



UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

# Eje cerebro-intestino en el ictus: estudio de la respuesta inmune, microbiota y barrera intestinal

Laura Díaz Marugán



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



*Eje cerebro-intestino en el ictus: estudio de la respuesta inmune, microbiota y barrera intestinal*



Laura Díaz  
 Doctorado en Biomedicina  
 Universitat de Barcelon



*Eje cerebro-intestino en el ictus: estudio de la respuesta inmune, microbiota y barrera intestinal*

Laura Díaz

Doctorado en Biomedicina

Universitat de Barcelona



**TESIS DOCTORAL:** *Eje cerebro-intestino en el ictus: estudio de la respuesta inmune, microbiota y barrera intestinal.*

Tesis doctoral presentada por Laura Díaz Marugán para optar al grado de doctora en Biomedicina, dentro del programa de Doctorado en Biomedicina de la Universitat de Barcelona. Este trabajo ha sido realizado en el Centre de Recerca Biomèdica CELLEX, del Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB-CSIC). Esta investigación ha sido financiada por la Marató de TV3 (referencia 201723-30) y ha contado con el apoyo de una beca de la Fundació Bancaria "la Caixa" (ID 100010434), cuyo código es LCF/BQ/DE16/11570021.

Directores de tesis

Tutor

Anna M. Planas Obradors

Francesc Miró-Mur

Carles Enrich Bastús

La interesada:

Laura Díaz Marugán

Barcelona, marzo 2020





*La tesis empieza en la página 3*

*-Laura Díaz-*



## AGRADECIMIENTOS

A ti, que has venido, deseoso, a leer la parte de agradecimientos, te advierto de que no voy a seguir con el protocolo y de que van a ser unos agradecimientos largos, de esos de los que precisamente siempre he pensado: “¿pero en serio tantas páginas?, ¿de verdad necesita soltar todo eso por aquí?”. Ejem. Qué bonito es cuando se cambian las tornas.

En primer lugar, quiero darme las gracias a mí misma (como cuando le das a “me gusta” a tu propia publicación en RRSS) por todo el esfuerzo, físico y mental, perseverancia, búsqueda, y resistencia que he puesto en esta tesis. Debería decírmelo más a menudo: qué orgullosa estoy de mí misma.

Gracias a mis primeros directores de tesis. He aprendido lo que no debe ser un director de tesis.

Gracias a mi actual directora de tesis, Anna, por aceptarme en tu grupo de investigación en un momento que fue crítico en mi carrera profesional. Gracias por romper el techo de cristal en este ámbito donde los altos cargos están monopolizados por figuras masculinas, y por ser ejemplo de perseverancia investigadora.

Gracias a mi codirector actual de tesis, Francesc, por hacerme cómplice de tu conocimiento. Las oportunidades de discutir contigo sobre ciencia, tanto a nivel técnico como sobre el sistema que envuelve el ámbito académico, han sido uno de los mejores aspectos de mi tesis. Es excepcional encontrar personas del ámbito científico dispuestos a escuchar e integrar nuevos aspectos relacionados con la ciencia y que van más allá de la investigación. De verdad, gracias.

Gracias a los investigadores Josep Lluís Torres, Sara Ramos, Marcel Jiménez, Sara Traserra, y Patrocinio Vergara, por agilizar las colaboraciones, ceder los espacios y sobre todo, por el tiempo que habéis invertido en ayudarme con esta investigación y por vuestros conocimientos para hacerlo de la mejor manera posible.

Gracias amor, Nico, por ser una figura esencial de apoyo, comprendiendo y animándome en mi carrera laboral (y en infinitos aspectos más), aún con los sacrificios que ello ha supuesto. Todo lo que me gustaría decirte es demasiado y aquí no tengo suficiente espacio. Luego te lo explico.

Gracias mamá, no solo por tu apoyo en mi tesis, sino porque siempre has sido mi fan nº 1 haciendo tus mayores esfuerzos por seguir todos mis avances en el ámbito de la investigación; aunque no siempre ha sido fácil explicar qué hago en el laboratorio, has compartido todos mis logros. Gracias por estar a mi lado. ¡Ojalá papá pudiera leer esto! Sé que, como mínimo, estaría tan orgulloso como tú.

Gracias Sandri, mi querida amiga. Has vivido mis méritos y frustraciones como si fueran también tuyos, y hasta hemos ido de la mano en más de una parte del proceso (¡casi parece que lo hubiéramos planeado!). Gracias por todas las veces que me has dicho las cosas que no quería oír y todas las veces

que te he dicho que no podía a algo por la tesis, y aun así lo has hecho fácil. Qué difícil es encontrar personas tan completas como tú.

Gracias a mi psicoterapeuta, Elena Zapatero. Me has enseñado la gestión emocional, y eso es de lo más poderoso que puedo decir. En momentos en los que pensaba que no podía más, tú me has ayudado a darle nombre y usar las herramientas que tenía en mi mente. Siempre lo digo, tu trabajo ha sido la mejor inversión en mi vida.

Gracias a mi asociación, Scientists Dating Forum, a través de la cual he podido hablar abiertamente de la salud mental, especialmente durante el doctorado (<https://bit.ly/2T5bDs7>). La ansiedad y depresión no son historias ni exageraciones, ni se solucionan con un desafortunado “¡debes relajarte, no te preocupes!”. Los doctorandos tienen hasta seis veces más riesgo de desarrollo de depresión que la población general (Evans, M. *et al*, 2018)\* y esto debería ser suficiente para indicarnos que hay algo que no está bien en la Academia. Visibilizar la enfermedad y asumir que hay que reformar muchos aspectos académicos, sin sentir nuestro orgullo dañado, es un buen inicio para empezar a romper con esta situación viciosa que solo genera investigadores frustrados y decepcionados, con el consecuente detrimento de la calidad científica.

Vittoria, amiga, has sido mi compañera de crucero y en más de una ocasión, el salvavidas que había a bordo. Por este tiempo juntas y los que nos queda, gracias.

Fátima, mi estimada profesora, gracias por tu ayuda. Sé que estás leyendo esto porque me estás corrigiendo los errores ortográficos y de puntuación de forma desinteresada, y porque me quieres y como mínimo leerás los agradecimientos. Si, a día de hoy, puedo dar monólogos científicos, que no se te olvide que el origen fueron tus clases. Gracias por ser mi maestra, mi mentora y mi amiga. Y Paloma, deberías saber que parte de la culpa de que esté escribiendo estas palabras en este libro la tienes tú y tus clases de Biología durante mi adolescencia. Una vez más, gracias por tus siempre acertadas palabras llenas de cariño y comprensión.

Mis amigos de la Caixa, sois lo mejor que me ha dado esta beca. Nunca pensé que sería posible reunir en un mismo espacio a tantas mentes sobresalientes, pero sobre todo, a tantos buenos corazones. Siempre he esperado con ilusión nuestros encuentros, en los que la seriedad quedaba diluida en un entorno concentrado de altas dosis de humor. Gracias, especialmente a Luis, Alberto y Ander, por compartir de forma tan cercana mis inquietudes.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Mattia, Leo y Paqui. Gracias Mattia por haber sido como un guía académico (ahora estarás poniendo cara de desaprobación porque no te gusta que te digan estas cosas y creerás que exagero) y facilitarme el camino en el laberinto del laboratorio (más figurativo que literal). Ya sabes de sobra lo mucho que te admiro. Gracias Paqui y Leo, por ser las cuatro manos extra que necesitaba y por darme vuestra ayuda en tantas ocasiones.

Montserrat Batlle, ya lo sabes: los mentores son personas que nos inspiran, nos guían y nos animan a ser mejores y tú, desde el primer día, no has dejado de hacerlo conmigo. Gracias por guiarme y enseñarme durante esta etapa de doctorado.

