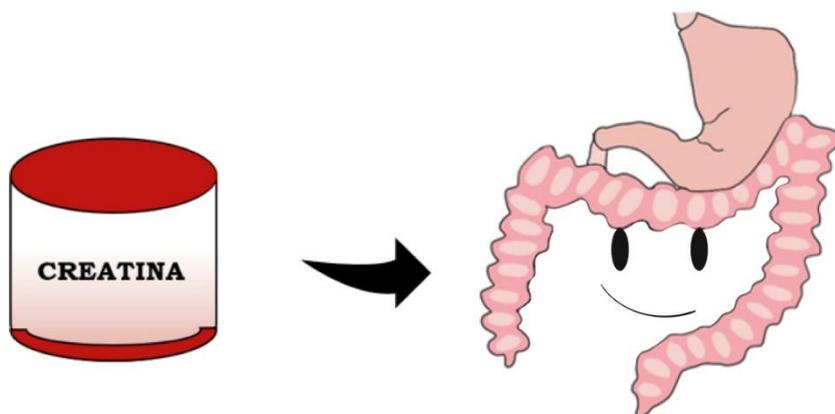




EFFECTO DE LA CREATINA SOBRE LA INFLAMACIÓN INTESTINAL

María Blanca Lucena Leiva



GRADO EN FARMACIA – TRABAJO FIN DE GRADO

Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

UNIVERSIDAD DE SEVILLA - FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO – GRADO EN FARMACIA



EFFECTO DE LA CREATINA SOBRE LA INFLAMACIÓN INTESTINAL

María Blanca Lucena Leiva

TUTORA: María José Peral Rubio

COTUTORA: María Dolores Vázquez Carretero

Departamento de Fisiología

TFG EXPERIMENTAL

Julio, 2021

Índice

INTRODUCCIÓN	1
Morfología del colon	1
Barrera intestinal.....	1
Colitis ulcerosa	3
Homeostasis de la creatina	5
- Sistema creatina/fosfocreatina/creatina kinasa	6
- Biosíntesis y transporte de creatina.....	6
Suplementación con creatina.....	8
OBJETIVOS	11
METODOLOGÍA.....	11
▪ DISPOSITIVOS	11
▪ REACTIVOS.....	11
▪ ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MATERIAL BIOLÓGICO	12
▪ DISEÑO EXPERIMENTAL	12
▪ EVALUACIÓN DE LA INFLAMACIÓN.....	13
○ Peso corporal e Índice de actividad de la enfermedad (DAI).....	13
○ Análisis macroscópico	14
○ Análisis histológico	14
▪ REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL	16
▪ PRESENTACION DE LOS RESULTADOS Y MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
1. Efecto de la suplementación de creatina en ratas sin tratar y tratadas con DSS, sobre el peso corporal y el DAI (Índice de Actividad de la Enfermedad).....	17
2. Efecto de la suplementación con creatina sobre la longitud y el daño histológico del colon inducido por DSS.	20
3. Efecto de la suplementación de creatina sobre la abundancia del ARNm de IL-6, TNF- α e IL-1 β en el colon.	23
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27

RESUMEN

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una patología que cursa con una inflamación crónica del aparato digestivo presentando deposiciones frecuentes y líquidas, dolor abdominal, urgencia defecatoria y tenesmo, además de otras manifestaciones dependiendo de la gravedad de la enfermedad. Dentro de la EII están englobadas dos patologías: la Enfermedad de Crohn y la Colitis Ulcerosa. El objetivo del presente trabajo es evaluar la inflamación en un modelo de colitis crónica y determinar si una suplementación con creatina, un compuesto orgánico que puede ser producido de forma endógena u obtenerse con la dieta, puede reducir las manifestaciones que se presentan en esta patología o servir de protectora en el desarrollo de la enfermedad. Para realizar dicho estudio se ha empleado un modelo experimental de colitis crónica en ratas, inducida con DSS (Dextrano Sulfato Sódico), que ha demostrado que está relacionada con la enfermedad inflamatoria intestinal humana, y además, en algunos grupos experimentales se ha empleado creatina como suplemento para comprobar el efecto protector de la misma. A lo largo del tratamiento se han observado manifestaciones tanto clínicas como histológicas en los grupos tratados con DSS y se ha comprobado que la suplementación con creatina ejerce cierto papel protector en el desarrollo de la enfermedad, ya que atenúa las manifestaciones clínicas observándose una reducción del DAI y una menor expresión de las citoquinas proinflamatorias medidas, e histológicas reduciendo la respuesta inflamatoria y, por tanto, la gravedad de la enfermedad. Este estudio y otras investigaciones pueden servir para que en un futuro se pueda incluir la creatina, junto con medicamentos ya desarrollados como coadyuvante.

Palabras clave: inflamación intestinal, colitis ulcerosa, creatina

INTRODUCCIÓN

Morfología del colon

El intestino grueso constituye la última parte del aparato digestivo. Este se encuentra formado por el ciego, el colon y el recto. El colon es la última parte del intestino donde se reabsorben agua y electrolitos ayudando a mantener la homeostasis. Este, a su vez, se puede dividir en cuatro partes: colon proximal o ascendente, transverso, descendente y sigmoide (Saladin, 2013).

La pared del colon está formada por cuatro capas: serosa, muscular, submucosa y mucosa, ordenadas desde la zona basal hasta la luz del colon. Son capas muy similares a las del intestino delgado. La capa serosa es la más externa. Es una membrana formada por células epiteliales debajo de la que se localiza tejido adiposo y tejido conjuntivo. La capa muscular está formada por dos capas de músculo liso, una capa interna circular y una capa externa dispuesta de forma longitudinal, entre las que se encuentra el plexo mientérico de Auerbach. La submucosa está formada por tejido conectivo, en la que se encuentra el plexo submucoso o plexo de Meissner. Por último, se encuentra la capa mucosa, compuesta por el epitelio, la lámina propia de tejido conectivo laxo y la capa muscular de la mucosa. En ella se localizan las criptas del colon, que son invaginaciones del epitelio. En la superficie están las células epiteliales que le dan forma al epitelio; y en la base, se encuentran células madre pluripotentes que producen distintos tipos celulares como las células epiteliales o colonocitos, las células goblet o caliciformes y las células enteroendocrinas, para favorecer la renovación celular (Figura 1) (Seller y Morton, 2014).

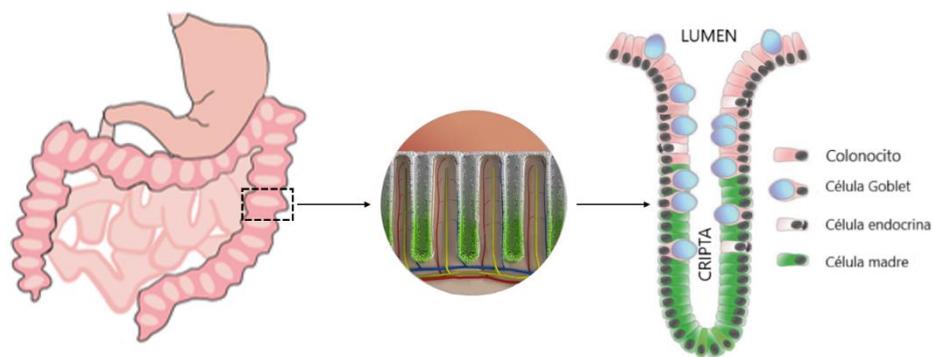


Figura 1. Representación esquemática del intestino grueso y de una cripta intestinal con los distintos tipos celulares que presenta (esquema modificado de Williams et al., 2016; Dutton et al., 2019).

Barrera intestinal

La barrera intestinal es una unidad física y biológica que abarca el intestino y que separa el medio interno del externo. Su función es evitar la entrada de microorganismos patógenos y sustancias

tóxicas y mantener la homeostasis. Se encuentra formada por la propia microbiota, moco y péptidos antimicrobianos, células epiteliales y células inmunes, desde la zona más externa a la más interna (Camilleri et al., 2012; Peterson y Artis, 2014).

El moco es la primera línea de defensa. En el colon, las células goblet o caliciformes, son células del epitelio especializadas en mantener la función de la barrera intestinal, en este caso produciendo moco (compuesto de proteínas glicosiladas de mucina, agua e iones), e IgA secretora, además de péptidos antimicrobianos. La secreción luminal de mucina previene que se adhieran bacterias, actuando como parte de la respuesta inmune del organismo contra patógenos. Hay distintos tipos de mucinas, siendo la más abundante la Mucina 2, que es esencial para la organización de la capa de moco intestinal en la superficie epitelial del colon. Tras la capa de moco, se encuentran uniones estrechas que enlazan las células epiteliales formando una barrera física (Peterson y Artis, 2014; Viggiano et al., 2015; Camara-Lemarroy et al., 2018).

Por último, en la lámina propia, se encuentra la siguiente capa que es, en su mayoría, inmunológica, formándose lo que se conoce como tejido linfoide. Este está formado por folículos linfoides y células inmunes con capacidad de proporcionar una respuesta inmune frente a patógenos y producir mediadores inflamatorios regulando así la homeostasis (Viggiano et al., 2015; Camara-Lemarroy et al., 2018).

La barrera es permeable al agua y a otras moléculas pequeñas, pero cuando la permeabilidad se altera moléculas más grandes y bacterias comensales pueden penetrar, lo que puede conllevar consecuencias patológicas, siendo las más características la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que incluye dos enfermedades: la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (Figura 2) (Camara-Lemarroy et al., 2018).

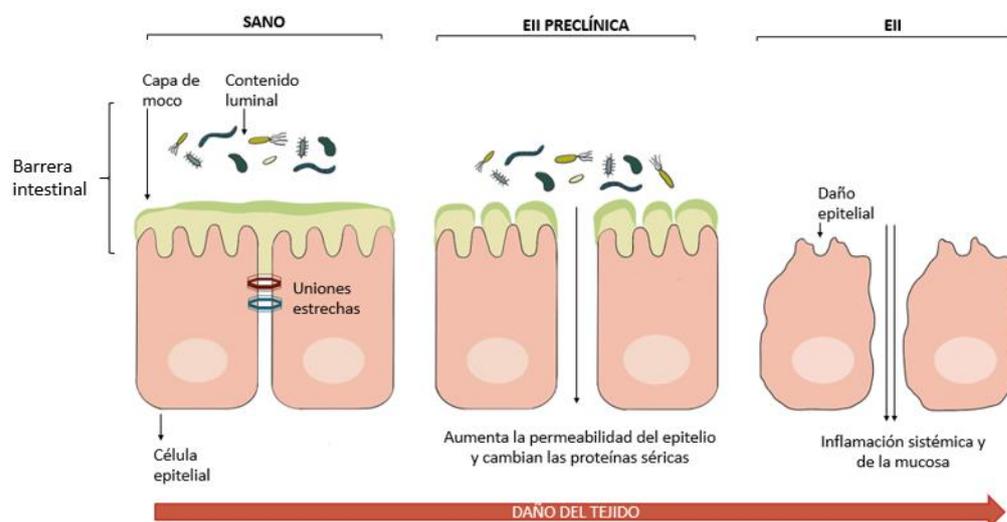


Figura 2. Disfunción de la barrera intestinal (esquema modificado de Mehandru y Colombel, 2020).

