esta zona del cerebro.

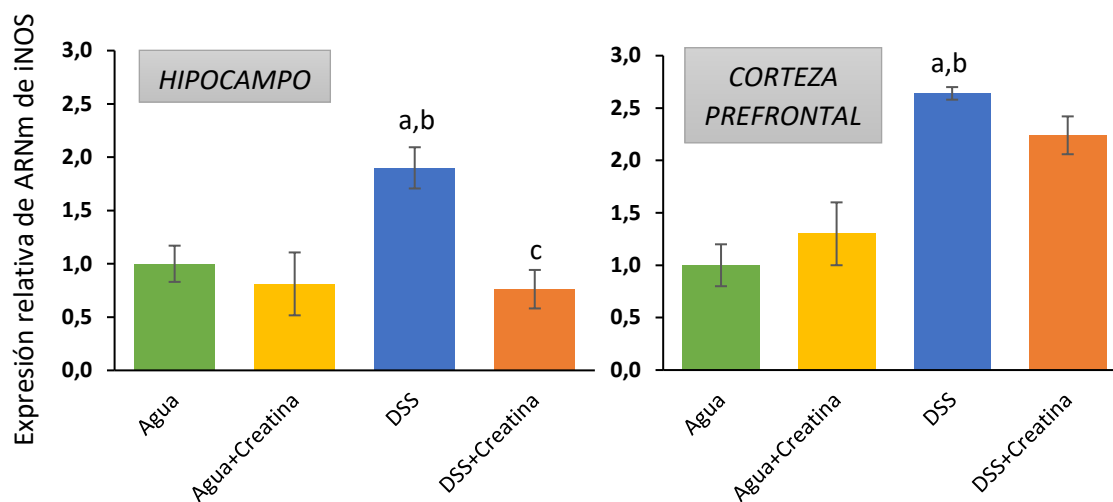


Figura 12. Expresión relativa de ARNm del marcador inflamatorio y de estrés oxidativo iNOS en hipocampo y corteza prefrontal. Media \pm EMM (n=6). El ANOVA reveló un efecto del DSS y de la creatina sobre la abundancia relativa de iNOS en hipocampo y del DSS en la corteza prefrontal ($p < 0,001$). Test de Tukey: $p < 0,05$, a vs agua, b vs. agua+Creatina, c vs. DSS.

En modelos experimentales de colitis se muestra que aumenta la expresión en el colon de mediadores de la inflamación como la IL-6, TNF- α o la IL-1 β (Eichele and Kharbanda, 2017; Han et al., 2018; Lertnimitphun et al., 2019) y según lo expuesto anteriormente en la Introducción, mediante el eje intestino-cerebro, la inflamación llegaría al cerebro, produciendo neuroinflamación.

Zonis et al. (2015) observan que la colitis crónica inducida con DSS produce un aumento de la IL-6 en hipocampo. En contraste con nuestro ensayo, no se observa aumento de esta citoquina en esa zona del cerebro, pero sí, en cambio, en la corteza prefrontal. Según Han et al. (2018) y de acuerdo con nuestros resultados, aunque en un modelo de colitis aguda, describen un aumento de los niveles de IL-6 en la corteza cerebral sin indicar que región fue la estudiada. Estos autores también observan que el aumento de los factores proinflamatorios da lugar a la activación de la microglía lo que podría causar daños neuronales. Además, también muestran un aumento en los niveles de expresión de TNF- α . Sin embargo, en nuestro caso, esta citoquina solo se verá aumentada significativamente en el hipocampo. Riazi et al. (2008) y Zonis et al. (2015) también han detectado un aumento similar de TNF- α en el hipocampo.

En relación a la IL-1 β , solo se han apreciado diferencias en el hipotálamo, similares a los estudios realizados por **Abautret-Daly et al. (2017)** y **Zonis et al. (2015)**.

El aumento de estos tres marcadores proinflamatorios podría producir la activación de la microglía y afectar, por tanto, negativamente a la neurogénesis, dando lugar a enfermedades neurodegenerativas (**Kempuraj et al., 2017**) y otros desórdenes neurológicos (**Maqsood and Stone, 2016**).

Por último, de acuerdo con los resultados obtenidos, y tal como indica **Mei et al. (2019)**, en la colitis inducida por DSS, se observa un aumento de la expresión de iNOS en colon. Asimismo, algunos autores han visto que el aumento de iNOS en el colon puede a su vez inducir la producción de este mediador inflamatorio en el hipotálamo (**Abautret-Daly et al., 2017; Lertnimitphun et al., 2019**). La expresión de iNOS se ha visto aumentada, debido a la colitis, en ambas regiones del cerebro estudiadas en este trabajo.