Y un último gracias a Alexandra Elbakyan. Tu labor ha contribuido a la diseminación y accesibilidad del conocimiento, especialmente para la comunidad investigadora. No vas a leer nunca mi tesis, pero quería dejar por escrito que eres un icono de la valentía y la decisión.

Y sin más dilación, ¡espero que disfrutes de esta ligera lectura!

---

\*Evans, T., Bira, L., Gastelum, J. et al. Evidence for a mental health crisis in graduate education. *Nat Biotechnol.* 36, 282–284 (2018). <https://doi.org/10.1038/nbt.4089>



## ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	5
<b>1. El ictus: repercusión social y tipos</b> .....	7
<b>2. Modelos experimentales de ictus</b> .....	8
<b>3. Animales <i>sham</i> y anestesia</b> .....	11
<b>4. Síndrome de inmunodepresión asociado al ictus, infección y sistema nervioso autónomo</b> 12	
<b>5. Efecto de los agentes <math>\beta</math>-bloqueantes en la infección post-ictus y la lesión cerebral</b> .....	13
<b>6. Relación cerebro-intestino en el ictus</b> .....	14
6.1 <i>Sistema nervioso intestinal</i> .....	14
6.2 <i>Primera barrera intestinal: estructura, transporte y permeabilidad intestinal</i> .....	15
6.3 <i>Segunda barrera intestinal: el moco intestinal</i> .....	19
6.4 <i>Tercera barrera intestinal: sistema inmune intestinal</i> .....	19
6.5 <i>¿Cuál es la relación entre el ictus y la microbiota intestinal?</i> .....	22
<b>7. El papel de los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) en la isquemia</b> .....	27
<b>8. Mecanismos de comunicación bacteria-hospedador: el sistema QseCB y su potencialidad en el ictus</b> .....	27
<b>9. Mensaje clave</b> .....	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS .....	35
<b>1. Animales, modelo de isquemia y valoración neurológica</b> .....	37
1.1 <i>Animales</i> .....	37
1.2 <i>Modelo de oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAo, transient middle cerebral artery occlusion)</i> .....	37
1.3 <i>Modelo “tMCAo dormido”</i> .....	39
1.4 <i>Modelo “tMCAo despierto”</i> .....	40
1.5 <i>Valoración neurológica</i> .....	40
<b>2. Evaluación del volumen de infarto cerebral</b> .....	41

<b>3. Citometría de flujo</b> .....	42
3.1 Obtención de células de la lámina propia (LP) y linfocitos intraepiteliales (IELs) .....	42
3.2 Obtención de células de las placas de Peyer y de los ganglios mesentéricos .....	44
3.3 Marcaje de superficie .....	44
3.4 Marcaje intracelular .....	44
3.5 Confirmación del correcto aislamiento de las regiones intestinales .....	45
3.6 Estrategia de análisis de datos de citometría de flujo (gating) y análisis por t-SNE .....	46
<b>4. Tratamientos con fármacos</b> .....	48
4.1 Tratamiento con propranolol .....	48
4.2 Tratamiento con LED 209 .....	49
<b>5. Crecimiento de bacterias en placas de agar</b> .....	50
<b>6. Detección de poblaciones bacterianas en heces y en ciego</b> .....	51
<b>7. Detección de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)</b> .....	51
<b>8. Detección de <i>E.coli</i> bioluminiscente</b> .....	51
<b>9. Metodologías para el estudio de la permeabilidad intestinal</b> .....	52
9.1 Permeabilidad intestinal <i>in vivo</i> .....	53
9.2 Medición de parámetros eléctricos y permeabilidad intestinal <i>ex vivo</i> : cámara de Ussing .....	54
9.2.1 Conceptos básicos de la cámara de Ussing .....	54
9.2.2 Disección del tejido y montaje en las cámaras .....	56
9.2.3 Adición de la sonda fluorescente .....	58
<b>10. Análisis estadísticos</b> .....	58
RESULTADOS .....	59
<b>Introducción a la sección de resultados</b> .....	61
RESULTADOS. CAPÍTULO I: efecto de la isquemia en las poblaciones celulares del sistema inmune intestinal .....	63
<b>1.1 Distribución de leucocitos del sistema inmune intestinal por regiones</b> .....	65
<b>1.2 Efecto de la anestesia sobre las poblaciones linfocitarias intestinales</b> .....	67
<b>1.3 Adecuación del modelo experimental para minimizar el efecto de la anestesia</b> .....	70
<b>1.4 Poblaciones intestinales de linfocitos T y B y su estado funcional</b> .....	73

1.5 Efecto del tratamiento con propranolol.....	76
1.6 Resumen de resultados del capítulo I .....	78
RESULTADOS. CAPÍTULO II: efecto de la isquemia en la microbiota intestinal.....	81
2.1 Efecto de la anestesia sobre las poblaciones bacterianas y la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs).....	83
2.2 Cambios en las poblaciones bacterianas y SCFAs en heces y en ciego después del ictus ...	87
2.3 Efecto del propranolol sobre las poblaciones bacterianas y la producción de SCFAs .....	90
2.4 Efecto del tratamiento con el fármaco LED209, bloqueante del receptor bacteriano QseC .....	93
2.5 Resumen de resultados del capítulo II.....	96
RESULTADOS. CAPÍTULO III: translocación bacteriana después de la isquemia cerebral.....	99
3.1 Estudio de la translocación bacteriana mediante cultivos en placas .....	101
3.1.1 Efecto del tratamiento con propranolol .....	101
3.1.2 Efecto del tratamiento con LED209 .....	103
3.2 Estudio de la translocación bacteriana mediante bacterias bioluminiscentes .....	107
3.3 Resumen de resultados del capítulo III.....	109
RESULTADOS. CAPÍTULO IV: disfunción intestinal después de la isquemia cerebral.....	111
4.1 Estudio <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> de la permeabilidad de la barrera intestinal después del ictus..	113
4.2 Efecto de la isquemia en la motilidad intestinal .....	115
4.3 Cambios electrofisiológicos en el intestino delgado después de la isquemia.....	116
4.4 Resumen de resultados del capítulo IV .....	118
RESULTADOS. CAPÍTULO V: modulación de la lesión cerebral mediante tratamiento farmacológico ..	119
5.1 Efecto del propranolol en el volumen de infarto y la afectación neurológica .....	121
5.2 Efecto del fármaco LED209 en el volumen de infarto y la afectación neurológica .....	121
5.3 Resumen de resultados del capítulo V .....	122
DISCUSIÓN .....	123
1. Sobre el efecto de la anestesia en las poblaciones del sistema inmune intestinal .....	125
2. Sobre los cambios en las poblaciones de células del sistema inmune intestinal.....	126
3. Sobre los cambios en las poblaciones bacterianas y los SCFAs.....	127

<b>4. Detección de CFUs, infección y efectos de los fármacos</b> .....	128
4.1 <i>Sobre el efecto del propranolol</i> .....	130
4.2 <i>Sobre el fármaco LED209</i> .....	130
<b>5. Sobre las bacterias bioluminiscentes</b> .....	132
<b>6. Sobre la permeabilidad de la barrera intestinal</b> .....	132
<b>7. Sobre la motilidad intestinal</b> .....	134
<b>8. Sobre la corriente iónica y la afectación neurológica</b> .....	135
<b>9. Sobre el efecto de los fármacos en el volumen de la lesión</b> .....	135
9.1 <i>Sobre el efecto del propranolol, el volumen de infarto y la respuesta inmune</i> .....	135
9.2 <i>Sobre el efecto del LED209</i> .....	136
<b>10. Resumen/modelo</b> .....	136
CONCLUSIONES.....	141
BIBLIOGRAFÍA.....	145
ANEXOS I (REACTIVOS) y II (ANTICUERPOS).....	161

## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

Figura 1. Modelos de isquemia en animales .....	9
Figura 2. Esquema de la aproximación quirúrgica del modelo de isquemia focal intraluminal. ....	10
Figura 3. Estructura del sistema nervioso entérico. ....	15
Figura 4. Proteínas de unión entre células intestinales. ....	17
Figura 5. Complicaciones de la permeabilidad intestinal.....	18
Figura 6. Compartimentalización del sistema inmune intestinal.....	20
Figura 7. Ilustración de los diferentes componentes de la relación cerebro y microbiota intestinal en respuesta al ictus.....	25
Figura 8. Estructura y funcionamiento del QseCB.....	29

### MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 9. Esquema de la oclusión de la arteria cerebral media a través del modelo intraluminal .....	38
Figura 10. Lonchas de cerebros teñidas con TTC. ....	41
Figura 11. Esquema de la obtención de células de las diferentes regiones intestinales para su análisis por citometría de flujo.....	43
Figura 12. Marcadores utilizados para la verificación de las regiones intestinales. ....	46
Figura 13. Estrategia de <i>gating</i> para la identificación de los diferentes tipos de leucocitos y su activación funcional. ....	47
Figura 14. Esquema del procedimiento experimental para el tratamiento con propranolol.....	49
Figura 15. Esquema del procedimiento experimental para el tratamiento con LED209.....	50
Figura 16. Estructura de la cámara de Ussing.....	54
Figura 17. Sistema de medición para el procedimiento de la cámara de Ussing. ....	55
Figura 18. Disección del tejido intestinal. ....	57

### RESULTADOS

Figura 19. Distribución de las diferentes poblaciones de células linfoides en ganglios mesentéricos (mLN), placas de Peyer (PPs), linfocitos intraepiteliales (IELs) y lámina propia (LP). ....	66
Figura 20. En el modelo tMCAo dormido el ictus no produce cambios en el número total de leucocitos en PP, mLN y LP, pero sí en los IELs.....	68
Figura 21. Efectos de la anestesia en los IELs.....	69
Figura 22. La disminución de la anestesia revierte la linfopenia observada en el modelo dormido en los IELs.....	71
Figura 23. Correlación entre el volumen de infarto y los linfocitos detectados en sangre en animales isquémicos del modelo tMCAo despierto.....	71

Figura 24. El cambio de modelo tMCAo dormido ( <i>long anesthesia</i> ) al modelo tMCAo despierto ( <i>short anesthesia</i> ) no afecta al volumen de infarto, <i>neuroscore</i> , ni al porcentaje de mortalidad post-operatoria. ....	72
Figura 25. La isquemia reduce el número de algunas poblaciones celulares en los mLN. ....	74
Figura 26. La isquemia aumenta el número de células $\gamma\delta$ en los IELs. ....	74
Figura 27. La isquemia aumenta el porcentaje de diferentes células productoras de IFN $\gamma$ en los mLN. ....	75
Figura 28. La producción de IFN $\gamma$ en los mLN depende del volumen de infarto. ....	76
Figura 29. El tratamiento con propranolol previene los cambios inmunes en ganglios mesentéricos. ....	77
Figura 30. El tratamiento con propranolol no previene el aumento de células $\gamma\delta$ en los IELs después de la isquemia. ....	77
Figura 31. El tratamiento con propranolol evita el aumento en el porcentaje de diferentes células productoras de IFN $\gamma$ en los mLN. ....	78
Figura 32. En el modelo tMCAo dormido las poblaciones de <i>Clostridia</i> IV y XIVa aumentan después de la isquemia en muestras de heces. ....	84
Figura 33. En el modelo tMCAo dormido las poblaciones de <i>Clostridia</i> IV y XIVa aumentan en muestras de ciego después de la isquemia. ....	85
Figura 34. En el modelo tMCAo dormido disminuye la concentración de ácido butírico en muestras de heces y ciego. ....	86
Figura 35. La isquemia produce un aumento en la familia de las enterobacterias en las heces. ....	88
Figura 36. La isquemia produce un aumento en la familia de las enterobacterias en el ciego. ....	89
Figura 37. No se observaron diferencias en las concentraciones de los SCFAs en muestras de heces y ciego. ....	90
Figura 38. El propranolol no modifica las poblaciones de bacterias de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> en heces y en ciego. ....	91
Figura 39. El propranolol no modifica las poblaciones bacterianas analizadas en heces y en ciego. ....	92
Figura 40. El propranolol no modifica la producción de SCFAs en heces y en ciego. ....	93
Figura 41. El tratamiento con el fármaco LED209 no previene el aumento de enterobacterias en heces y ciego. ....	94
Figura 42. No hay diferencias entre el tratamiento con LED209 y el vehículo en la producción de SCFAs después de la isquemia en muestras de heces. ....	95
Figura 43. El tratamiento con el fármaco LED209 produce una disminución del ácido acético en muestras ciego. ....	95
Figura 44. Las enterobacterias aumentan después de la isquemia de forma consistente en varios grupos experimentales independientes. ....	96
Figura 45. Crecimiento de bacterias en placas de agar. ....	101

Figura 46 La isquemia produce un aumento de bacterias en los mLN que no es reversible por tratamiento con propranolol.....	102
Figura 47. El volumen de infarto y la afectación neurológica no están correlacionados con el número de CFUs detectadas en cultivos de mLN en animales tratados con vehículo y propranolol. ....	102
Figura 48. El tratamiento con el fármaco LED209 no impide la translocación bacteriana a los mLN, al bazo y al hígado.....	103
Figura 49. No hay correlación entre el número de CFUs y el volumen de infarto ni los animales con más infección presentan mayor volumen de infarto.t.....	105
Figura 50. No hay correlación entre el número de CFUs y el <i>neuroscore</i> , pero los animales con más infección presentan mayor afectación neurológica en bazo e hígado.....	106
Figura 51. Representación por colores de la distribución de cada animal según la infección en hígado y en bazo.....	107
Figura 52. La isquemia induce la translocación bacteriana a pulmones en un 20% de los ratones isquémicos.....	108
Figura 53. La isquemia no produce cambios en la permeabilidad intestinal a las 3 y a las 24 horas post-reperusión medido por extravasación de FITC-dextrano.....	114
Figura 54. La isquemia no afecta a la motilidad intestinal a las 3 y a las 24 horas post-reperusión. ....	115
Figura 55. La isquemia afecta a la corriente de cortocircuito intestinal 3 horas después de la reperusión.....	117
Figura 56. El propranolol disminuye el volumen de la lesión cerebral y mejora la afectación neurológica. ....	121
Figura 57. El fármaco LED209 no afecta al volumen de infarto ni a la respuesta neurológica.....	122
 <b>DISCUSIÓN</b>	
Figura 58. Representación esquemática de los principales resultados de la tesis e interpretación de los mismos.....	139



## LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AI: *autoinducers* (autoinductores)

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

BHI: *brain heart infusión* (infusión cerebro-corazón)

CCA: *common carotid artery* (arteria carótida común)

CFU: *colony forming unit* (unidades formadoras de colonia)

DMSO: dimetil sulfóxido.