Colitis ulcerosa

La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria intestinal crónica. Se caracteriza por una inflamación de la mucosa que comienza en el recto y se extiende hasta el colon. La alteración de la mucosa intestinal y la perturbación de la microbiota son factores de riesgo que pueden desembocar en esta patología. Los síntomas que presenta son diarrea, dolor abdominal, urgencia defecatoria y tenesmo. Dependiendo de la severidad y localización de la enfermedad, los pacientes además pueden presentar sangre en las heces y secreción de moco; y en casos más extremos pérdida de peso y fiebre, anemia y, de forma ocasional, la muerte. Los síntomas suelen comenzar de forma gradual y evolucionar durante varias semanas. Además, en algunos casos se producen manifestaciones extraintestinales que pueden afectar a la piel, a los ojos, al hígado y a las articulaciones, siendo esta manifestación extraintestinal la más frecuente (Solomon et al., 2010; Vavricka et al., 2015; Ungaro et al., 2017; Feuerstein et al., 2019).

Histológicamente la inflamación se produce de manera superficial y puede afectar a la mucosa, submucosa y a la muscular de la mucosa. Es característico la formación de úlceras, la infiltración de células inflamatorias, la pérdida de células goblet o caliciformes, la destrucción de las criptas intestinales y los abscesos (Solomon et al., 2010).

Hay diferentes tratamientos para la colitis ulcerosa. Como fármacos de primera línea se encuentran los aminosalicilatos que se emplean vía oral y rectal para inducir la remisión de las recaídas. También se emplean tiopurinas y corticosteroides como la budesonida. En pacientes que no responden a estos tratamientos se emplean fármacos biológicos que son agentes que dirigen su acción hacia mecanismos inmunológicos e inflamatorios que están involucrados en el desarrollo de la enfermedad. Uno de estos agentes terapéuticos son los anticuerpos anti-TNF α (Factor Necrótico Tumoral Alfa). TNF α es una citoquina proinflamatoria que tiene mucha importancia en la activación y mantenimiento del proceso inflamatorio, de manera que con este tratamiento biológico se puede bloquear la liberación del TNF y neutralizar su acción y así conseguir una remisión completa de la enfermedad (Hinojosa, 2000; Yamamoto-Furusho et al., 2018).

De forma paralela, la respuesta inflamatoria puede estar asociada a cambios en el metabolismo de los tejidos. En el tracto gastrointestinal sano las células epiteliales que recubren la mucosa

forman una barrera con una vasculatura compleja donde está disminuido el flujo sanguíneo, de manera que, estas células, trabajan en un entorno de baja oxigenación. Cuando se produce una inflamación, como ocurre en la colitis ulcerosa, debido a la vasoconstricción, edema y al aumento del consumo de oxígeno que conlleva la patología, se produce hipoxia, por lo que el tracto gastrointestinal ha tenido que desarrollar una serie de mecanismos para hacer frente a su entorno metabólico, produciéndose variaciones en la expresión de enzimas, de genes, y otros mecanismos para poder obtener energía ante una menor disponibilidad de oxígeno y mantener la homeostasis del oxígeno, fundamental para la supervivencia (Karhausen et al., 2004; Colgan et al., 2017).

La respuesta a la hipoxia deber estar coordinada. De esta forma, a nivel celular, se regula por el factor de transcripción HIF, en concreto el HIF-1, que es esencial para mantener la homeostasis del oxígeno. HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos subunidades (HIF-1 α y HIF-1 β) cuya actividad es mediada, fundamentalmente, por la estabilidad de la proteína de la subunidad alfa. Cuando hay niveles normales de oxígeno, la subunidad α es expresada y rápidamente degradada, pero en hipoxia, esta subunidad se estabiliza y se trasloca al núcleo, donde se une a la subunidad β y a secuencias de ADN que expresan genes que responden a la hipoxia. Así, por ejemplo, aumenta la densidad mitocondrial, la mioglobina, y la activación del metabolismo anaeróbico para la producción de energía. Además, se reduce la producción de citoquinas proinflamatorias y aumenta la producción de β -defensinas (Figura 3) (Aquino-Gálvez y González-Ávila, 2010; Colgan et al., 2017; Postovalova et al., 2020).

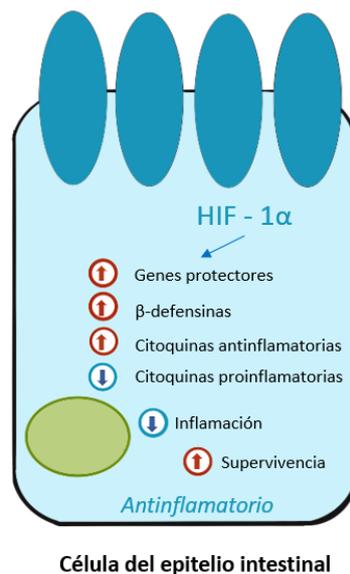


Figura 3. Las funciones del Factor Inducible por Hipoxia HIF-1 α en la enfermedad inflamatoria intestinal (esquema modificado de Postovalova et al., 2020).

Para poder estudiar la colitis ulcerosa, se puede emplear un modelo experimental en ratas o ratones donde la colitis es inducida por DSS. El mecanismo por el que este complejo polímero de glucosa produce la enfermedad inflamatoria intestinal se debe al daño que realiza sobre las células epiteliales del colon haciendo que la barrera intestinal sea atravesada por el contenido intestinal hacia el tejido subyacente, provocando así la inflamación (Solomon et al., 2010; Marin et al., 2016).

La colitis es inducida al administrar DSS en el agua de bebida. Dependiendo de la forma de administración (frecuencia, duración...), se producirá una colitis crónica o aguda; así, por lo general, una colitis aguda se induce usando concentraciones altas de DSS administrado de forma continua durante periodos cortos de unos 4-14 días; y la colitis crónica, se consigue administrando DSS en distintas concentraciones y de forma cíclica, es decir alternando días de tratamiento y días de agua. Normalmente, a partir del 3º día de tratamiento se dan las primeras manifestaciones y la inflamación puede establecerse en un plazo de unos 10 días, pero cuando se suspende el tratamiento los animales tienden a recuperarse (Solomon et al., 2010; Marin et al., 2016).

Homeostasis de la creatina

La creatina es un zwitterión, un compuesto orgánico nitrogenado que puede ser producido de forma endógena u obtenerse con la dieta (Joncquel-Chevalier Curt et al., 2015).

La mayoría de la creatina está presente en el músculo esquelético, y el resto se reparte, principalmente, entre el corazón, cerebro, testículos, hígado y riñón. Esta es menos requerida donde se puede sintetizar, y los tejidos que la necesitan, como el sistema nervioso, el músculo esquelético o el corazón no son capaces de producirla o lo hacen de una manera muy limitada. Por lo que la creatina tiene que ser transportada desde los lugares donde se sintetiza, a través de la sangre, hasta los tejidos con alta demanda energética donde se absorbe (Braissant et al., 2001).

La creatina estimula la función muscular y energética contribuyendo al almacenamiento intracelular de energía. Está involucrada en el metabolismo celular a través de la reposición de ATP (Joncquel-Chevalier Curt et al., 2015).

- **Sistema creatina/fosfocreatina/creatina kinasa**

El sistema formado por creatina/fosfocreatina/creatina kinasa ayuda a mantener la homeostasis energética de la célula sirviendo de almacenamiento y transporte de fosfocreatina en tejidos que tienen alta exigencia metabólica como el corazón, el cerebro, los testículos, la retina y el músculo esquelético. La fosfocreatina contiene grupos fosfato de alta energía, y constituye una reserva disponible para reponer niveles de ATP. Esto se realiza con diferentes isoenzimas de creatina kinasa: creatina kinasa citosólica y creatina kinasa mitocondrial que se localizan en distintos sitios de la célula para generar o utilizar ATP, así, por ejemplo, en las regiones celulares donde se requiere energía, las creatinas kinasas asociadas utilizan la fosfocreatina almacenada para restablecer ATP. Para la formación de fosfocreatina a partir de la creatina kinasa mitocondrial se consume ATP procedente de la fosforilación oxidativa; y cuando se realiza a partir de la creatina kinasa citosólica, se obtiene el ATP de la glucólisis (Joncquel-Chevalier Curt et al., 2015; Kazak y Cohen, 2020).

- **Biosíntesis y transporte de creatina**

La mayor parte de la creatina se encuentra en el músculo esquelético, y otra gran parte, aunque en menor proporción, se encuentra en el cerebro (Joncquel-Chevalier Curt et al., 2015). Los pasos de la síntesis de la creatina y su transporte se encuentran detallados en la Figura 4. En la síntesis endógena, la creatina es producida a partir de arginina y glicina, junto con las enzimas arginina-glicina amidinotransferasa (AGAT) y la guanidinoacetato-metil-transferasa (GAMT). La enzima AGAT está presente en el riñón, en el cerebro y en el páncreas; y la enzima GAMT se encuentra en el hígado, en el cerebro y en el páncreas (Brosnan, 2016).

El primer paso lo lleva a cabo la enzima AGAT transfiriendo un residuo de la arginina a la glicina para dar lugar a la formación de L-ornitina y de guanidinoacetato (GAA). La segunda reacción es catalizada por la enzima GAMT, donde un grupo metilo de S-Adenosil-metionina (SAM) es transferido al Guanidinoacetato. Esto ocurre sobre todo en el hígado, siendo el resultado la formación de creatina y S-Adenosil-homocisteína. La creatina puede liberarse en el torrente sanguíneo y entrar en las células a través de un transportador específico de membrana. Una vez dentro de la células, esta puede ser fosforilada por las creatina kinasa (CK) y ATP dando lugar a la fosfocreatina. Por último, el recambio de creatina se produce de forma espontánea mediante una deshidratación química no enzimática a creatinina que se elimina con la orina (Figura 4) (Brosnan, 2016).

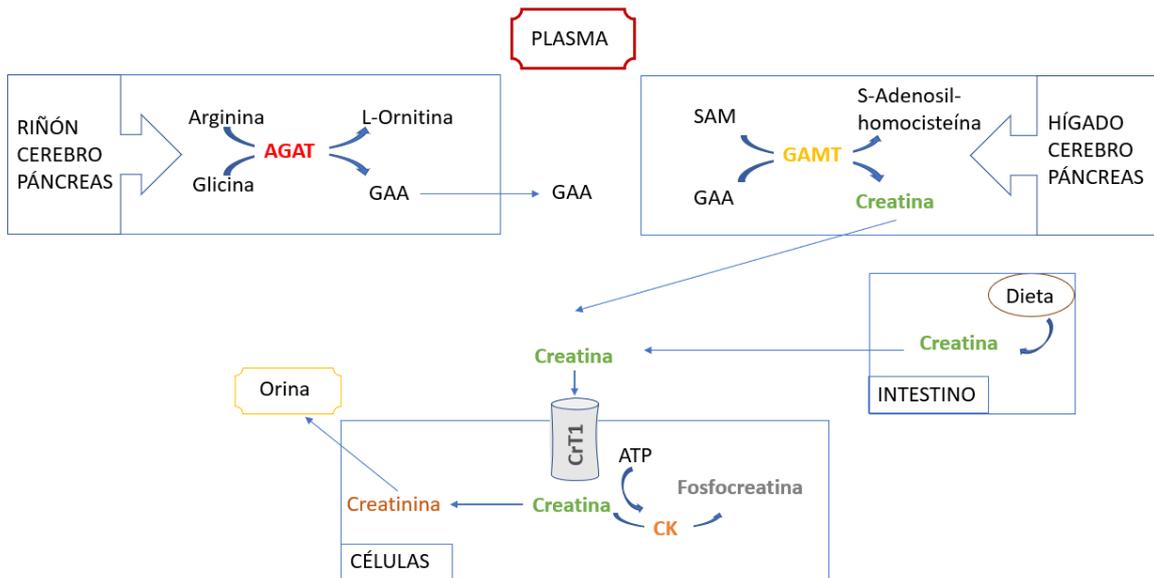


Figura 4. Biosíntesis y transporte de creatina. AGAT: arginina-glicina amidinotransferasa; GAA: guanidinoacetato; SAM: S-Adenosil-metionina; GAMT: guanidinoacetato-metil-transferasa; CK: creatina kinasa; CrT1: transportador creatina (esquema modificado de Brosnan, 2016).