En relación a la suplementación con creatina y en línea con nuestros resultados, algunos autores han observado que la creatina disminuye la severidad de las enfermedad inflamatoria intestinal, al atenuar los síntomas y la inflamación en el colon (**Roy and Lee, 2016; Wallimann et al., 2021**) Otros autores observaron efectos beneficiosos de la creatina a nivel neuronal (**Beal, 2011; Ferrante et al., 2000; Kreider and Stout, 2021; Marques and Wyse, 2019; Roschel et al., 2021**).

En nuestro estudio, los resultados muestran que el efecto de la creatina presenta diferencias significativas en la expresión de marcadores inflamatorios en el hipocampo, en concreto para la TNF- α , la IL-1 β y la iNOS. **Kreider and Stout (2021)**, en otros modelos de inflamación, explican el efecto neuroprotector de la creatina debido a la disminución de la IL-6, que no fue significativa en nuestro caso, pero que también podría ser debido a la disminución de TNF- α , que si se da en nuestro caso. De igual forma, **Marques and Wyse (2019)** revisan el efecto antiinflamatorio de la creatina observado en varios tejidos y modelos y concluyen que la creatina, podría proteger al cerebro al disminuir la expresión de la TNF- α y de la IL-1 β .

CONCLUSIÓN

Las conclusiones que se obtienen en este trabajo son:

1º. La colitis crónica inducida por DSS se manifestó con pérdida de peso, sangrado rectal y heces blandas.

2º. La inflamación producida por la colitis, va a derivar en neuroinflamación. Este efecto podría producirse a través del eje intestino-cerebro.

3º. La suplementación con creatina atenúa las manifestaciones clínicas de la colitis, reduciendo los síntomas y la intensidad de la patología.

4ª. La suplementación con creatina reduce la inflamación a nivel del sistema nervioso central, disminuyendo la expresión de citoquinas y marcadores proinflamatorios principalmente en el hipocampo.

5ª. La suplementación con creatina, utilizada como coadyuvante, podría servir como neuroprotector, frente a enfermedades neurodegenerativas derivadas de la neuroinflamación.

BIBLIOGRAFÍA

Abautret-Daly A, Dempsey E, Medina C, Harkin A, Medina Carlos, Harkin Andrew. Gut – brain actions underlying comorbid anxiety and depression associated with inflammatory bowel disease. Cambridge Univ Press 2017;30:275–96. <https://doi.org/10.1017/neu.2017.3>.

Beal MF. Neuroprotective effects of creatine. Amino Acids 2011;40:1305–13. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0851-0>.

Brosnan ME, Brosnan JT. The role of dietary creatine. Amino Acids 2016;48:1785–91. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2188-1>.

Candow DG, Little JP, Chilibeck PD, Abeysekara S, Zello GA, Kazachkov M, et al. Low-dose creatine combined with protein during resistance training in older men. Med Sci Sports Exerc 2008;40:1645–52. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318176b310>.

Chen, J., Winston, J. H., Fu, Y., Guptarak, J., Jensen, K. L., Shi, X. Z., Green, T. A., & Sarna, S. K. (2015). Genesis of anxiety, depression, and ongoing abdominal discomfort in ulcerative colitis-like colon inflammation. American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 308(1), R18–R27. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00298.2014>

Do J, Woo J. From Gut to Brain : Alteration in Inflammation Markers in the Brain of Dextran Sodium Sulfate-induced Colitis Model Mice. Clin Psychopharmacol Neurosci 2018;16:422–33.

Duelo A. (29 de junio de 2021). Enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y déficit de DAO. *Adriana Duelo Dietistas*. <https://www.adrianaduelo.com/enfermedad-de-crohn-colitis-ulcerosa-y-deficit-de-dao/>

Eichele DD, Kharbanda KK. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. World J Gastroenterol 2017;23:6016–29. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i33.6016>.

Ferrante RJ, Andreassen OA, Jenkins BG, Dedeoglu A, Kuemmerle S, Kubilus JK, et al.

Neuroprotective effects of creatine in a transgenic Mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 2000;20:4389–97. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-12-04389.2000>.

Glover LE, Bowers BE, Saeedi B, Ehrentraut SF, Campbell EL. Control of creatine metabolism by HIF is an endogenous mechanism of barrier regulation in colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302840110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1302840110>.

Han Y, Zhao T, Cheng X, Zhao M, Gong SH, Zhao YQ, et al. Cortical Inflammation is Increased in a DSS-Induced Colitis Mouse Model. *Neurosci Bull* 2018;34:1058–66. <https://doi.org/10.1007/s12264-018-0288-5>.

Hassan, A. M., Jain, P., Reichmann, F., Mayerhofer, R., Farzi, A., Schuligoi, R., & Holzer, P. Repeated predictable stress causes resilience against colitis-induced behavioral changes in mice. *Front. Behav. Neurosci.* 2014; 8: 386.