ECA: *external carotid artery* (arteria cerebral externa)

ENS: *enteric nervous system* (sistema nervioso entérico)

FBS: *fetal bovine serum* (suero bovino fetal)

FITC: *fluorescein isothiocyanate* (fluoresceína de isotiocianato)

GF: *germ free* (animales libres de gérmenes)

HPA: *hypothalamic-pituitary-adrenal axis* (eje hipotalámico-hipofisario-adrenal)

ICA: *internal carotid artery* (arteria cerebral interna)

IELs: *intraepithelial lymphocytes* (linfocitos intraepiteliales)

IgA: inmunoglobulina A

IL: interleuquina

ILC: *innate lymphoid cells* (células linfoides innatas)

Isc: *short circuit current* (corriente de cortocircuito)

JAM: *junctional adhesion molecule* (molécula de adhesión de uniones)

LB: *lysogeny broth* (caldo de lisogenia)

LP: lamina propia

MCA: *middle cerebral artery* (arteria cerebral media)

tMCAo: *middle cerebral artery occlusion* (oclusión de la arteria cerebral media)

MLCK: *myosin light-chain kinase* (cadena ligera de la miosina quinasa)

mLN: *mesenteric lymph nodes* (ganglios mesentéricos)

NF $\kappa$ B: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)

NK: *natural killer* (células asesinas naturales)

PBS: *phosphate buffered saline* (tampón fosfato salino)

PCA: *posterior communicating artery* (arteria comunicante posterior)

PEG: polietilenglicol

PPA: *pterygopalatine artery* (arteria pterigopalatina)

qPCR: *quantitative polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)

SCFAs: *short chain fatty acids* (ácidos grasos de cadena corta)

SNE: sistema nervioso entérico

SNS: *sympathetic nervous system* (sistema nervioso simpático)

SPF: *specific pathogen free* (ratones libres de patógenos específicos)

STA: *superior thyroid artery* (arteria tiroidea superior)

TCR: *T cell receptor* (receptor de células T)

Th: *T helper* (linfocitos T colaboradores)

TLR: *toll like receptor* (receptor tipo *toll*)

tMCAo: *transient middle cerebral artery occlusion* (isquemia transitoria de la arteria cerebral media)

TNF $\alpha$ : *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (factor  $\alpha$  de necrosis tumoral)

Trm: *tissue resident memory* (linfocitos de memoria residentes en tejido)

ZO: *zonula occludens*

---

## **RESUMEN**

---



El eje cerebro-intestino es una comunicación bidireccional entre ambos órganos que incluye mediadores inmunológicos, nerviosos, endocrinos y respuesta microbiana. Una desregulación de esta comunicación podría estar detrás de enfermedades como la enfermedad de Párkinson, la enfermedad de Alzheimer, la depresión, o incluso el ictus o infarto cerebral. El ictus se produce por la interrupción brusca de la circulación sanguínea en una zona de cerebro, y es la primera causa de muerte en mujeres y primera causa de discapacidad adquirida en adultos. El campo de investigación de la relación cerebro-intestino en el contexto del ictus es reciente, con un aumento de las publicaciones en los últimos cinco años. En estas investigaciones se ha constatado que el ictus es capaz de modificar la composición bacteriana intestinal, que la alteración de la microbiota intestinal mediante intervención externa (como uso de tratamientos antibióticos o trasplantes fecales) puede modular la lesión cerebral vía respuesta inmune y que el ictus actúa sobre la integridad de la barrera intestinal. Dada la corta vida de este campo, quedan varios aspectos que abordar, resolver y aclarar, ya que entre las diferentes investigaciones hay resultados controvertidos y aspectos de la respuesta inmunológica en el intestino que no se conocen. Con el objetivo de esclarecer los efectos del ictus sobre el intestino, en esta tesis doctoral se han utilizado modelos experimentales de isquemia cerebral en ratón y se han analizado los cambios de las poblaciones celulares del sistema inmune después del ictus mediante citometría de flujo. Se ha estudiado el efecto de la isquemia cerebral sobre las poblaciones bacterianas intestinales mediante PCR cuantitativa y sus metabolitos por cromatografía de gases, y la regulación de las mismas mediante tratamientos para el bloqueo de la vía adrenérgica. Además, se ha estudiado la integridad física de la barrera intestinal mediante técnicas de análisis de permeabilidad *in vivo* y *ex vivo*. Los resultados muestran que después del ictus se produce un aumento a nivel de linfocitos intraepiteliales de células  $T\gamma\delta$ , implicadas en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, además de un incremento de la citocina proinflamatoria  $IFN\gamma$  en ganglios mesentéricos, situación que se evita previo tratamiento con el  $\beta$ -bloqueante propranolol. De forma consistente, observamos un aumento de la familia de enterobacterias en muestras de heces y de ciego de los animales que habían sufrido un ictus, además de un aumento de la detección del número de colonias bacterianas en muestras de ganglios mesentéricos, situación no dependiente de la vía adrenérgica. En paralelo a estos resultados de translocación bacteriana, confirmamos presencia de bacterias bioluminiscentes procedentes del tracto intestinal en pulmones de animales isquémicos. Finalmente, también hemos comprobado que la isquemia aumenta la secreción iónica intestinal en tiempos cortos después del ictus, y que además podría producir pequeñas alteraciones de las uniones celulares del epitelio intestinal.

Estos resultados ponen de manifiesto la relación entre el cerebro y el intestino después del ictus y la capacidad de regulación de dicha respuesta mediante tratamiento farmacológico.



---

## **INTRODUCCIÓN**

---



## **1. El ictus: repercusión social y tipos**

El ictus es un accidente cerebrovascular producido por una interrupción brusca de la circulación sanguínea en alguna región del cerebro. Según la Sociedad Española de Neurología (SEN), más de 100.000 personas sufren un ictus en España al año, de las cuales el 50% fallece o queda con secuelas discapacitantes. De hecho, el ictus es la segunda causa de muerte en territorio nacional (la primera en mujeres), la primera causa de invalidez permanente y la segunda de demencia (datos disponibles en <http://www.sen.es>). A ello hay que añadir el impacto socio-económico que produce este tipo de accidentes, ya que el ictus es la primera causa de ingreso hospitalario por enfermedad neurológica, además de la demanda asistencial que requiere, suponiendo un desembolso de entre el 3 al 6 % del gasto total sanitario (Torregrosa *et al.*, 2007; Vega *et al.*, 2009).

Entre los factores de riesgo vascular, la SEN destaca la hipertensión arterial, la diabetes, la hipercolesterolemia, la obesidad y haber padecido un ictus previamente o enfermedades cardíacas. También destacan como factores de riesgo algunos hábitos de vida, como el tabaquismo, el sedentarismo o el consumo de alcohol. Aunque menos documentados, también se están empezando a valorar, como factores de riesgo, las acciones de microorganismos, como las infecciones causadas por *Chlamydia pneumoniae* y *Helicobacter pylori* (Palm, Urbanek y Grau, 2009), reactivación del virus zoster de la varicela (Nagel y Gilden, 2014), y elevada presencia de bacterias patógenas oportunistas en el intestino (Zeng *et al.*, 2019). La edad es otro factor a tener en cuenta, ya que, aunque el ictus puede darse en cualquier etapa, su incidencia aumenta notablemente a partir de los 60 años. Y, si bien la mortalidad y discapacidad por ictus han disminuido en los últimos 20 años en los países de renta elevada gracias a la mejora en el control de los factores de riesgo, la detección precoz de los síntomas y la creación de unidades médicas especializadas en este trastorno, la incidencia del ictus en estos países ha aumentado (Katan y Luft, 2018). También han aumentado globalmente los números absolutos de los casos de ictus y de las muertes asociadas, en parte por el mayor número de casos registrados en países de baja y media renta y por el envejecimiento global de la población (Johnson *et al.*, 2016; Katan y Luft, 2018). Algunas de las soluciones para abordar este problema consisten en instruir a la población sobre los factores de riesgo, el estudio de los mecanismos de acción relativos al daño producido por la lesión y la implementación de nuevos tratamientos.