La creatina también puede ser obtenida con la dieta, por ejemplo, a través de carne o pescado que son las fuentes de alimento más ricas en esta molécula. El mecanismo por el que se absorbe es de forma activa en el tracto gastrointestinal de forma similar a como lo hacen los aminoácidos y péptidos. De esta forma, la distribución de esta molécula está determinada por transportadores de creatina. Hay un transportador específico, el CrT1, dependiente de Na^+ y Cl^- codificado por el gen SLC6A8, que se encuentra en la membrana celular apical de las células epiteliales intestinales (Peral et al., 2002). Como la función de este transportador depende de Na^+ , la inhibición de Na^+/K^+ -ATPasa, impide la captación de creatina en las células. Se piensa que cuando la creatina se acumula en el interior de las células del epitelio intestinal esta sale a la circulación a favor de gradiente a través del transportador MCT1 (Figura 5) (Takahashi et al., 2020). Además de lo anteriormente mencionado, como tiene una estructura similar a los aminoácidos básicos, también puede entrar en la circulación sistémica a través del transportador de aminoácidos o transportador de péptidos que se encuentra en el intestino delgado. Una vez que la creatina pasa al plasma es captada también por las células que expresan el transportador CrT1, de manera similar a como lo hacen con la creatina que se sintetiza de forma endógena (Persky et al., 2003; Joncquel-Chevalier Curt et al., 2015; Brosnan, 2016; Kazak y Cohen, 2020; Wallimann et al., 2021).

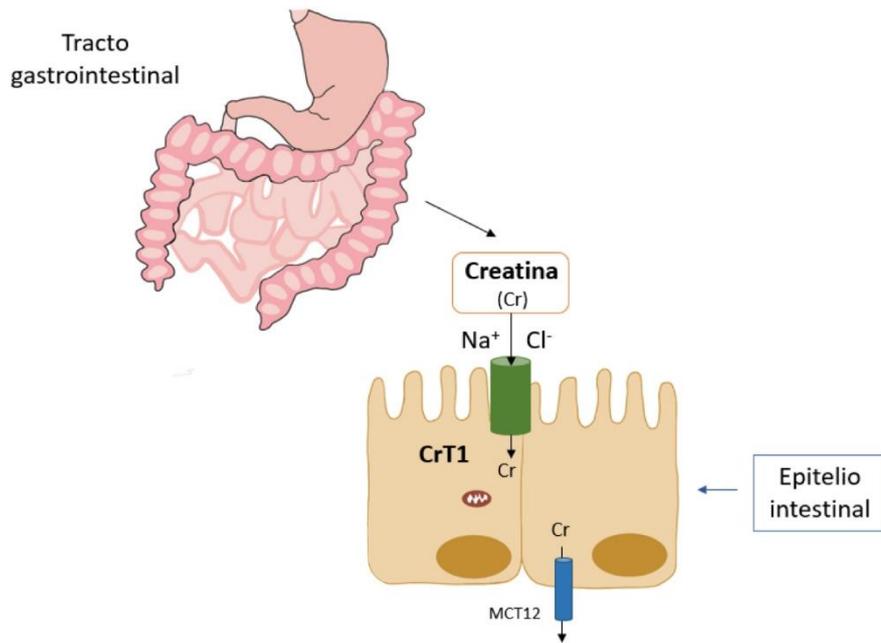


Figura 5. Absorción intestinal de creatina (esquema modificado de Wallimann et al., 2021).

Suplementación con creatina

La mayoría de los estudios de suplementación oral con creatina se han centrado en el beneficio que produce sobre el rendimiento muscular en sujetos sanos; sin embargo, hay estudios que sugieren que la creatina es, además, útil en el tratamiento de diferentes patologías ya que puede ejercer un efecto protector y actuar como agente antiapoptótico, reduciendo los marcadores inflamatorios, actuando como agente antidiabético, reduciendo los lípidos y modulando el sistema inmune (Wallimann et al., 2017).

En los trastornos musculares, como miopatías, incluyendo algunas distrofias musculares, citopatías inflamatorias y trastornos de neuropatía periférica, la suplementación con creatina se ha empleado como tratamiento al ser capaz de promover ganancia de fuerza y masa muscular. Además, en trastornos de hueso y cartílagos se han realizado estudios *in vitro* y se ha comprobado que la creatina aumenta la actividad metabólica de células similares a los osteoblastos e inhiben la diferenciación de los osteoclastos, lo que se traduce en un aumento de masa y densidad ósea. Por ello se ha propuesto su utilización para el tratamiento de osteoporosis y osteoartritis (Gualano et al., 2011).

A nivel cerebral, la creatina ayuda a mantener las provisiones energéticas teniendo así un efecto positivo al emplearse en trastornos cerebrales. Además, puede mejorar la capacidad cognitiva en jóvenes y adultos, y aliviar la fatiga mental. De igual modo esta molécula se puede emplear

en pacientes con trastorno del desarrollo intelectual o autismo, donde existe una disminución cerebral de creatina; y en otras patologías como la depresión, donde la suplementación con creatina aumenta los niveles de fosfocreatina en el cerebro (Roitman et al., 2007; Gualano et al., 2011). A su vez, se puede emplear en la enfermedad de Huntington donde ralentiza la aparición de síntomas (Jano, 2014). Sin embargo, estudios realizados en pacientes con esquizofrenia demostraron que la creatina mejoraba los síntomas, pero no las funciones cognitivas, de forma que este estudio no obtuvo resultados concluyentes para emplear la creatina en esta patología (Levental et al., 2015).

A nivel pulmonar, algunos estudios también han sugerido un papel beneficioso de la suplementación con creatina en fibrosis quística al mejorar la salud y el bienestar del paciente, sin embargo en enfermedades pulmonares obstructivas se observó que se agravaba la inflamación produciéndose un aumento de algunas citoquinas proinflamatorias (Vieira et al., 2007).

Por otro lado, la creatina aumenta el catabolismo de los ácidos grasos y disminuye su síntesis. De esta forma, la incorporación de los ácidos grasos de nueva síntesis en triglicéridos y fosfolípidos es menor en las células tratadas con creatina (Da Silva et al., 2014).

La suplementación con creatina también se puede aplicar el control glucémico y la sensibilidad a la insulina. Esta molécula acrecienta la capacidad de secreción de insulina aumentando su concentración en sangre y haciendo que pueda unirse con su receptor, lo que conduce a la traslocación de GLUT (transportador de glucosa) a la membrana plasmática para utilizar glucosa como fuente de energía, reduciéndose así la glucemia. Además, estimula AMPK, un complejo enzimático que se activa con el aumento de AMP-ATP, por lo que se considera un sensor de energía que induce a la modulación de la oxidación de ácidos grasos y de la glucosa (Pinto et al., 2016).

En relación con lo comentado anteriormente, hay otras enfermedades en las que la suplementación con creatina se está estudiando, y se ha observado algunas en las que tiene un papel probablemente beneficioso y posiblemente beneficioso; y otras, en las que es improbablemente beneficioso (Figura 6).

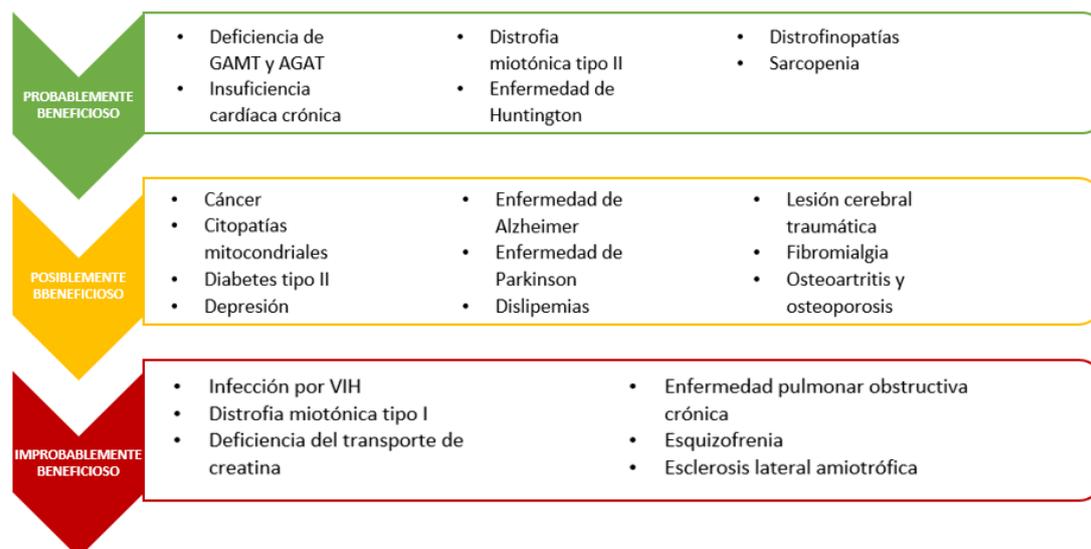


Figura 6. Efecto de la creatina en diferentes patologías (Esquema modificado de Gualano et al., 2011).

Además de todo lo comentado anteriormente, la creatina se puede emplear por su acción antiinflamatoria. En 1976, Madan y Khana indujeron una inflamación con carragenina en ratas y con la suplementación de creatina vieron que se reducía tanto la inflamación como el edema provocado. Así siguieron estudiando la eficacia de la creatina en la inflamación aguda y crónica y su capacidad para actuar como analgésico (Riesberg et al., 2016). Tras diferentes estudios, se ha descubierto que reduce los niveles plasmáticos de citocinas proinflamatorias y prostaglandinas E2, y también puede disminuir la sensibilidad al dolor asociada a la inflamación porque antagoniza el canal iónico sensible al ácido (ASIC3), que media la nocicepción y por tanto, la sensación de dolor, por lo que se puede esperar que la suplementación con esta molécula tenga un efecto beneficioso y alivie el dolor abdominal relacionado con la inflamación intestinal, hecho muy importante para mejorar la calidad de vida en pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) (Bassit et al., 2010; Izurieta Munoz et al., 2018).

Por último, la creatina también tiene un efecto positivo frente al daño tisular actuando como antioxidante (Kreider et al., 2017) y protegiendo de las agresiones isquémicas mejorando la energía de las células del epitelio y la inflamación intestinal (Wallimann et al., 2021).

De acuerdo con todo lo comentado anteriormente, trabajos recientes han descrito modelos de colitis aguda en los que se suplementó con creatina ya que, según las evidencias anteriores, esta podría ejercer una función protectora en el desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales, como la colitis ulcerosa. De este modo, los animales deficientes en creatina son más

susceptibles de desarrollar una colitis aguda y una suplementación con creatina disminuye la severidad de esta patología (Glover et al., 2013; Turer et al., 2016; Kazak y Cohen, 2020; Wallimann et al., 2021).

OBJETIVOS

Según lo expuesto anteriormente, la suplementación con creatina podría proteger del desarrollo de inflamación crónica del colon. Para corroborar esta hipótesis nos planteamos el siguiente plan de trabajo:

1. Comprobar si en nuestro modelo experimental de rata se produce una colitis crónica.
2. Estudiar los efectos de la suplementación con creatina en el modelo experimental citado comprobando si la creatina reduce la inflamación en el colon analizando parámetros como el DAI, la longitud del colon, daño histológico y la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias.

