INTERACCIÓN CEREBRO-INTESTINO EN ICTUS: DISFUNCIÓN DE BARRERA INTESTINAL Y RESPUESTAS INMUNES COMO DIANAS TERAPÉUTICAS

Dra. Anna M. Planas Obradors
Institut Investigacions Biomèdiques de Barcelona - IIBB CSIC
Dr. Xabier Urra Nuin
Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer, Hospital Clínic - IDIBAPS
Dr. David Sancho Madrid
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III - CNIC Madrid

1. Resumen

La lesión cerebral aguda inducida por el ictus provoca reacciones multisistémicas que alteran la homeostasis fisiológica. Por lo tanto, lejos de limitarse al cerebro, el ictus provoca alteraciones del sistema inmunitario e inmunodepresión que facilitan la infección posterior al ictus. La infección es una complicación frecuente que puede aumentar el riesgo de muerte de los pacientes con ictus. Varias líneas de evidencia sugieren que la infección posterior al ictus está causada por bacterias comensales tras la translocación desde el intestino hasta las vías respiratorias o urinarias. El intestino y el cerebro están interconectados a través del eje intestino-cerebro, que comprende señales cruzadas derivadas de la microbiota intestinal que afectan a la función cerebral, y a través del control neural de la función intestinal por el sistema nervioso autónomo. El objetivo de este proyecto es subrayar los mecanismos que subyacen a la infección tras un ictus, centrándose en el intestino como fuente putativa de bacterias oportunistas que infectan a los pacientes con ictus graves. El estudio de la infección postictus generó resultados recogidos en un manuscrito que está actualmente en preparación, como se describe a continuación. Junto con este estudio, investigamos las alteraciones inmunológicas inducidas por el ictus que implican el tráfico de células inmunitarias desde la periferia hasta el tejido cerebral dañado, y el nexo de estas células con las respuestas inmunitarias en el intestino. Para ello, nos centramos en las células dendríticas (DCs) por su capacidad de percibir las señales de peligro generadas por el daño tisular y los agentes infecciosos, y su capacidad de migrar desde los órganos periféricos hasta la lesión cerebral del ictus. En conjunto, estos estudios han contribuido a tres manuscritos en los que se agradece el apoyo de la Fundació La Marató de TV3 (Del Fresno *et al.*, 2018; Martínez-López *et al.*, 2019; Gallizioli *et al.*, 2020).

La lesión cerebral aguda provoca la infiltración de leucocitos y varias líneas de evidencia apoyan que algunas de estas células migran al cerebro desde el intestino, que es un reservorio para ciertos linfocitos y células dendríticas (DCs). Las DCs pueden detectar la presencia de bacterias intestinales a través de receptores de reconocimiento de patrones. Hallamos que las DCs migran al tejido cerebral dañado y ejercen funciones diferentes a las de la microglía residente. De hecho, en comparación con la microglía, las DCs infiltrantes están enriquecidas en receptores de reconocimiento de patrones de la familia de lectinas de tipo C, como la lectina de tipo C inducible en

macrófagos (Mincle; Clec4e) y el receptor-1 del grupo de lectinas de las células dendríticas y NKs (DNGR-1; Clec9a). Identificamos diferentes subtipos de DCs que se infiltran en el cerebro después del ictus, las señales implicadas en la quimioatracción, y encontramos que el subtipo convencional cDC1 era beneficioso en el ictus (Gallizioli *et al.*, 2020). Las células cDC1 están equipadas con DNGR y nuestros estudios mostraron que este receptor de detección de daños es capaz de limitar la lesión tisular, ya sea causada por la infección o en condiciones estériles, al amortiguar el reclutamiento de neutrófilos (Del Fresno *et al.*, 2018). En cambio, en un estudio anterior encontramos que el subtipo cDC2 era perjudicial al desencadenar la producción de IL-17 en el cerebro. De forma independiente, identificamos el eje Mincle-cadena FcRg-Syk como impulsor de la diferenciación Th17 en respuesta a las bacterias intestinales. Las bacterias que se unen a Mincle estaban enriquecidas en la mucosa del intestino delgado del ratón. Además, Mincle desempeñó un papel fundamental en la expresión de moléculas antimicrobianas como RegIIIg y la secreción de IgA. De acuerdo con estos hallazgos, los ratones deficientes en Mincle mostraron translocación microbiana al hígado (Martínez-López *et al.*, 2019). La translocación microbiana desde el intestino podría ser causante de la infección posterior al ictus. En nuestro estudio (manuscrito en preparación), el ictus experimental provocó la colonización de órganos por microbios comensales típicos del intestino en lugar de patógenos externos, lo que sugiere la translocación de bacterias desde el intestino. Encontramos alteraciones metabólicas inducidas por el ictus en el hígado y el intestino que pueden debilitar la función de la barrera intestinal y detectamos signos de alteraciones de la barrera intestinal. Descubrimos que el ictus inducía disbiosis en ratones y pacientes con ictus, e investigamos los mecanismos subyacentes y la relación entre la disbiosis intestinal y la infección posterior al ictus.