La mayoría de los casos de ictus cerebrales corresponden a ictus isquémicos, con hasta un 85% de los episodios, mientras que el 15% restante lo completan los ictus hemorrágicos (Torregrosa *et al.*, 2007). Los infartos isquémicos se producen por la oclusión aguda de alguna de las grandes arterias cervicales o cerebrales, ya sea por un estrechamiento gradual con origen aterosclerótico, o bien por una oclusión súbita producida por un trombo (si tiene su origen en el mismo sistema arterial cerebral) o un émbolo (si el coágulo se origina en otra región del sistema vascular distinta del cerebro) (Truelsen, Begg y

Mathers, 2000; Torregrosa *et al.*, 2007). En el caso del ictus hemorrágico, se produce la rotura de un vaso sanguíneo, ya sea a nivel intracerebral (hemorragia intracerebral) o bien por la rotura de aneurismas en la bifurcación de grandes arterias en la superficie del cerebro (hemorragia subaracnoidea) (Truelsen, Begg y Mathers, 2000).

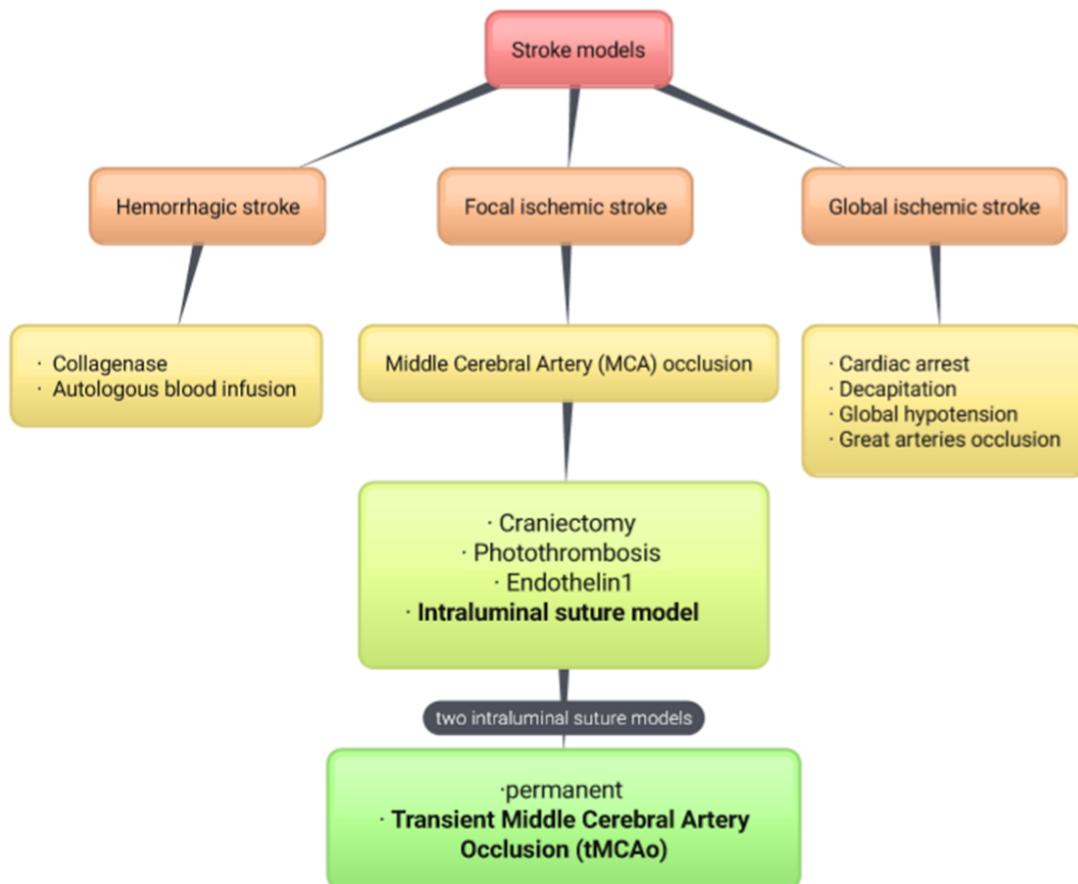
Ambos tipos de ictus se caracterizan por el fenómeno de isquemia cerebral, por el que se reduce el aporte sanguíneo en regiones del cerebro y estas dejan de recibir el oxígeno y los nutrientes necesarios para su correcto metabolismo y funcionamiento, llegando a producir la muerte celular de la zona afectada. En este sentido, se diferencia entre isquemia global y focal según la región afectada por la isquemia. Mientras que la isquemia global se produce por un descenso en la presión arterial o por un aumento grave en la presión intracraneal (debido, por ejemplo, a un traumatismo) que conduce a una disminución de la irrigación cerebral total (Martínez-Sánchez, Fuentes y Ruiz Ares, 2015), en la isquemia focal se ve afectado el territorio que irriga una determinada arteria cerebral (como por ejemplo, el área irrigada por la arteria cerebral media, donde se da la mayor incidencia de infartos focales) (Rousselet, Kriz y Seidah, 2012; Kleinschnitz, Fluri y Schuhmann, 2015; Cai *et al.*, 2016), de modo que la muerte celular es máxima en el foco isquémico (denominándose entonces infarto cerebral, por muerte celular destructiva localizada (García, 1984)). El área de alrededor del foco isquémico, que es potencialmente transformable en infarto pero en la que el daño es todavía reversible, se conoce como zona de penumbra y es diana de tratamientos en la fase aguda del ictus (Martínez-Sánchez, Fuentes y Ruiz Ares, 2015).

Para poder estudiar y analizar los efectos del infarto cerebral y aplicar tratamientos se han desarrollado diferentes modelos experimentales de ictus en animales.

## **2. Modelos experimentales de ictus**

Para comprender la fisiopatología del daño cerebral por ictus y evaluar la eficacia de diferentes tratamientos, se han desarrollado modelos experimentales animales que simulan los distintos tipos de ictus, siendo el roedor el animal más comúnmente utilizado para ello. Su bajo coste económico, su fácil manejo y su homología genética y similitud neurovascular con el ser humano lo convierten en un modelo adecuado para el estudio esta patología (Shahjouei *et al.*, 2016).

Los modelos animales de ictus se pueden agrupar en tres categorías: modelos hemorrágicos, de isquemia global y de isquemia focal (Kumar, Aakriti y Gupta, 2016) (figura 1).

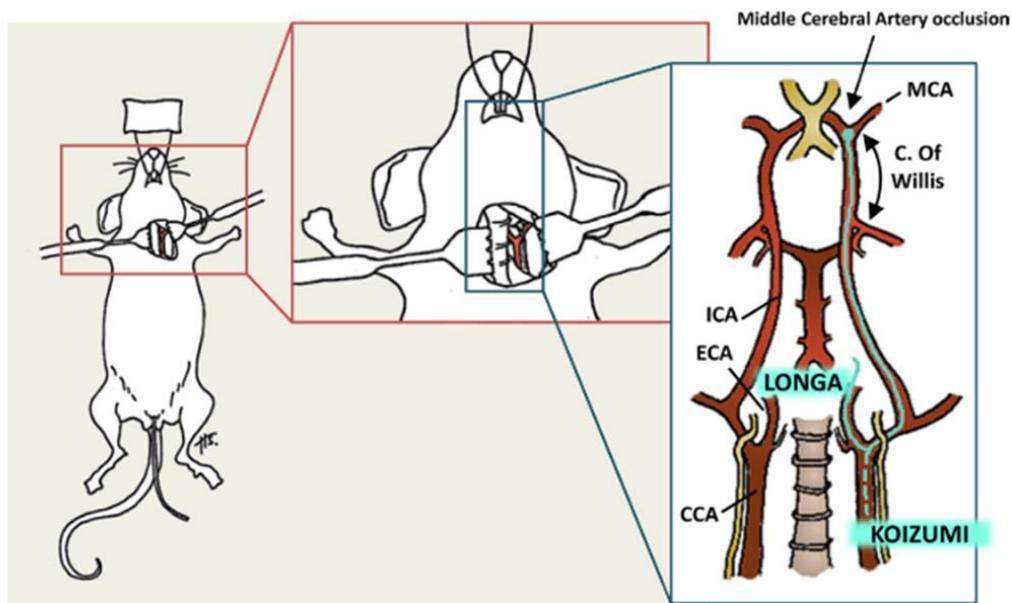


**Figura 1. Modelos de isquemia en animales.** En negrita en la figura, el modelo que se usó para los experimentos de esta tesis.