METODOLOGÍA

▪ DISPOSITIVOS

Para poder realizar este trabajo experimental se emplearon los siguientes dispositivos:

- Agitador rotativo "Orbit" (Selecta, 30022512).
- Autoclave (Selecta, Autester-E).
- Baño termorregulable (Selecta, Precisdig)
- Cabina de flujo laminar (Microflow, 25674).
- Campana extractora (CRUMA).
- Cámara de fotos digital acoplada al microscopio (SPOT Insight V 3.5).
- Cubeta de electroforesis para gel de agarosa (Sigma-Aldrich, SHU6).
- Espectrofotómetro (Thermo Fischer, NanoDrop 1000).
- Fuentes de alimentación Power-Pac 200
- Homogenizador Politrón (Ystral, T-1500)
- Microcentrífuga (Eppendorf, 5415C)
- Microscopio óptico (Axioskop 40 Carl Zeiss)
- Microtomo Reichert-Jung, Ultracut E.
- Termociclador para PCR en tiempo real (Bio-Rad, MJ MiniOpticon)

▪ REACTIVOS

Se han empleado productos químicos procedentes de Sigma-Aldrich (España) salvo que se indique otra procedencia.

▪ ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MATERIAL BIOLÓGICO

Se han utilizado ratas Wistar machos, de unos 20 días de edad, con un peso inicial entre 50-70 gramos. Las ratas procedían del Centro de Producción y Experimentación animal de la Universidad de Sevilla y se mantuvieron en el Animalario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla en condiciones de luz, temperatura y humedad adecuadas y con acceso libre a pienso (Global Rodent Diet). Durante las semanas de tratamiento para la inducción de colitis, se controló la ingesta de agua de cada grupo de ratas diariamente.

El sacrificio se realizó mediante una inyección intraperitoneal de ketamina (50mg/kg) más xilacina (10mg/kg), de acuerdo a 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 de las ratas se extrae rápidamente el intestino grueso y se disecciona el ciego y el colon, se lavan con solución salina fisiológica fría (4°C) y se procesan de distinta forma dependiendo del uso experimental. El colon distal es dividido en segmentos que, o bien se congelan en nitrógeno líquido, para realizar la PCR; o se incuban en paraformaldehído al 4% en PBS (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄ y 1,8mM KH₂PO₄) durante toda la noche con agitación orbital, para el análisis histológico.

▪ DISEÑO EXPERIMENTAL

Se ha utilizado un modelo animal en rata que reproduce la enfermedad inflamatoria intestinal con características similares a la colitis ulcerosa humana (Cooper et al., 1993). Para ello se administró en el agua de bebida dextrano sulfato sódico (DSS, MW 40KDA; Panreac Applichem) diluido al 5%. Este compuesto es tóxico para las células epiteliales del colon y altera la integridad de la barrera epitelial.

Por otra parte, algunos grupos de ratas fueron suplementados con creatina (Best Medical Diet S.L.). La administración de esta se realiza a una dosis de 0,5g de creatina por Kg de peso corporal de rata y día. Para inducir la colitis crónica el tratamiento con DSS se realizó en tres ciclos, 2 ciclos de 14 días en los cuales las ratas estuvieron 7 días con tratamiento de DSS, seguidos de otros 7 días sin tratamiento; y un último ciclo de 8 días, en los que los 7 primeros días recibieron el tratamiento y el último día estuvieron sin él, finalizando los ciclos con el sacrificio de las ratas.

Las ratas fueron divididas en cuatro grupos, asignadas aleatoriamente:

- Grupo agua: sin tratamiento ni suplementación.
- Grupo creatina: con suplemento de creatina en el agua de bebida.

- Grupo DSS: con tratamiento de DSS en el agua de bebida.
- Grupo DSS + creatina: con tratamiento de DSS y suplemento de creatina en el agua de bebida.

Antes de comenzar el tratamiento con DSS, los grupos de ratas con suplemento de creatina (agua + creatina y DSS + creatina), estuvieron dos semanas únicamente con suplemento de creatina en el agua de bebida, y, a partir del día 14 comenzó el tratamiento con DSS. Así los grupos DSS + creatina y agua + creatina se encuentran con este suplemento a lo largo de todo el tratamiento.

Durante el tratamiento, y de forma diaria se registró el peso corporal de las ratas, la consistencia de las heces y el sangrado. Al día siguiente de finalizar el tratamiento se sacrificaron las ratas de cada grupo experimental y tras el sacrificio se procedió al estudio macroscópico del intestino grueso e histológico del colon; y se realizaron los ensayos de PCR en tiempo real (Figura 7).

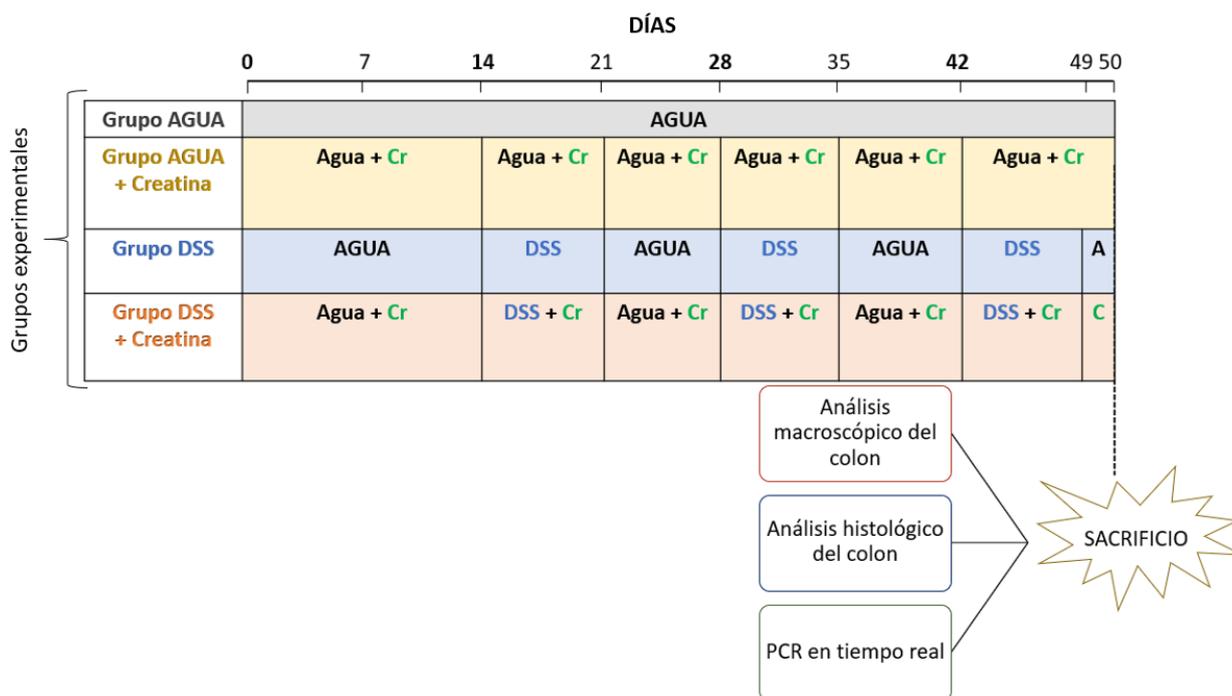


Figura 7. Diseño experimental del tratamiento en cada grupo experimental. Se representa como se llevó a cabo el tratamiento en los diferentes grupos experimentales.

▪ **EVALUACIÓN DE LA INFLAMACIÓN**

○ **Peso corporal e Índice de actividad de la enfermedad (DAI)**

La severidad de la enfermedad se evaluó por las manifestaciones clínicas que se presentaban como el cambio del peso corporal, la consistencia de las heces, y la sangre en heces a lo largo del tratamiento (Yan et al., 2018), estableciendo un valor de 0 a 3 siguiendo la Tabla 1 que se

describe a continuación. Estos parámetros se registraron diariamente durante todo el tratamiento. De este modo la ganancia de peso se calculó considerando que el peso inicial de la rata como el 100% y el DAI como la suma de las puntuaciones obtenidas de las tres medidas indicadas.

Tabla 1. Criterios de evaluación del DAI.

Valor	Peso	Consistencia de las heces	Sangrado rectal
0	Mayor de 75%	Consistentes o bien formadas	Sin sangrado
1	50 – 75%	Heces blandas que no se adhieren al ano	Pequeñas manchas de sangre en heces. Región anal seca
2	25 – 50%	Heces muy blandas adheridas al ano	Grandes manchas de sangre en las heces. La sangre aparece a través del orificio anal. Se observa inflamación del ano
3	Menor de 25%	Heces líquidas con región anal húmeda	Heces de color rojo oscuro. La sangre se extiende en gran medida alrededor de la región anal. Se observa inflamación del ano

○ **Análisis macroscópico**

Para el análisis macroscópico del intestino grueso de las ratas, se determina la presencia de sangre y se mide la longitud del colon indicativo del grado de inflamación.

○ **Análisis histológico**

Los segmentos de colon se fijan con paraformaldehído al 4% en PBS y se deshidratan con soluciones de alcohol a concentraciones crecientes del 70, 80, 90 y 100%. A continuación, se someten a xilol en campana a temperatura ambiente con agitación orbital. Una vez que están deshidratados los segmentos se incuban a 60°C en una mezcla de xilol:parafina (1:1) y se incluyen en parafina a 60°C donde permanecen toda la noche. Para terminar, se montan los bloques de parafina con el tejido y se dejan solidificar a temperatura ambiente.

Una vez que están solidificados los bloques de parafina con el tejido, con ayuda de un microtomo se realizan cortes de colon de 5 µm de espesor y se adhieren a un portaobjetos que contiene un adhesivo (StarFrost® *adhesive slides*, Knittle, Glaser, Alemania) y conservan a temperatura

ambiente hasta su utilización. Las secciones de colon sobre el portaobjetos se tiñen con hematoxilina-eosina, colorante que pigmenta las estructuras ácidas con un color granate, como son los núcleos; y las básicas con un tono rosado, como el citoplasma, respectivamente. Cuando se finaliza la tinción para poder observar las muestras al microscopio se utiliza pegamento de montaje EUKITT®. El análisis de las muestras se llevó a cabo con el microscopio óptico Axioskop 40 Carl Zeiss equipado con una cámara fotográfica digital SPOT Insight V3.5 y un programa de tratamiento de imágenes SPOT Advanced 3.5.4.1.

Para poder evaluar el daño histológico de las muestras se empleó el método descrito por Gaudio (Gaudio et al., 1999) en el que los parámetros que se indican en la Tabla 2 se puntúan del 0-3 según las características mostradas. Así, la evaluación se lleva a cabo por 3 observadores diferentes que dan una puntuación ciega y la valoración final que se obtiene es la suma de puntuación que se atribuye a cada parámetro y la media de los datos obtenidos por cada observador.

Tabla 2. Evaluación de las alteraciones histológicas en inflamación.

VALOR	Destrucción del epitelio y glándulas	Dilatación de las criptas glandulares	Reducción y pérdida de células goblets	Infiltración de células inflamatorias	Edema	Abscesos en las criptas
0	Morfología normal	Aspecto normal	Aspecto normal	Ausencia de infiltración	Ausencia	Ausencia
1	Destrucción local de la superficie epitelial y/o cripta	Dilatación local	Disminución ligera de células goblets	Infiltración leve en la zona subepitelial y lámina propia o base de las criptas	Local	Local
2	Destrucción zonal de la superficie epitelial y/o cripta	Criptas dilatadas en algunas zonas	Disminución en algunas zonas o moderada en general	Infiltración alcanza la muscular de la mucosa	Zonal y/o extendida moderadamente	Zonal

			de células goblet			
3	Destrucción que se extiende por mucosa y/o submucosa y/o pérdida de criptas	Criptas dilatadas en la mayor parte del tejido	Disminución extendida o completa de células goblets	Infiltración severa que se extiende hasta la submucosa y/o muscular propia	Extendida y severa	Extendido por todo el tejido

▪ REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL

El ARN total se extrae del colon distal mediante el *Kit* comercial “RNeasy® Mini” (Método Quiagen). La concentración, pureza e integridad del ARN total obtenido se determinan mediante espectrofotometría (absorbancia a 260nm y 280nm) y electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ARN obtenido se somete a una transcripción reversa, usando 1µg de ARN total y el *kit* comercial “QuantiTect® Reverse Transcription” (Método Quiagen) para obtener el ADN complementario (ADNc). En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

Para la reacción de amplificación se utiliza: 1µl de ADNc problema, 0,4µM de cebadores específicos y 10µl de la enzima SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad). En todos los casos se incluyen blancos que no tienen ADNc. Se utiliza β-actina como gen de referencia para la normalización de los valores de ARNm de las diferentes muestras.