2. Resultados

El sistema inmunitario se encuentra en la encrucijada de la relación entre el intestino y el cerebro, y tiene un papel destacado después de la lesión cerebral. Las células inmunitarias se infiltran en el cerebro desde la periferia y varias líneas de evidencia apoyan el tráfico de linfocitos y células dendríticas (DCs) desde el intestino hasta el cerebro después del ictus. Estudiamos la dinámica y las funciones de las DCs que se infiltran en el cerebro tras el ictus y su participación en la regulación de la inflamación

y las respuestas inmunitarias. Reportamos que, tras la isquemia cerebral, la microglía atrae a las DCs al cerebro inflamado, y la astroglía produce el ligando Flt3, que apoya el desarrollo y la expansión de las células CD11c+. Las células CD11c+ en el cerebro inflamado son una población compleja derivada de la microglía en proliferación y de las DCs infiltradas, incluido un subtipo importante de cDC2 convencionales OX40L+, y también cDC1, plasmacitoides y DCs derivadas de monocitos. A pesar de compartir ciertas características y marcadores morfológicos, la microglía CD11c+ y las DCs muestran una expresión diferencial de receptores de reconocimiento de patrones y receptores de quimioquinas. En particular, las DCs infiltrantes están enriquecidas en receptores de reconocimiento de patrones de la familia de las lectinas de tipo C, como Mincle (Clec4e) y DNGR-1 (Clec9a), y las DCs superan a la microglía en la capacidad de presentar antígenos a través de MHCI y MHCII. Cabe destacar que las cDC1 protegen de las lesiones cerebrales tras la isquemia cerebral (Gallizioli *et al.*, 2020).

Las cDC1 expresan DNGR-1, codificado por el gen Clec9a, que detecta el daño tisular y favorece la presentación cruzada de material de células muertas a las células T CD8+. Descubrimos que el DNGR-1 media la reducción de las respuestas inflamatorias dañinas inducidas por lesiones tisulares estériles e infecciosas en ratones. La deficiencia de DNGR-1 deriva en un daño tisular inflamatorio exacerbado en diferentes órganos y condiciones perjudiciales. Este efecto es independiente de las células B y T y es atribuible al aumento de la neutrofilia en los ratones deficientes en DNGR-1.

Mecánicamente, la acción de DNGR-1 activa el SHP-1 e inhibe la producción de MIP-2 (codificado por Cxcl2) por parte de las cDC1. Este efecto limita la quimioatracción y el reclutamiento de neutrófilos en el lugar de la lesión y promueve la tolerancia a la enfermedad. Por lo tanto, la detección de lesiones mediada por DNGR-1 por parte de las cDC1 sirve como reóstato para el control del daño tisular, la inmunidad innata y la inmunopatología (Del Fresno *et al.*, 2018).

Por el contrario, en un estudio anterior demostramos que las cDC2 desempeñaban efectos perjudiciales en la isquemia cerebral al promover la generación de interleucina-17 (IL-17) en el cerebro (Gelderblom *et al.*, 2018, doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019101). En estudios independientes encontramos que la producción de IL-17 en el intestino en respuesta a la microbiota intestinal asegura el mantenimiento de la función de barrera intestinal y evita la translocación bacteriana.