Los modelos hemorrágicos buscan mimetizar el sangrado cerebral que se daría en humanos mediante la inyección intracraneal de enzima colagenasa de origen bacteriano o mediante la infusión autóloga de sangre. En los modelos de isquemia global el flujo sanguíneo se reduce bruscamente en el cerebro a través de técnicas como inducción del paro cardíaco, decapitación, inducción de hipotensión e hipoxia sistémica u oclusión de grandes arterias que irrigan el encéfalo. Por último, los modelos de isquemia focal están basados en la oclusión transitoria o permanente de una arteria cerebral concreta. La mayoría de los modelos se centran en la oclusión de la arteria cerebral media (MCA, por sus siglas en inglés, *middle cerebral artery*), ya que más del 75% de los ictus isquémicos en humanos afectan a esta región (Rousselet, Kriz y Seidah, 2012; Kleinschnitz, Fluri y Schuhmann, 2015; Cai *et al.*, 2016). Los principales modelos de oclusión focal incluyen aproximaciones como la coagulación o ligadura de la MCA accesible por craneotomía, inducción de trombos mediante fotoquímica o embolismo por inyección de macroesferas, aplicación de endotelina-1 como elemento vasoconstrictor y la oclusión intraluminal mediante filamento (Kumar, Aakriti y Gupta, 2016). Este último modelo ofrece dos variantes: la oclusión

## INTRODUCCIÓN

permanente de la arteria cerebral medial, o bien la reperusión del flujo sanguíneo de dicha arteria después de haber causado la isquemia focal, en cuyo caso recibe el nombre de isquemia transitoria de la arteria cerebral media o tMCAo por sus siglas en inglés, *transient MCA occlusion*, de forma similar a los casos de reperusión que se dan en pacientes isquémicos por disgregación espontánea del trombo o mediante intervención clínica (Engel *et al.*, 2011; Sommer, 2017). Esta técnica, menos invasiva que otras metodologías al no necesitar craneotomía y realizar el abordaje quirúrgico a través del cuello del animal, consiste en la introducción de un filamento recubierto de silicona a través de la arteria carótida común (CCA, por sus siglas en inglés, *common carotid artery*) siguiendo el modelo de Koizumi, o bien a través de la arteria carótida externa (ECA, del inglés *external carotid artery*), según el modelo de Longa. El filamento se avanza a lo largo de la arteria carótida interna (ICA, por sus siglas en inglés, *internal carotid artery*) hasta alcanzar el inicio de la arteria cerebral media en el polígono de Willis (figura 2).



**Figura 2. Esquema de la aproximación quirúrgica del modelo de isquemia focal intraluminal.** La introducción del filamento se realiza a través de la arteria carótida externa (de acuerdo con el modelo de Longa) o a través de la arteria carótida común (según el modelo de Koizumi). CCA: arteria carótida común; C. of Willis: círculo de Willis; ECA: arteria carótida externa; ICA: arteria carótida interna; MCA: arteria cerebral media. (Modificado de Smith *et al.*, 2015)

Una vez el filamento llega al inicio de la MCA se mantiene en dicha posición durante el tiempo de oclusión (que puede variar desde los 30 a los 120 minutos). En los casos de oclusión transitoria, la reperusión se logra retirando el filamento. Este modelo ofrece la ventaja de reproducir con semejanza el ictus isquémico en humanos así como mostrar una zona de penumbra similar a la que se detecta en pacientes

(Canazza *et al.*, 2014; Kumar, Aakriti y Gupta, 2016), lo que hace que sea un modelo ampliamente utilizado. A pesar de estas consideraciones, el modelo muestra también algunas desventajas, como un riesgo de producir hemorragia subaracnoidea, edema traqueal, o parálisis de la masticación y salivación por daños en la carótida externa (Shahjouei *et al.*, 2016).

### **3. Animales *sham* y anestesia**

Deben realizarse controles de cirugía para evaluar aquellos cambios asociados exclusivamente al daño cerebral por ictus y no a los posibles cambios debidos a la manipulación quirúrgica o la aplicación de anestésicos. Esta cirugía control, llamada *sham surgery* en inglés (falsa cirugía), consiste en realizar los mismos pasos que se aplican durante la intervención quirúrgica para causar el daño cerebral, pero evitando este último. En el caso del modelo de oclusión transitoria intraluminal (tMCAo), el animal *sham* se diferencia del animal isquémico en que no se le introduce el filamento que permite la oclusión de la MCA (Rousselet, Kriz y Seidah, 2012), o bien sí se le introduce el filamento pero se retira inmediatamente, produciendo un bloqueo momentáneo de la MCA (Engel *et al.*, 2011).

Con el fin de reproducir las mismas condiciones, a los animales *sham* también se les ha de aplicar el mismo tiempo de exposición a los agentes anestésicos que el tiempo al que están sometidos los animales isquémicos. De hecho, una diferencia esencial entre los pacientes que han sufrido un ictus y los modelos experimentales en animales es el uso de anestesia en estos últimos, ya que, mientras que en la mayoría de los accidentes cerebrovasculares se producen en ausencia de anestesia, esta es necesaria para la realización de la cirugía en los animales y evitar su sufrimiento durante la intervención. Los efectos de la anestesia en los modelos animales pueden variar según el agente anestésico utilizado (Kirsch, Traystman y Hurn, 1996). Por ejemplo, el isoflurano, un anestésico inhalado inhibidor de los receptores NMDA y comúnmente utilizado en los modelos experimentales, ha demostrado tener efectos neuroprotectores al disminuir la muerte neuronal en el hipocampo de ratas después de tratamientos de hipoxia (Koerner y Brambrink, 2006). A pesar de que los efectos de la anestesia sobre el sistema nervioso central empiezan a ser evaluados en los modelos de isquemia (Hoffmann *et al.*, 2016), poco se sabe de los efectos sistémicos en estos mismos modelos. Un estudio realizado en animales a los que se les había aplicado la cirugía tMCAo demostró que el isoflurano actuaba sobre las poblaciones de leucocitos de la médula ósea (Denes *et al.*, 2011). Una publicación posterior reveló que la manipulación quirúrgica y la anestesia en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media mediante craneotomía afectaba también a la movilización en sangre de los leucocitos en respuesta a la intervención, un efecto que podía permanecer desde horas hasta días (Denes *et al.*, 2014).

Así, los modelos experimentales de isquemia cerebral se ven comprometidos por la propia cirugía y la anestesia, por lo que hay que tener en cuenta estos factores en el traslado de los resultados al ámbito clínico, y considerar una correcta aplicación de los controles *sham*.

#### **4. Síndrome de inmunodepresión asociado al ictus, infección y sistema nervioso autónomo**

El daño por ictus se ha asociado con una serie de complicaciones inmunes que podrían poner en riesgo la vida del paciente. Parte de esas complicaciones surgen como consecuencia del síndrome de inmunodepresión mediado por ictus, desarrollado por hasta un 30% de los pacientes isquémicos (Chamorro *et al.*, 2012). Este síndrome es una respuesta inmune mediada por diferentes agentes y que actúa como un arma de doble filo al impedir una mayor inflamación local en la zona de la lesión cerebral, pero comprometiendo al mismo tiempo la protección del paciente frente a infecciones (Chamorro *et al.*, 2012). De hecho, el porcentaje de pacientes que sufren infección después del ictus coincide con el porcentaje de pacientes que sufren el síndrome de inmunodepresión asociado a ictus, siendo las infecciones más frecuentes las que afectan al tracto urinario y a los pulmones, y produciéndose la mayoría de las mismas en las siguientes 48 horas después del ictus (Westendorp *et al.*, 2011; Chamorro *et al.*, 2012). La infección después de la isquemia cerebral es una complicación frecuente asociada a mortalidad y a una baja recuperación neurológica (Langhorne *et al.*, 2000), y que potencia respuestas inmunes periféricas que podrían afectar la resolución del ictus (Becker *et al.*, 2011). Además, se ha visto que la incidencia de las infecciones después del ictus no disminuye con el tratamiento profiláctico con antibióticos (Chamorro *et al.*, 2005; Kalra *et al.*, 2015; Westendorp *et al.*, 2015), lo que sugiere que las infecciones son debidas a mecanismos desconocidos que requieren mayor investigación.