La secuencia de los cebadores fue diseñada de acuerdo a la secuencia de ADNc disponible en la base de datos Genbank y utilizando el programa informático PerlPrimer v1.1.14 (Parkville, Vic., Australia). Los cebadores utilizados se resumen en la tabla 3.

La amplificación se realiza en el termociclador MiniOpticon™ (Bio-Rad) utilizando el siguiente protocolo: 3 minutos a 95°C para desnaturalizar el ADN, seguido de 35 ciclos de 40 segundos a 95°C, 40 segundos a 58°C y 40 segundos a 72°C y, por último, una etapa de elongación de 3 minutos a 72°C. Posteriormente se realiza un análisis de curvas de disociación calentando la

muestra desde los 65°C hasta los 95°C en intervalos de 1°C y monitorizando 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. La temperatura de fusión es específica para cada fragmento de ADN amplificado. La obtención de un único producto de PCR fue confirmado por la aparición de un único pico en la curva de disociación obtenida.

Para cada ADNc, la reacción de PCR se hace por triplicado. En cada muestra, se determinó el número de ciclos necesarios para alcanzar un 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 (Vandesompele et al., 2002).

Tabla 3. Cebadores específicos para PCR en Tiempo Real.

GEN	SENTIDO (5' ... 3')	ANTISENTIDO (5' ... 3')
IL-1 β	CTTTCGACAGTGAGGAGAATGAC	CCACAGCCACAATGAGTGAC
IL-6	ACAAGTCGGAGGCTTAATTACA	GAAAAGAGTTGTGCAATGGCAA
TNF α	CTCACACTCAGATCATCTTCTC	TGGTATGAAATGGCAAATCGG
β -actina	ACCCACACTGTGCCCATCTA-	CGGAACCGCTCATTGCC

▪ PRESENTACION DE LOS RESULTADOS Y MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados se muestran como el error estándar de la media (EMM). El número de animales utilizados en cada condición experimental fue de 6 (n=6). Para realizar comparaciones de múltiples medidas se utilizó el test ANOVA, un análisis de varianza de dos vías, seguido del test de Bonferroni o Tukey según el caso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Efecto de la suplementación de creatina en ratas sin tratar y tratadas con DSS, sobre el peso corporal y el DAI (Índice de Actividad de la Enfermedad)

Se ha evaluado el efecto de la creatina en un modelo de colitis crónica en ratas tratadas con DSS. Tal como se explica en Métodos el tratamiento consistió en un periodo de suplementación solo con creatina seguido de 3 ciclos con DSS-agua.

Para evaluar el efecto de la creatina se mide el peso corporal de las ratas a lo largo de todo el periodo de estudio. Los resultados recogidos en la Figura 8 muestran que las ratas tratadas con DSS, a partir del séptimo día desde el comienzo del tratamiento con DSS, es decir, en torno al día 21, ganan menos peso que las ratas que solo toman agua. Este efecto se ve reducido en las ratas con colitis que además recibieron el suplemento de creatina.

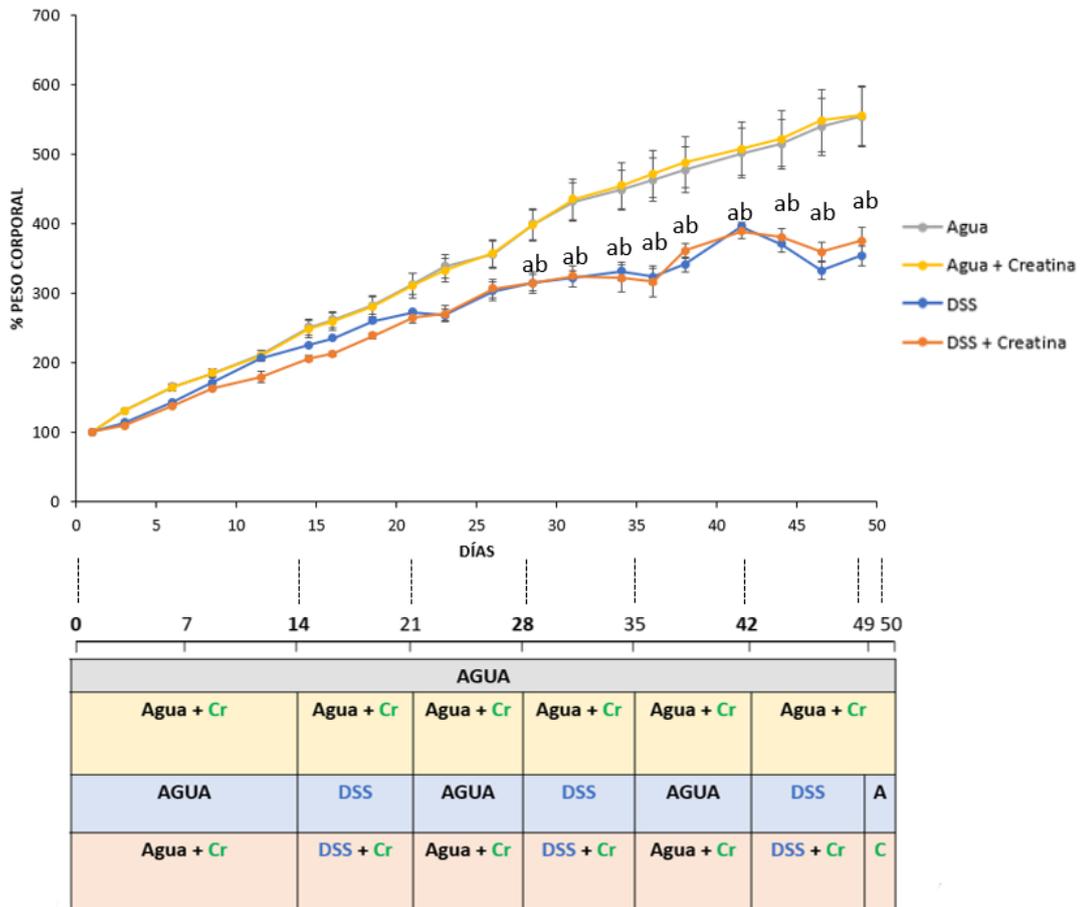


Figura 8: Peso corporal relativo de las ratas a lo largo del estudio experimental

Se representa el porcentaje de peso corporal respecto al del día de inicio del estudio. Media \pm EMM (6 ratas en cada grupo experimental). Test de Tukey: a $p < 0,01$ vs. agua, b $p < 0,01$ vs. agua + creatina.

En relación con la disminución de la ganancia de peso observada en los grupos de ratas tratados con DSS, un estudio en el que se demostró que los animales suplementados con creatina eran menos susceptibles a la pérdida de peso en una colitis aguda inducida con DSS. Por otro lado, en el mismo estudio, para corroborar este hecho se indujo una colitis con ácido TNBS (trinitrobenzenosulfónico) donde también se observó una menor ganancia de peso del grupo tratado, a diferencia del que, además de TNBS, llevaba suplemento de creatina (Glover et al., 2013).

También se evaluó el Índice de Actividad de la Enfermedad (DAI). Este evalúa los signos que indican la presencia de inflamación en el colon a lo largo del tratamiento con DSS. Como se observa en la Figura 9, el DAI aumenta los días 21, 37 y 49 en aquellas ratas tratadas con DSS siendo menor en las suplementadas con creatina en los días 21 y 49.

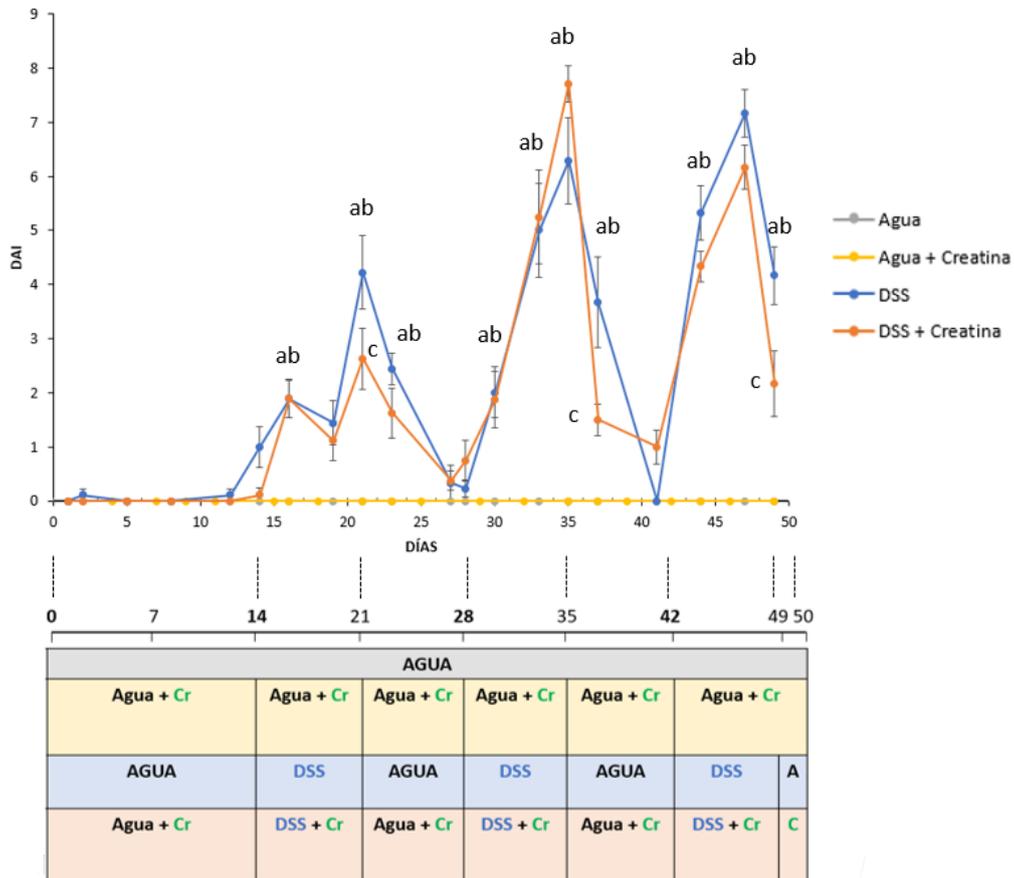


Figura 9: Índice de actividad de la enfermedad (DAI) a lo largo del estudio experimental.

Media \pm EMM (6 ratas en cada grupo experimental). Test de Bonferroni: a $p < 0,05$ vs. agua, b $p < 0,05$ vs. agua + creatina, c $p < 0,05$ vs. DSS.