Joncquel-Chevalier Curt M, Voicu PM, Fontaine M, Dessein AF, Porchet N, Mention-Mulliez K, et al. Creatine biosynthesis and transport in health and disease. *Biochimie* 2015;119:146–65. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.10.022>.

Kempuraj D, Thangavel R, Selvakumar GP, Hayley S. Brain and Peripheral Atypical Inflammatory Mediators Potentiate Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 2017;11:1–16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00216>.

Kreider RB, Stout JR. Creatine in health and disease. *Nutrients* 2021;13:1–28. <https://doi.org/10.3390/nu13020447>.

Lernimitphun P, Jiang Y, Kim N, Fu W, Zheng C, Tan H, et al. Safranal alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis and suppresses macrophage-mediated inflammation. *Front Pharmacol* 2019;10:1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01281>.

Maqsood R, Stone TW. The Gut-Brain Axis , BDNF , NMDA and CNS Disorders. *Neurochem Res* 2016;41:2819–35. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2039-1>.

Marques EP, Wyse ATS. Creatine as a Neuroprotector: an Actor that Can Play Many Parts. *Neurotox Res* 2019;36:411–23. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00053-7>.

Matisz, C. E., Vicentini, F. A., Hirota, S. A., Sharkey, K. A., & Gruber, A. J. Behavioral adaptations in a relapsing mouse model of colitis. *Physiol. Behav.* 2020; 216: 112802.

Mei Y, Fang C, Ding S, Liu X, Hu J, Xu J, et al. PAP-1 ameliorates DSS-induced colitis with involvement of NLRP3 inflammasome pathway. *Int Immunopharmacol* 2019;75:105776. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105776>.

Nyuyki, K. D., Cluny, N. L., Swain, M. G., Sharkey, K. A., & Pittman, Q. J. (2018). Altered brain excitability and increased anxiety in mice with experimental colitis: Consideration of hyperalgesia and sex differences. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12(April), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00058>.

Ramos GP, Papadakis KA. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. *Mayo Clin Proc* 2018;176:139–48. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.09.013.Mechanisms>.

Riazi K, Galic MA, Kuzmiski JB, Ho W, Sharkey KA, Pittman QJ. Microglial activation and TNF α production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:17151–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806682105>.

Roschel H, Gualano B, Ostojic SM, Rawson ES. Creatine supplementation and brain health. *Nutrients* 2021;13:1–10. <https://doi.org/10.3390/nu13020586>.

Roy A, Lee D. Dietary Creatine as a Possible Novel Treatment for Crohn's Ileitis. *ACG Case Reports J* 2016;3:173. <https://doi.org/10.14309/crj.2016.146>.

Salvo-Romero E, Alonso-Cotoner C, Pardo-Camacho C, Casado-Bedmar M, Vicario M. Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas. *Rev Esp Enfermedades Dig* 2015;107:686–96.

Turer E, McAlpine W, Wang KW, Lu T, Li X, Tang M, et al. Creatine maintains intestinal homeostasis and protects against colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:1273–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621400114>.

Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel J-F. Ulcerative colitis. *Mayo Clin Proc* 2018;176:139–48. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32126-2.Ulcerative](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32126-2.Ulcerative).

Vavricka SR, Rogler G, Gantenbein C, Spoerri M, Vavricka MP, Navarini AA, et al. Chronological Order of Appearance of Extraintestinal Manifestations Relative to the Time of IBD Diagnosis in the Swiss Inflammatory Bowel Disease Cohort. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21:1794–800. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000429>.

Wallimann T, Hall CHT, Colgan SP, Glover LE. Creatine supplementation for patients with inflammatory bowel diseases: A scientific rationale for a clinical trial. *Nutrients* 2021;13:1–14. <https://doi.org/10.3390/nu13051429>.

Wallimann T, Harris R. Creatine: a miserable life without it. *Amino Acids* 2016;48:1739–50. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2297-x>.

Wang J, Zhang C, Guo C, Li X. Chitosan Ameliorates DSS-Induced Ulcerative Colitis Mice by Enhancing Intestinal Barrier Function and Improving Microflora. *Int J Mol Sci* 2019;20:1–12.

Zaremba LS, Smoleński WH. Dextran sulfate sodium (DSS): colitis in rats. *Dig Dis Sci* 1999;44:1458–75. <https://doi.org/10.1023/A>.

Zonis S, Pechnick RN, Ljubimov VA, Mahgerefteh M, Wawrowsky K, Michelsen KS, et al. Chronic intestinal inflammation alters hippocampal neurogenesis. *J Neuroinflammation* 2015;12:1–12. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0281-0>.