Un factor esencial para el desarrollo de este síndrome es la sobreactivación del sistema nervioso autónomo. La activación colinérgica de la vía parasimpática, con la acetilcolina como principal neurotransmisor, ha demostrado tener un papel clave en el desarrollo de las infecciones pulmonares al suprimir la respuesta inmune después del ictus (Engel *et al.*, 2015). Por su parte, la sobreactivación adrenérgica del sistema nervioso simpático (SNS) con la producción de catecolaminas como neurotransmisores (como la epinefrina y norepinefrina), está implicado en la linfocitopenia asociada a ictus y en la supresión de la respuesta inmune periférica, participando en la conversión de la respuesta proinflamatoria de los linfocitos T colaboradores CD4+ (también conocidos como linfocitos Th, del inglés T helper) Th1 a la respuesta antiinflamatoria Th2, contribuyendo así a la infección pulmonar. Se sabe que después del ictus se produce una liberación de norepinefrina en la circulación, en línea con el aumento de la actividad simpática y tanto estudios clínicos como experimentales (Myers *et al.*, 1981; Houlden *et al.*, 2016) muestran que los cambios inmunes observados después del ictus correlacionan con los niveles de catecolaminas (Chamorro *et al.*, 2007; Vogelgesang, Becker y Dressel, 2014). Estas

neurohormonas pueden actuar sobre receptores adrenérgicos de células inmunes (Scanzano y Cosentino, 2015), inducir la apoptosis de los linfocitos, reducir la producción de IFN $\gamma$  (citocina proinflamatoria implicada en la actividad microbicida) y suprimir e inhibir la función fagocítica y el estallido respiratorio (mecanismo implicado en la defensa contra patógenos) *in vitro* (Prass *et al.*, 2003; Ruhnau *et al.*, 2014).

## **5. Efecto de los agentes $\beta$ -bloqueantes en la infección post-ictus y la lesión cerebral**

Debido al papel de las moléculas efectoras del SNS en la inmunosupresión y a su capacidad actuar sobre las células inmunes, varios estudios han explorado el uso de moléculas inhibitoras de la vía adrenérgica, como los agentes  $\beta$ -bloqueantes, para evitar la activación del SNS en el ictus.

Algunos estudios han vinculado el uso de estos fármacos, como el propranolol (un agente  $\beta$ -bloqueante no selectivo con capacidad antihipertensiva, que se une con alta afinidad a los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  (Bylund, 2015)) con una reducción de la incidencia de las infecciones y mejora de las tasas de supervivencia después del ictus en modelos animales (Prass *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2016), gracias a la reversión de la disminución de IFN $\gamma$  observada en bazo, timo y sangre (Prass *et al.*, 2003). En ensayos experimentales el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes también ha logrado disminuir el riesgo de muerte y la infección (Dziedzic *et al.*, 2007; Sykora *et al.*, 2015).

Sin embargo, el efecto de los  $\beta$ -bloqueantes en relación a la infección es un tema controvertido, ya que algunos estudios con pacientes no han encontrado diferencias en cuanto al riesgo de sufrir neumonías entre pacientes tratados con estos fármacos y los no tratados (Maier *et al.*, 2015). Otras investigaciones señalan que, previamente al ictus, el tratamiento de propranolol aumenta el riesgo de infección pulmonar (Westendorp *et al.*, 2016).

Además de sus posibles efectos en el tratamiento de la infección, el uso de  $\beta$ -bloqueantes ha demostrado tener un papel en la regulación de la lesión cerebral, disminuyendo el volumen de infarto y mejorando la respuesta neurológica en ratas isquémicas (Savitz *et al.*, 2000). Junto con el bloqueo del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (eje HPA), el bloqueo de la vía  $\beta$ -adrenérgica mediante propranolol redujo drásticamente el volumen de infarto en ratones (Romer *et al.*, 2015). En estudios clínicos, el trabajo realizado por Laowattana y colaboradores (Laowattana y Oppenheimer, 2007), indicó que el uso de  $\beta$ -bloqueantes en pacientes isquémicos estaba asociado a una menor severidad del infarto por un posible efecto en la una disminución de la inflamación. Sin embargo hay que tener en cuenta que los  $\beta$ -bloqueantes reducen la presión arterial con lo cual sus efectos beneficiosos podrían estar mediados, al menos en parte, por sus efectos sobre la presión arterial (Cruickshank, 2016).

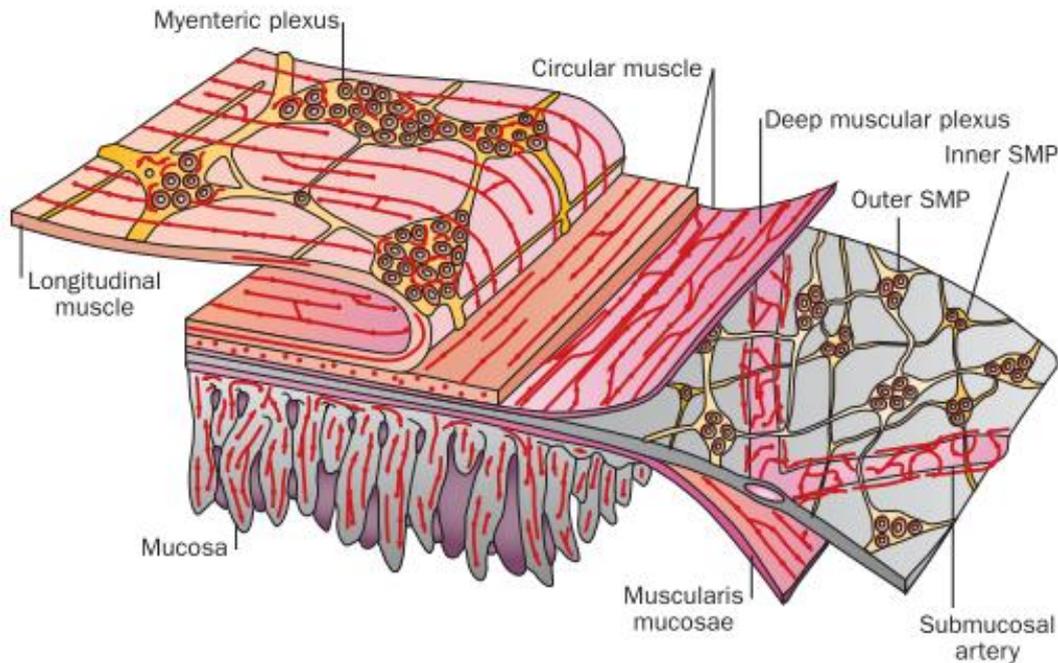
Así, el uso de agentes  $\beta$ -bloqueantes en la isquemia cerebral ha mostrado efectos beneficiosos en la práctica experimental que no siempre han funcionado en la clínica, lo que pone de manifiesto la necesidad de seguir explorando la eficacia potencial de estos fármacos en el tratamiento del ictus y para prevención de las infecciones asociadas.