Algunas publicaciones afirman que la suplementación oral con creatina en ratones inflamados con DSS reduce la severidad que se produce en la enfermedad inflamatoria intestinal (Wallimann et al., 2021). Esto se puede ver corroborado en la enfermedad de Crohn donde se realizó un estudio en una persona joven para comprobar si el suplemento con creatina podía aliviar los síntomas de la enfermedad. Para ello se empleó 1,5 g/día de creatina durante 6 meses, mostrándose un efecto positivo al atenuar el índice de actividad de la enfermedad y, por tanto, la sintomatología y las alteraciones histológicas de esta patología (Roy y Lee, 2016). Otro ejemplo más reciente es el ensayo clínico que se ha llevado a cabo en los últimos cinco años (2016 – 2021) en la Universidad de Colorado (Denver) en el que a 6 pacientes con colitis ulcerosa leve – moderada se les administró 21 g/día de creatina durante 8 semanas, tras las cuales se

observó una disminución de la inflamación de la mucosa, propia de la colitis ulcerosa, y una reducción de la permeabilidad intestinal (Wallimann et al., 2021; NCT02463305).

2. Efecto de la suplementación con creatina sobre la longitud y el daño histológico del colon inducido por DSS.

El acortamiento del colon es considerado un signo de colitis. De esta forma, al finalizar el estudio, se midió la longitud de este en las ratas que solo tomaban agua, en las ratas tratadas con DSS y en aquellas suplementadas con creatina mostrándose diferencias significativas (Figuras 10 y 11). Como era de esperar, las ratas que recibieron DSS presentan menor longitud del colon respecto a las ratas no tratadas, y las ratas que además recibieron creatina junto a DSS presentan una reducción menor del colon.



Figura 10: Fotografías representativas del ciego y del colon.

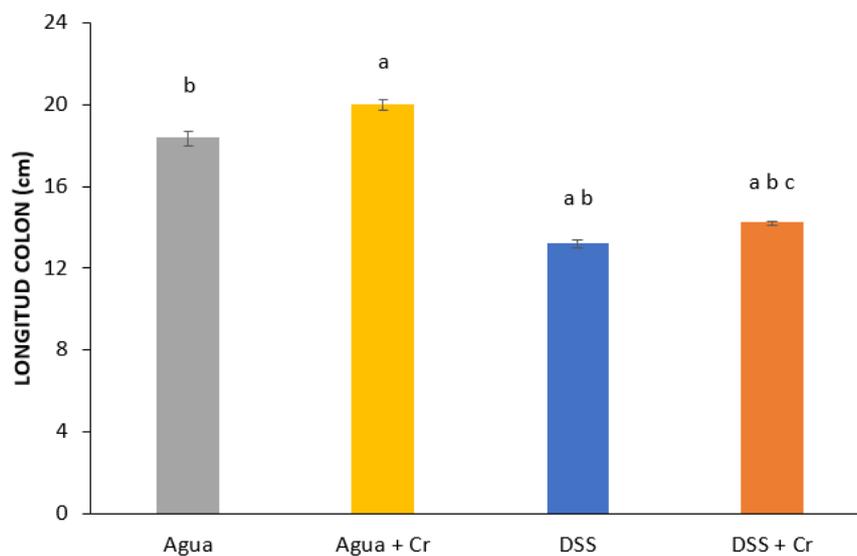


Figura 11: longitud del colon. Se representa la longitud del colon de cada grupo de ratas. Media \pm EEM (6 ratas en cada grupo experimental). El ANOVA reveló un efecto del DSS y de la creatina sobre la longitud del colon ($p < 0,001$). Test de Tukey: a $p < 0,05$ vs. agua, b $p < 0,05$ vs. agua + creatina, c $p < 0,05$ vs. DSS.

En relación con nuestros resultados, muchos estudios en los que se administró DSS para inducir una colitis en los que se observó que los animales no tratados tenían una longitud normal del colon a diferencia de los que sí recibieron un tratamiento de DSS en los que se observó un acortamiento del mismo (Li et al., 2018). Además, los animales suplementados con creatina vieron reducida su susceptibilidad a la colitis inducida por DSS, al no presentar la misma inflamación ni el colon tan acortado como los que solo tenían tratamiento con DSS (Glover et al., 2013; Turer et al., 2017).

El análisis histológico del colon de las ratas con DSS y DSS + creatina se realizó para confirmar que la colitis estaba siendo inducida correctamente, y para estudiar el efecto de la suplementación con creatina sobre los daños causados por el DSS. De igual forma y, a modo de control, se realizó el mismo análisis en el colon de las ratas que bebieron agua y agua + creatina.

Tal como se explica en Métodos, el análisis se realiza sobre cortes histológicos de colon de ratas pertenecientes a cada uno de los grupos experimentales, que han sido teñidos con Hematoxilina/Eosina y asignando un valor numérico a cada uno de los parámetros establecidos (Tabla 2 de Métodos) obteniendo finalmente una puntuación global del daño histológico.

En la Figura 12 se muestran fotografías representativas de los tejidos teñidos de los cuatro grupos experimentales, y en la Figura 13 se representa la puntuación del daño histológico. Como era de esperar las ratas tratadas con DSS presentan una puntuación de $7,2 \pm 2,1$ indicando que el DSS ha causado daño que se aprecia en la mucosa y submucosa del colon. Estos daños fueron revertidos, al menos en parte, en las ratas que, además de DSS, fueron suplementadas con creatina donde la puntuación obtenida fue de $4,7 \pm 1,1$. Las imágenes recogidas en la Figura 12, muestran que las ratas tratadas con DSS tienen, principalmente la mucosa y submucosa, con pérdida de la estructura normal de las criptas, de las células caliciformes, y de los colonocitos, presentando, además, edema e infiltración de células inflamatorias. También se observa que aquellas ratas que además del DSS recibieron creatina presentan una estructura de la pared del colon casi normal, manteniendo cierta integridad en el epitelio (colonocitos y criptas) y prácticamente sin edema ni infiltración. Estos resultados nos confirman que el efecto protector de la creatina también ocurre a nivel histológico.

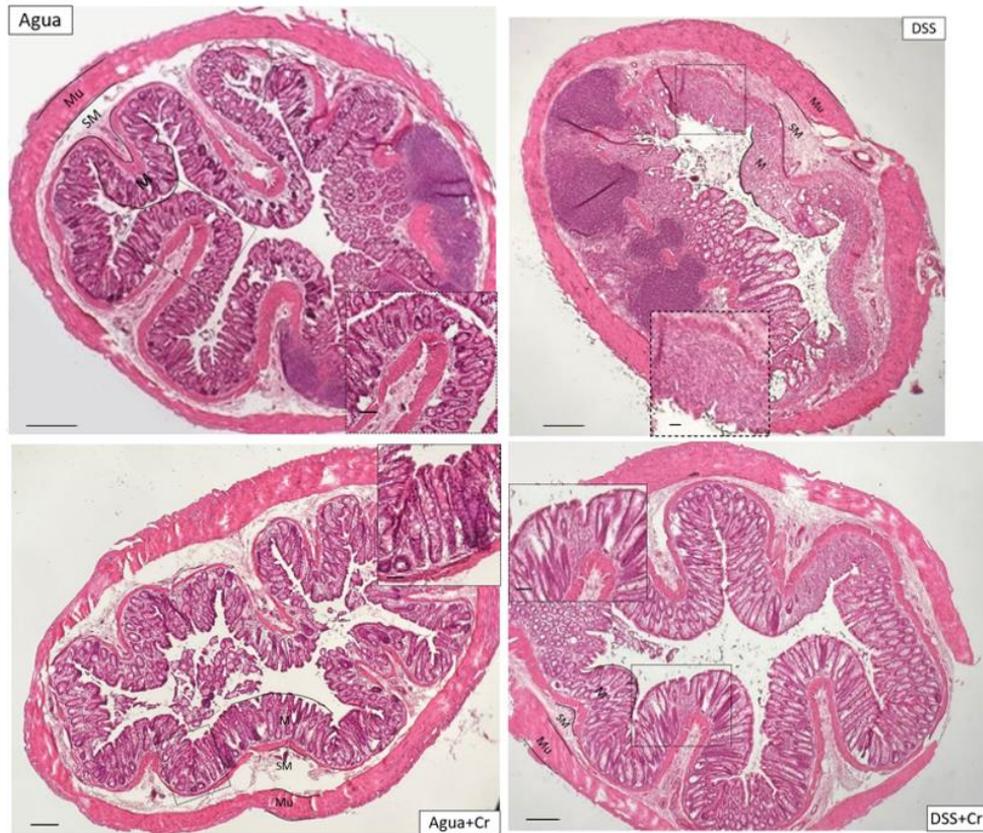


Figura 12: Tinción de hematoxilina-eosina de sección del colon de ratas.

Fotografías representativas de los tejidos de los cuatro grupos de ratas. Barra de escala 400 μm . (Mu: muscular, SM: submucosa, M: mucosa).

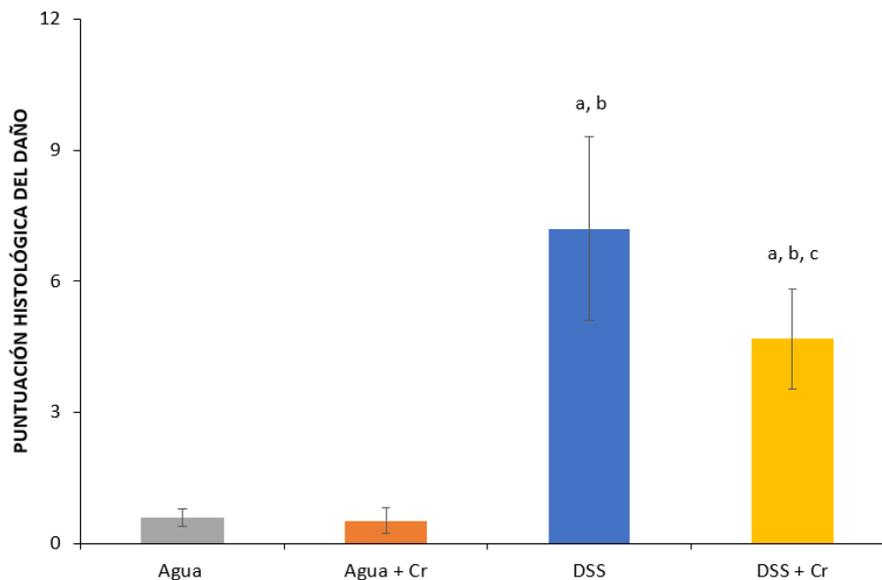


Figura 13: puntuación histológica del daño en el colon. Se representa la puntuación del daño histológico en los cuatro grupos de ratas. Media \pm EMM (6 ratas en cada grupo experimental). El ANOVA reveló un efecto del DSS y de la creatina sobre el daño del colon ($p < 0,001$). Test de Tukey: a $p < 0,01$ vs. agua, b $p < 0,01$ vs. agua + creatina, c $p < 0,05$ vs. DSS.

En cuanto al daño histológico, se han realizado estudios que han demostrado que las ratas con suplemento de creatina no mostraban alteraciones histológicas tan excesivas como las que presentaban animales sin este suplemento en una colitis inducida por DSS (Glover et al., 2013), hecho que también se puede observar en el presente trabajo, donde las ratas tratadas con DSS presentan una destrucción del epitelio con edema e infiltración de células inflamatorias, a diferencia de las que además de DSS, están suplementadas con creatina, como se ha comentado anteriormente.

Con relación a este hecho se realizó un estudio en humanos donde se relacionó la suplementación con creatina con el balance de energía de las células del epitelio intestinal, la integridad epitelial y la función de la barrera en personas con colitis ulcerosa. Como se acaba de comentar, en esta enfermedad hay una disfunción de la barrera intestinal que puede estar relacionada con una alteración de la energía celular. Para corroborar este hecho, los autores realizaron biopsias a 27 pacientes con esta patología donde se mostró una disminución de la expresión del transportador específico de creatina, CrT1, debido a que en la colitis ulcerosa el epitelio de las células, donde se localiza dicho transportador, está dañado. Esto podría contribuir a una reducción de la función de la barrera intestinal, ya que además de regular la concentración intracelular de creatina, este transportador también modula la formación de la barrera intestinal. De esta forma se llegó a la conclusión de que una suplementación con creatina puede servir de protección ya que, junto con la creatina kinasa y la fosfocreatina, regula el equilibrio energético y con ello la integridad epitelial y la función de la barrera en pacientes con esta patología (Hall et al., 2020).