Estos resultados destacan el equilibrio crítico entre el efecto perjudicial de las respuestas inflamatorias/inmunes excesivas para la lesión cerebral y el importante papel de estas respuestas en el intestino para prevenir la translocación bacteriana y reducir el riesgo de infección. En consecuencia, aunque las intervenciones antiinflamatorias pueden ser protectoras para la lesión cerebral del ictus, pueden aumentar el riesgo de que los pacientes con ictus desarrollen infecciones potencialmente mortales. En el intestino, descubrimos que el mecanismo que subyace a la producción de IL-17 y otras citocinas dependientes de la microbiota comensal por parte de las células T CD4+ implicaba una vía de señalización reguladora acoplada a la Syk-cinasa en las DCs. En las placas de Peyer (PP), el receptor de lectina de tipo C acoplado a Syk, Mincle, detectó los microbios comensales residentes en la mucosa, desencadenó la expresión de IL-6 e IL-23p19 y, por lo tanto, reguló la función de los linfocitos innatos intestinales secretores de IL-17 y las células Th17. Los ratones con deficiencia de Mincle o con depleción selectiva de Syk en las células CD11c+ presentaban una producción deteriorada de RegIIIg e IgA intestinales y una mayor translocación sistémica de la microbiota intestinal. En consecuencia, la deficiencia de Mincle derivó en la inflamación del hígado y la desregulación del metabolismo de los lípidos. Por tanto, la detección de la microbiota comensal por parte de Mincle y la señalización de Syk en las células CD11c+ refuerza la barrera inmunitaria intestinal y promueve el mutualismo huésped-microbiota, de modo que evita la inflamación sistémica (Martínez-López et al, 2019). La reacción inflamatoria mediada por DCs y necesaria para combatir la translocación de las bacterias a través del epitelio intestinal podría, a su vez, ser localmente perjudicial en el cerebro al aumentar la inflamación y exacerbar la lesión del ictus. Aunque se espera que la deficiencia de Mincle aumente el riesgo de infección tras el ictus y fue un objetivo inicial en nuestros estudios, una publicación mostró que la deficiencia de Mincle era protectora en la isquemia cerebral, posiblemente debido a la reducción de la producción de IL-17 en el cerebro, así como a la expresión de Mincle en células cerebrales distintas de las DCs (Arumugam *et al.*, 2017; doi: 10.1177/0271678X16661201).

Es probable que las bacterias oportunistas de la microbiota comensal estén implicadas en la infección posterior al ictus. Además, varias líneas de evidencia sugieren que la infección postictus se produce tras la disbiosis intestinal y la translocación bacteriana desde el intestino hasta los pulmones u otros órganos. La infección posterior al ictus está asociada con la inmunodepresión, como lo demuestra la linfopenia, entre otras

manifestaciones. El objetivo de este estudio es identificar los mecanismos subyacentes a la infección tras el ictus y su relación con los cambios en la microbiota intestinal, estudiando las alteraciones inmunológicas, moleculares, fisiológicas, metabólicas y microbiológicas inducidas por el ictus, y combinando estudios en animales con estudios en pacientes con ictus. La oclusión transitoria de la arteria cerebral media en ratones facilitó el sobrecrecimiento bacteriano en varios órganos, como los pulmones, el hígado, el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos (mLN). Para investigar si las bacterias intestinales se translocan desde el intestino hasta diferentes órganos, generamos ratones con *Escherichia coli* quimioluminiscente en el intestino que podía visualizarse con imágenes de bioluminiscencia. Investigamos las posibles alteraciones de la permeabilidad de la barrera intestinal estudiando la permeabilidad a los trazadores fluorescentes administrados por sonda, las propiedades de la capa epitelial intestinal en preparaciones aisladas *ex vivo* y los niveles de IgA en el lavado intestinal de los ratones isquémicos frente a los operados de forma simulada o a los de control. Estudiamos las reacciones inflamatorias en el intestino investigando las poblaciones de linfocitos en diferentes partes del intestino, como las PP, los linfocitos intraepiteliales, la lámina propia y el mLN, así como la expresión de ARNm de moléculas inflamatorias en el intestino delgado. Dado que el estado inflamatorio del intestino está regulado por productos metabólicos generados tanto por la microbiota como por el huésped, estudiamos las principales vías metabólicas en ratones isquémicos frente a ratones operados de forma simulada y de control. Las alteraciones metabólicas que encontramos apuntaban a cambios inducidos por el ictus en la composición de la microbiota intestinal. Para evaluar la presencia bacteriana en las heces y el ciego, primero investigamos los cambios en grupos bacterianos bien caracterizados mediante el estudio del gen que codifica el ARN ribosomal 16S por RT-PCR cuantitativa. Estos grupos incluían lactobacilo, Akkermansia, Bacteroidetes, Cluster IV, Cluster XIVa, bifidobacterias y enterobacterias. Aunque los niveles de algunas de estas bacterias cambiaron ligeramente de un experimento a otro, encontramos cambios robustos inducidos por la isquemia que detectamos de forma consistente en cinco experimentos independientes. Validamos los resultados en ratones obtenidos de diferentes proveedores comerciales para asegurarnos de que este efecto no dependía de las condiciones específicas de cría de los ratones. La metataxonomía mediante la secuenciación del gen 16S rRNA en las heces obtenidas antes y después de la isquemia, o antes y después de la operación simulada, confirmó los resultados. Paralelamente a los estudios sobre los cambios inducidos por la isquemia en la