3. Efecto de la suplementación de creatina sobre la abundancia del ARNm de IL-6, TNF- α e IL-1 β en el colon.

Para evaluar si la inflamación intestinal modificaba los niveles de ARNm de las citoquinas proinflamatorias Interleuquina-6 (IL-6), Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) e Interleuquina 1-beta (IL-1 β), se realizó una PCR en tiempo real. Los resultados recogidos en las Figura 14 muestran que aquellas ratas que recibieron DSS presentan mayores niveles de las tres citoquinas medidas, siendo la IL-6 la que más aumenta respecto a las ratas que recibieron agua ($87,9 \pm 17,66$). La suplementación con creatina en las ratas inflamadas redujo significativamente la abundancia de la IL-6 ($29,23 \pm 7,69$), pero no mostró ningún cambio significativo en los niveles de TNF- α ($6,06 \pm 3,19$ vs. $6,46 \pm 2,47$) y de IL-1 β ($10,59 \pm 3,21$ vs. $11,31 \pm 4,98$).

Estos ensayos nos indican que la inducción de la inflamación por el DSS en el colon está siendo mediada por las citoquinas IL-6, TNF- α e IL-1 β , y que la creatina estaría ejerciendo su efecto protector, principalmente, a través de la reducción de la IL-6.

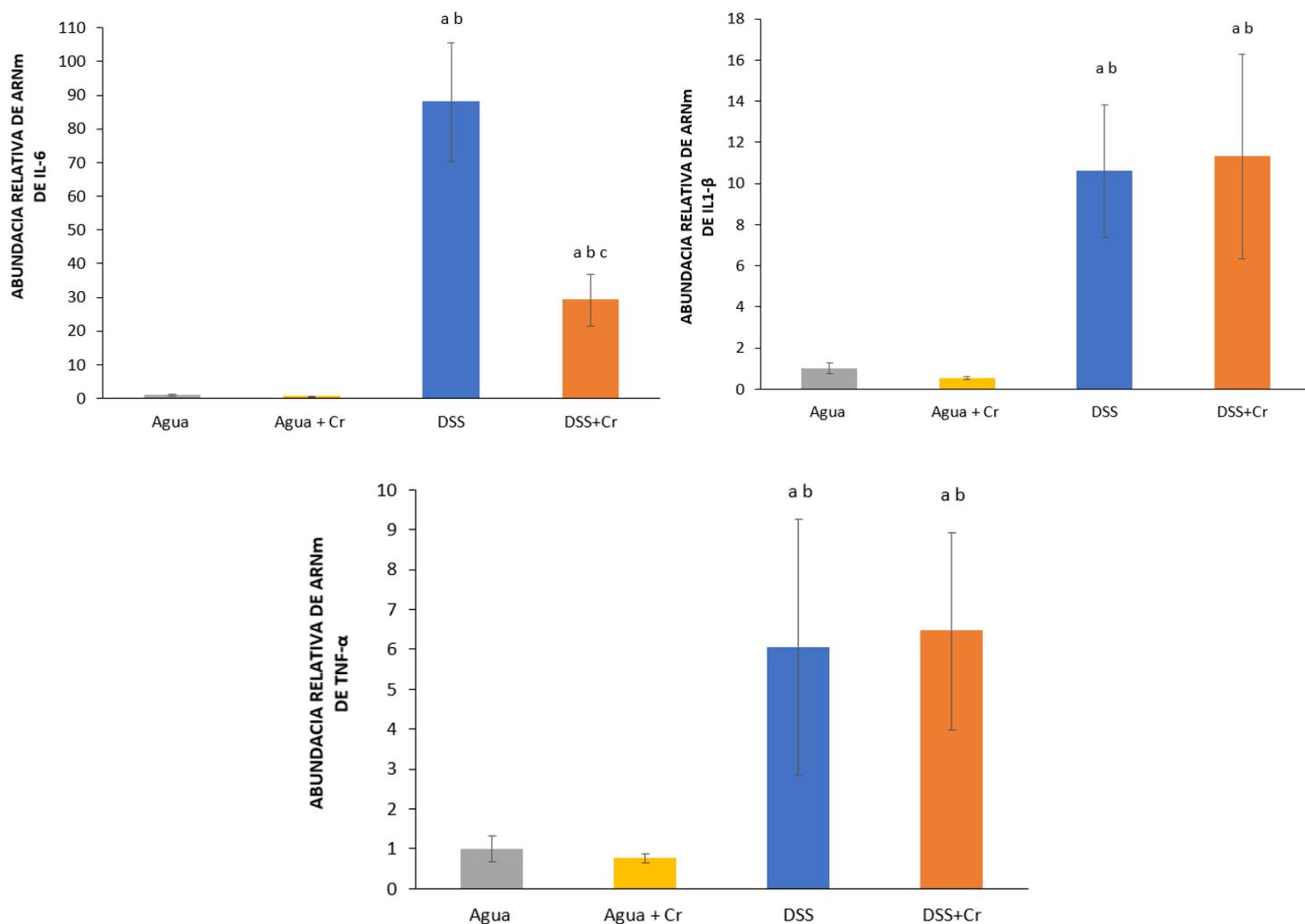


Figura 14: efecto de la suplementación de creatina sobre la abundancia del ARNm de IL-6, TNF- α e IL-1 β . Se representa la abundancia relativa de ARNm de las citoquinas proinflamatorias en el colon tras la administración de DSS, y el efecto que tiene sobre estas la suplementación de creatina. Media \pm EEM (6 ratas en cada grupo experimental). El ANOVA reveló un efecto del DSS sobre la abundancia relativa de ARNm de las tres citoquinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6), pero reveló un efecto de la creatina sólo sobre la abundancia relativa de ARNm de la IL-6 ($p < 0,001$). Test de Tukey: a $p < 0,01$ vs. agua, b $p < 0,01$ vs. agua + creatina, c $p < 0,05$ vs. DSS.

Diversos estudios indican que en la enfermedad inflamatoria intestinal, y por ello en la colitis ulcerosa, las citoquinas inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 se encuentran elevadas. De hecho se

han realizado estudios en diferentes modelos de colitis inducidos por DSS donde se pueden observar cómo aumentan los niveles de estas tres citoquinas (Kim et al., 2012; Shijie et al., 2013; Li et al., 2018).

El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) es una citoquina que está relacionada con la inflamación intestinal y la disfunción de la barrera, y se ha demostrado que aumenta la permeabilidad intestinal en pacientes que tienen esta enfermedad. Diversos estudios han demostrado que TNF- α se encuentra elevada en personas con Colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (You et al., 2008), al igual que se puede ver en el presente trabajo, donde las ratas con tratamiento de DSS tienen TNF- α elevada en comparación con el grupo agua y el grupo de suplementación con creatina.

Por otro lado, diferentes estudios han mostrado que la IL-6 se encuentra también bastante elevada, en comparación con las otras citoquinas, cuando se administra un 3% de DSS para inducir la colitis (Xiao et al., 2016). Esta tiene múltiples acciones proinflamatorias: modula las uniones estrechas del epitelio intestinal y actúa como el principal estímulo para la producción de proteína C reactiva, un biomarcador serológico relacionado con la inflamación, siendo muy importante en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal (You et al., 2008; Mawdsley et al., 2008; Xiao et al., 2016).

De igual forma hay estudios que explican que la IL-1 β es una de las citoquinas proinflamatorias más importantes relacionadas con la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal, cuya producción se basa en la activación de la inflamación (Gong et al., 2018). Además, en situaciones inflamatorias, la activación de IL-1 β puede contribuir sustancialmente a la inflamación de los tejidos, por lo que un aumento de sus niveles en plasma está correlacionado con la severidad de la inflamación intestinal y con la actividad de la enfermedad (Latz et al., 2013).

Nuestras observaciones confirman los resultados obtenidos por otros estudios que muestran un aumento significativo de estas citoquinas proinflamatorias en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, en concreto con la colitis ulcerosa. De forma análoga, un ensayo demostró que cuando la actividad de la creatina kinasa se encuentra restringida aumenta el nivel de algunas citoquinas, de ahí que la suplementación con creatina disminuya el nivel de algunas de estas (Ebermann et al., 2009; Wallimann y Harris, 2016). De hecho, en nuestro estudio se puede observar una disminución de la expresión de IL-6 en el grupo experimental con suplemento de creatina, lo que indica el efecto protector que tiene esta molécula.

Por último, sería conveniente comentar que la inflamación crónica asociada a colitis conlleva un mayor riesgo de padecer cáncer de colon. La creatina, al favorecer la renovación del epitelio y reducir la inflamación crónica podría evitar la aparición de este tipo de cáncer (Glover et al., 2013). Por otra parte, diversos estudios indican que tanto la creatina, como el ciclo de la creatina inhiben el crecimiento tumoral. Algunos autores han observado que en las células tumorales el sistema creatina-creatina kinasa estaba dañado lo que llevó a pensar que las enzimas AGAT y GAMT estaban inhibidas, hecho que podía apoyar el metabolismo de las células cancerosas. Por ello, una suplementación con creatina puede ser una de las razones que ayude a disminuir el riesgo de este tipo de cáncer, ya que restaura el sistema creatina-CK y mejora los niveles de AGAT y GAMT (Wallimann y Harris, 2016).

Todas estas observaciones contribuyen a proporcionar un argumento convincente de que la suplementación con creatina ayuda a restaurar el epitelio intestinal, atenuar la inflamación de la mucosa y mejorar la energía de las células del epitelio, lo que se traduce en un efecto protector.

CONCLUSIONES

1. La colitis crónica inducida con DSS produce manifestaciones clínicas como histológicas en el colon.
2. La suplementación con creatina reduce las manifestaciones clínicas y el daño en el colon inducido por DSS, proporcionando un efecto protector frente a la enfermedad y disminuyendo la severidad de la patología.
3. La suplementación con creatina no evita la disminución de la ganancia de peso que ocurre en el grupo experimental tratado con DSS.
4. La suplementación con creatina disminuye la inflamación en el colon reduciendo la expresión relativa de ARNm de la IL-6.
5. Serían necesarios más estudios para determinar el efecto de otras concentraciones de DSS, como promotor de la colitis ulcerosa; y de otras concentraciones de creatina, para estudiar su efecto protector sobre la enfermedad.
6. Este estudio y futuras investigaciones pueden ayudar a que en un futuro la aplicación de creatina se convierta en un coadyuvante para la colitis ulcerosa, pudiendo combinarse con otros medicamentos que ya se encuentren establecidos para tratar este tipo de patología.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aquino-Gálvez A, González-Ávila G. El papel del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) en la fibrosis pulmonar idiopática. *Neumol Cir Torax*. 2010; 69(3): 8.
2. Bailey RW, Bourne EJ. Intracellular Glycosidases of Dextran-producing Bacteria. *Nature*. 1961; 191(4785): 277-278.
3. Bassit RA, Pinheiro CH, Vitzel KF, Sproesser AJ, Silveira LR, Curi R. Effect of short-term creatine supplementation on markers of skeletal muscle damage after strenuous contractile activity. *Eur J Appl Physiol*. 2010; 108(5): 945-955.
4. Braissant O, Henry H, Loup M, Eilers B, Bachmann C. Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. *Mol Brain Res*. 2001; 86(1-2): 193-201.
5. Camara-Lemarroy CR, Metz L, Meddings JB, Sharkey KA, Wee Yong V. The intestinal barrier in multiple sclerosis: implications for pathophysiology and therapeutics. *Brain*. 2018; 141(7): 1900-1916.
6. Camilleri M, Madsen K, Spiller R, Van Meerveld BG, Verne GN. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease: Intestinal barrier function. *Neurogastroenterol Motil*. 2012; 24(6): 503-512.
7. Campos-Ferraz PL, Gualano B, das Neves W, Andrade IT, Hangai I, Pereira RTS, et al. Exploratory studies of the potential anti-cancer effects of creatine. *Amino Acids*. 2016; 48(8): 1993-2001.
8. Cardoso-Silva D, Delbue D, Itzlinger A, Moerkens R, Withoff S, Branchi F, et al. Intestinal Barrier Function in Gluten-Related Disorders. *Nutrients*. 2019; 11(10): 2325.
9. Colgan SP, Campbell EL, Kominsky DJ. Hypoxia and Mucosal Inflammation. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2016; 11(1): 77-100.