composición de la microbiota intestinal en ratones, llevamos a cabo un estudio en humanos en el que realizamos un estudio del curso temporal y comprobamos si las diferentes poblaciones de la microbiota intestinal podían estar relacionadas con el resultado del ictus. Extrajimos ADN de muestras de heces de pacientes con ictus y secuenciamos la región V3-V4 del gen 16S rRNA utilizando la plataforma Illumina MiSeq. El estudio del curso temporal en pacientes con ictus mostró resultados que concuerdan con los estudios experimentales. Además, el análisis de las variables clínicas y microbiológicas independientes mediante la regresión Lasso reveló una relación entre la composición de la microbiota y el resultado del ictus a los 3 meses, evaluado con la puntuación Rankin modificada. Por lo tanto, los resultados en pacientes con ictus apoyan que el ictus induce un desequilibrio en la composición de la microbiota intestinal asociado con el resultado funcional del ictus.

Diseñamos estrategias experimentales para prevenir las alteraciones de la microbiota inducidas por el ictus, explorando el papel del sistema nervioso simpático y del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), entre otros. Uno de los tratamientos impidió ciertos cambios en la composición de la microbiota y permitió investigar la relación entre la desregulación de la composición de la microbiota y la infección posterior al ictus en ratones.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Las infecciones en los pacientes con ictus son complicaciones frecuentes que ponen en peligro su vida. La comprensión de la biología subyacente a la infección tras el ictus ayudará a diseñar estrategias adecuadas de tratamiento y prevención. Son necesarios nuevos tratamientos, ya que la profilaxis con antibióticos es ineficaz en los pacientes con ictus, probablemente porque las bacterias comensales oportunistas suelen ser portadoras de resistencias a los antibióticos. Nuestro estudio identificó las bacterias comunes implicadas en la infección posterior al ictus y la disbiosis intestinal en ratones y pacientes con ictus, y su relación con las alteraciones metabólicas e inmunológicas. Además, identificamos mecanismos moleculares e inmunitarios en el intestino que son cruciales para evitar la translocación bacteriana intestinal en condiciones fisiológicas. Por otra parte, nuestros estudios ilustran el papel opuesto de ciertos receptores de reconocimiento de patrones en los subtipos de células dendríticas debido a la

generación de reacciones inflamatorias que son críticas para prevenir la translocación bacteriana intestinal, mientras que pueden desencadenar una inflamación local excesiva perjudicial para el tejido cerebral isquémico. Esperamos que estos resultados favorezcan el desarrollo de estrategias novedosas para prevenir la infección tras el ictus y al mismo tiempo evitar un exceso de inflamación cerebral.

4. Bibliografía científica generada

Del Fresno C, Saz-Leal P, Enamorado M, Wculek SK, Martínez-Cano S, Blanco-Menéndez N, Schulz O, Gallizioli M, Miró-Mur F, Cano E, Planas A, Sancho D. *DNGR-1 in dendritic cells limits tissue damage by dampening neutrophil recruitment*. Science. 2018 Oct 19;362(6412):351-356. doi: 10.1126/science.aan8423. PMID: 30337411.

Gallizioli M, Miró-Mur F, Otxoa-de-Amezaga A, Cugota R, Salas-Perdomo A, Justicia C, Brait VH, Ruiz-Jaén F, Arbaizar-Rovirosa M, Pedragosa J, Bonfill-Teixidor E, Gelderblom M, Magnus T, Cano E, Del Fresno C, Sancho D, Planas AM. *Dendritic Cells and Microglia Have Non-redundant Functions in the Inflamed Brain with Protective Effects of Type 1 cDCs*. Cell Rep. 2020 Oct 20;33(3):108291. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108291.

Martínez-López M, Iborra S, Conde-Garrosa R, Mastrangelo A, Danne C, Mann ER, Reid DM, Gaboriau-Routhiau V, Chaparro M, Lorenzo MP, Minnerup L, Saz-Leal P, Slack E, Kemp B, Gisbert JP, Dzionek A, Robinson MJ, Rupérez FJ, Cerf-Bensussan N, Brown GD, Bernardo D, LeibundGut-Landmann S, Sancho D. *Microbiota Sensing by Mincle-Syk Axis in Dendritic Cells Regulates Interleukin-17 and -22 Production and Promotes Intestinal Barrier Integrity*. Immunity. 2019 Feb 19;50(2):446-461.e9. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.020.

En preparación

Díaz-Marugán L, Gallizioli M, Márquez-Kisinousky L, Miró-Mur F, Arboleya S, Mastrangelo A, Casals C, Ramos S, Trasserra-Call, Ruiz-Jaén F, Gueimonde M, Torres JL, Jiménez M, González de los Reyes-Gavilán C, Sancho D, Urra X, Planas AM. *Relationship between gut dysbiosis and stroke-associated infection*.