10. Da Silva RP, Kelly KB, Leonard K-A, Jacobs RL. Creatine reduces hepatic TG accumulation in hepatocytes by stimulating fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2014; 1841(11): 1639-1646.
11. Dutton JS, Hinman SS, Kim R, Wang Y, Allbritton NL. Primary Cell-Derived Intestinal Models: Recapitulating Physiology. *Trends Biotechnol*. 2019; 37(7): 744-760.
12. Ebermann L, Piper C, Kühl U, Klingel K, Schlattner U, Siafarikas N, et al. Impact of myocardial inflammation on cytosolic and mitochondrial creatine kinase activity and expression. *Basic Res Cardiol*. 2009; 104(3): 247-257.
13. Eisenstein M. Ulcerative colitis: towards remission. *Nature*. 2018; 563(7730): S33-S33.
14. Feuerstein JD, Moss AC, Farraye FA. Ulcerative Colitis. *Mayo Clin Proc*. 2019; 94(7): 1357-1373.
15. Fonseca-Camarillo GC, Villeda-Ramírez MA, Sánchez-Muñoz F, Barreto-Zúñiga R, Domínguez-López A, Uribe-Esquivel M, et al. Expresión del gen de IL-6 y TNF- α en la mucosa rectal de pacientes con colitis ulcerosa crónica idiopática y controles. *Rev Gastroenterol México*. 2009; 74(4): 334-340.
16. Gehart H, Clevers H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019; 16(1): 19-34.
17. Glover LE, Bowers BE, Saeedi B, Ehrentraut SF, Campbell EL, Bayless AJ, et al. Control of creatine metabolism by HIF is an endogenous mechanism of barrier regulation in colitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(49): 19820-19825.
18. Gong Z, Zhao S, Zhou J, Yan J, Wang L, Du X, et al. Curcumin alleviates DSS-induced colitis via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β production. *Mol Immunol*. 2018; 104: 11-19.
19. Gualano B, Roschel H, Lancha AH, Brightbill CE, Rawson ES. In sickness and in health: the widespread application of creatine supplementation. *Amino Acids*. 2012; 43(2): 519-529.

20. Hall CHT, Lee JS, Murphy EM, Gerich ME, Dran R, Glover LE, et al. Creatine Transporter, Reduced in Colon Tissues From Patients With Inflammatory Bowel Diseases, Regulates Energy Balance in Intestinal Epithelial Cells, Epithelial Integrity, and Barrier Function. *Gastroenterology*. 2020; 159(3): 984-998.e1.
21. Hinojosa J. Anticuerpos anti-TNF en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol Hepatol*. 2000; 23(5): 250-257.
22. Izurieta Munoz H, Gonzales EB, Sumien N. Effects of creatine supplementation on nociception in young male and female mice. *Pharmacol Rep*. 2018; 70(2): 316-321.
23. Joncquel-Chevalier Curt M, Voicu P-M, Fontaine M, Dessein A-F, Porchet N, Mention-Mulliez K, et al. Creatine biosynthesis and transport in health and disease. *Biochimie*. 2015; 119: 146-165.
24. Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, Johnson RS, Colgan SP, Haase VH. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J Clin Invest*. 2004; 114(8): 1098-1106.
25. Kazak L, Cohen P. Creatine metabolism: energy homeostasis, immunity and cancer biology. *Nat Rev Endocrinol*. 2020; 16(8): 421-436.
26. Keshteli AH, Madsen KL, Dieleman LA. Diet in the Pathogenesis and Management of Ulcerative Colitis; A Review of Randomized Controlled Dietary Interventions. *Nutrients*. 2019; 11(7): 1498.
27. Kim JJ, Shajib MdS, Manocha MM, Khan WI. Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD. *J Vis Exp*. 2012; (60): 3678
28. Kitzenberg D, Colgan SP, Glover LE. Creatine kinase in ischemic and inflammatory disorders. *Clin Transl Med*. 2016; 5: 31
29. Kreider RB, Kalman DS, Antonio J, Ziegenfuss TN, Wildman R, Collins R, Candow DG, Kleiner SM, Almada AL, Lopez HL. International Society of Sports Nutrition position stand: safety and efficacy of creatine supplementation in exercise, sport, and medicine. *J Int Soc Sports Nutr*. 2017; 14(1): 18

30. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol.* junio de 2013; 13(6): 397-411.
31. Levental U, Bersudsky Y, Dwalatzky T, Lerner V, Medina S, Levine J. A pilot open study of long term high dose creatine augmentation in patients with treatment resistant negative symptoms schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci.* 2015; 52(1): 6-10
32. Li Y, Adam R, Colombel J-F, Bian Z. A characterization of pro-inflammatory cytokines in dextran sulfate sodium-induced chronic relapsing colitis mice model. *Int Immunopharmacol.* 2018; 60: 194-201.
33. Martin JC, Bériou G, Josien R. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Acute Colitis in the Rat. En: Cuturi MC, Anegón I, editores. *Suppression and Regulation of Immune Responses.* Springer New York. 2016; 1371: 197-203.
34. Mawdsley JE, Jenkins DG, Macey MG, Langmead L, Rampton DS. The Effect of Hypnosis on Systemic and Rectal Mucosal Measures of Inflammation in Ulcerative Colitis. *Am J Gastroenterol.* 2008; 103(6): 1460-1469.
35. Mehandru S, Colombel J-F. The intestinal barrier, an arbitrator turned provocateur in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021; 18(2): 83-84.
36. Möller R, Vazquez N, Teliz D, Méndez V. Peritoneo del Aparato Digestivo de la Rata Wistar (*Rattus norvegicus*). *Int J Morphol.* 2013; 31(1): 128-130.
37. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *The Lancet.* 2012; 380(9853): 1606-1619.
38. Peral MJ, García-Delgado M, Calonge ML, Durán JM, Horra MCDL, Wallimann T, et al. Human, rat and chicken small intestinal Na⁺-Cl⁻-creatine transporter: functional, molecular characterization and localization. *J Physiol.* 2002; 545(1): 133-144.
39. Persky AM, Brazeau GA, Hochhaus G. Pharmacokinetics of the Dietary Supplement Creatine: *Clin Pharmacokinet.* 2003; 42(6): 557-574.

40. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(3): 141-153.
41. Pinto CL, Botelho PB, Pimentel GD, Campos-Ferraz PL, Mota JF. Creatine supplementation and glycemic control: a systematic review. *Amino Acids*. 2016; 48(9): 2103-2129.
42. Postovalova EA, Makarova OV, Kosyreva AM, Dzhaililova DS. Hypoxia is a key mechanism for regulating inflammation in ulcerative colitis. *Russ Open Med J*. 2020; 9(1): e0101.
43. Riesberg LA, Weed SA, McDonald TL, Eckerson JM, Drescher KM. Beyond Muscles: The Untapped Potential of Creatine. *Int Immunopharmacol*. 2016; 37: 31-42.
44. Roitman, S., Green, T., Osher, Y., Karni, N., & Levine, J. (2007). Creatine monohydrate in resistant depression: a preliminary study. *Bipolar Disorders*. 2007; 9(7): 754–758.
45. Roy A, Lee D. Dietary Creatine as a Possible Novel Treatment for Crohn's Ileitis. *ACG Case Rep J*. 2016; 3(1): e173.
46. Saladin Kenneth S. Anatomía y fisiología: la unidad entre forma y función. 6ª ed. México D. F. McGraw-Hill; 2013.
47. Sellers RS, Morton D. The Colon: From Banal to Brilliant. *Toxicol Pathol*. 2014; 42(1): 67-81.
48. Solomon L, Mansor S, Mallon P, Donnelly E, Hoper M, Loughrey M, et al. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. *Comp Clin Pathol*. 2010; 19(3): 235-239.
49. Takahashi M, Kishimoto H, Shirasaka Y, Inoue K. Functional characterization of monocarboxylate transporter 12 (SLC16A12/MCT12) as a facilitative creatine transporter. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2020; 35(3): 281-287.
50. Turer E, McAlpine W, Wang K, Lu T, Li X, Tang M, et al. Creatine maintains intestinal homeostasis and protects against colitis. *Proc Natl Acad Sci*. 2017; 114(7): E1273-E1281.

51. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel J-F. Ulcerative colitis. *Lancet Lond Engl.* 2017; 389(10080): 1756-1770.
52. Vavricka SR, Schoepfer A, Scharl M, Lakatos PL, Navarini A, Rogler G. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2015; 21(8): 1982-1992.
53. Vieira RP, Duarte ACS, Claudino RC, Perini A, Santos ÂBG, Moriya HT, et al. Creatine Supplementation Exacerbates Allergic Lung Inflammation and Airway Remodeling in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007; 37(6): 660-667.
54. Viggiano D, Ianiro G, Vanella G, Bibbò S, Bruno G, Simeone G, Mele G. Gut barrier in health and disease: focus on childhood. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015; 19(6):1077-1085.
55. 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(5): 1429.
56. Wallimann T, Harris R. Creatine: a miserable life without it. *Amino Acids.* 2016; 48(8): 1739-1750.
57. Wallimann T, Riek U, Möddel M. Intradialytic creatine supplementation: A scientific rationale for improving the health and quality of life of dialysis patients. *Med Hypotheses.* 2017; 99: 1-14.
58. Williams JM, Duckworth CA, Vowell K, Burkitt MD, Pritchard DM. Intestinal Preparation Techniques for Histological Analysis in the Mouse. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2016; 6(2): 148-168.
59. Xiao Y-T, Yan W-H, Cao Y, Yan J-K, Cai W. Neutralization of IL-6 and TNF- α ameliorates intestinal permeability in DSS-induced colitis. *Cytokine.* 2016; 83: 189-192.

60. Yamamoto-Furusho JK, Gutiérrez-Grobe Y, López-Gómez JG, Bosques-Padilla F, Rocha-Ramírez JL. Consenso mexicano para el diagnóstico y tratamiento de la colitis ulcerosa crónica idiopática. *Rev Gastroenterol México*. 2018; 83(2): 144-167.
61. Yan Y, Shao M, Qi Q, Xu Y, Yang X, Zhu F, et al. Artemisinin analogue SM934 ameliorates DSS-induced mouse ulcerative colitis via suppressing neutrophils and macrophages. *Acta Pharmacol Sin*. 2018; 39(10): 1633-1644.
62. Yeshi K, Ruscher R, Hunter L, Daly NL, Loukas A, Wangchuk P. Revisiting Inflammatory Bowel Disease: Pathology, Treatments, Challenges and Emerging Therapeutics Including Drug Leads from Natural Products. *J Clin Med*. 2020; 9(5): 1273.
63. You Y, Fu J-J, Meng J, Huang G-D, Liu Y-H. Effect of N-acetylcysteine on the Murine Model of Colitis Induced by Dextran Sodium Sulfate Through Up-Regulating PON1 Activity. *Dig Dis Sci*. 2009; 54(8): 1643-1650.