### **6. Relación cerebro-intestino en el ictus**

#### 6.1 Sistema nervioso intestinal

La liberación de catecolaminas tiene efectos sistémicos ya que el tracto gastrointestinal es capaz de responder a las mismas, pudiendo incluso influenciar en la función de la mucosa intestinal y en la diversidad de las poblaciones bacterianas de su superficie (Lyte, Vulchanova y Brown, 2011). La inervación intestinal es un sistema complejo, que integra señales extrínsecas del sistema nervioso central (SNC) (sistema simpático y nervio vago) que permiten el control de las funciones intestinales, como la regulación del flujo sanguíneo o los movimientos de fluidos a través de la mucosa intestinal, interactuando con las señales intrínsecas procedentes del sistema nervioso entérico (SNE) que regulan la actividad contráctil (figura 3) (Furness, 2012). Basándonos en esta relación entre el SNE y el SNC es plausible especular que la función intestinal puede verse alterada por la isquemia cerebral. De hecho, las complicaciones intestinales son frecuentes después del ictus, como el estreñimiento y heces duras o grumosas (Engler *et al.*, 2014).

Stanley y colaboradores (Stanley *et al.*, 2016) analizaron la densidad neuronal de los plexos submucosos de muestras intestinales de animales isquémicos y *sham*, y revelaron que los animales que habían sufrido un ictus mostraban una disminución significativa de neuronas en la región del íleon, con especial afectación de las neuronas colinérgicas. Su trabajo también demostró que la relación entre fibras nerviosas adrenérgicas y colinérgicas era mayor en los animales isquémicos que en los animales *sham*, sugiriendo una desregulación de la señalización nerviosa en el plexo submucoso de animales isquémicos. También se ha detectado que la isquemia reduce la motilidad intestinal 24 horas después de la inducción del ictus (Singh *et al.*, 2016).



**Figura 3. Estructura del sistema nervioso entérico.** Entre la mucosa y la capa de músculo circular se localizan los plexos ganglionares de la capa submucosa, que tiene componentes internos y externos. Entre la capa de músculo circular y el músculo longitudinal se encuentra los plexos ganglionares mientéricos. Las fibras nerviosas conectan los ganglios e inervan las diferentes capas musculares (circular, longitudinal y *muscularis mucosae*, una fina capa de tejido muscular que forma parte de la mucosa). No representado en la figura, el entramado de neuronas que inervan el tejido y regulan su motilidad lo constituyen neuronas sensoras intrínsecas (IPAN), que se conectan con interneuronas, y con neuronas motoras excitatorias e inhibitorias. SMP: plexos submucosos. Las líneas rojas hacen referencia a la circulación sanguínea. (Imagen extraída de Furness, 2012).

### 6.2 Primera barrera intestinal: estructura, transporte y permeabilidad intestinal

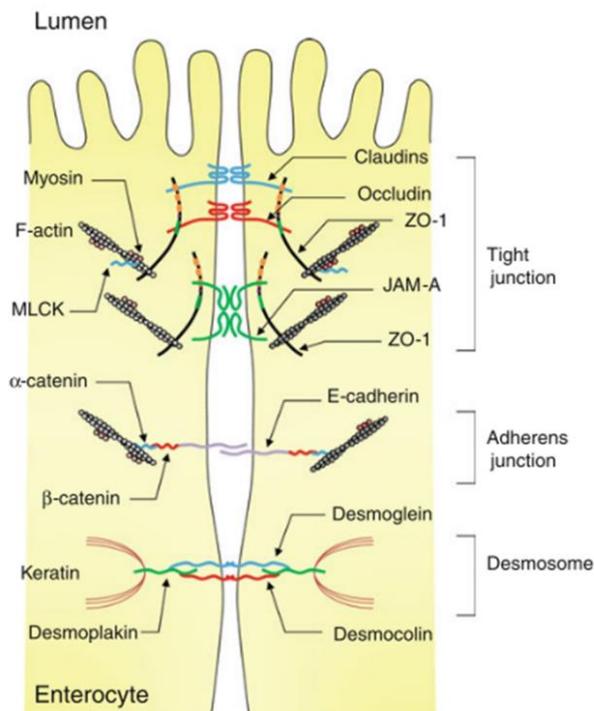
Además de su sistema de señalización nerviosa, el intestino presenta varios niveles de contención que le permiten hacer frente a todos los antígenos ante los que está expuesto y garantizar la separación entre el medio externo y el interno. Para hacer frente a las más de las 50 toneladas de comida que pasan a lo largo de una vida promedio, así como a los  $10^{14}$  microorganismos que habitan en el mismo (incluyendo bacterias, virus, hongos y protozoos, lo que en conjunto recibe el término de *microbiota intestinal*), la barrera intestinal debe garantizar la homeostasis a través de sus diferentes componentes (Thursby y Juge, 2017).

El primero de ellos es la capa constituida por las células epiteliales, que establece la separación física con el medio exterior. El epitelio intestinal está formado mayoritariamente por enterocitos, que se encargan de los procesos de absorción, pero también se encuentran otros tipos celulares, como las células de Paneth (presentes únicamente en el intestino delgado), implicadas en la producción de péptidos antimicrobianos y en la protección del nicho de las células madre epiteliales; las células calciformes para la producción de moco; y las células neuroendocrinas, que integran las señales procedentes del sistema nervioso central y el sistema entérico neuroendocrino a través de la secreción de hormonas con función en la digestión (Mowat y Agace, 2014; Peterson y Artis, 2014; Allaire *et al.*, 2018).

Esta primera barrera física controla el transporte de sustancias mediante tres vías principales: el transporte transcelular mediante difusión pasiva a través de la célula, transporte transcelular mediado por proteínas, y la vía paracelular (difusión pasiva entre las células) (Chelakkot, Ghim y Ryu, 2018). A través de la vía transcelular se incorporan azúcares como la glucosa, péptidos, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales mediante transportadores localizados en la región apical y en la basolateral de la célula epitelial (Kiela y Ghishan, 2016). Mediante esta vía, también se regulan los procesos de absorción y secreción de iones en el intestino, transporte mediado por canales iónicos. En estos procesos, el movimiento de cationes e iones, especialmente  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , genera un gradiente electroquímico en el interior celular que permite la incorporación o la salida de agua por gradiente osmótico (Field, 2003). El control del agua y de los electrolitos es esencial para asegurar el balance de fluidos en el organismo. Este proceso está controlado por las neuronas secretomotoras del sistema nervioso entérico, que actúan también en respuesta a las señales que reciben de la actividad simpática (Furness, 2012). Agentes patógenos, como la bacteria *Escherichia coli* patogénica, o la toxina del cólera, pueden activar las neuronas secretomotoras, induciendo la liberación masiva de iones, reduciendo la absorción y favoreciendo la pérdida de fluidos, produciendo lo que se conoce como diarrea secretora (Furness, 2012; Perez-Lopez *et al.*, 2016).

También el agua y algunos iones, o si las sustancias son demasiado grandes para ser transportadas por la vía transcelular, son transportadas por la vía paracelular, regulada por las uniones estrechas entre los enterocitos (*tight junction*, en inglés) (figura 4). Estas uniones consisten en estructuras proteicas dinámicas capaces de abrir o cerrar las uniones entre células adyacentes según las necesidades del momento y responder ante situaciones patológicas (González *et al.*, 2003; Capaldo y Nusrat, 2015). Estas uniones están constituidas por filamentos (cadenas) de proteínas transmembrana, como las claudinas, las ocludinas y las moléculas de adhesión funcional (JAM, *junctional adhesion molecule*) que interaccionan con proteínas citoplasmáticas, como las pertenecientes a la familia ZO (*zonula occludens*), cingulina y afadina, formando una compleja estructura capaz de interaccionar con el citoesqueleto

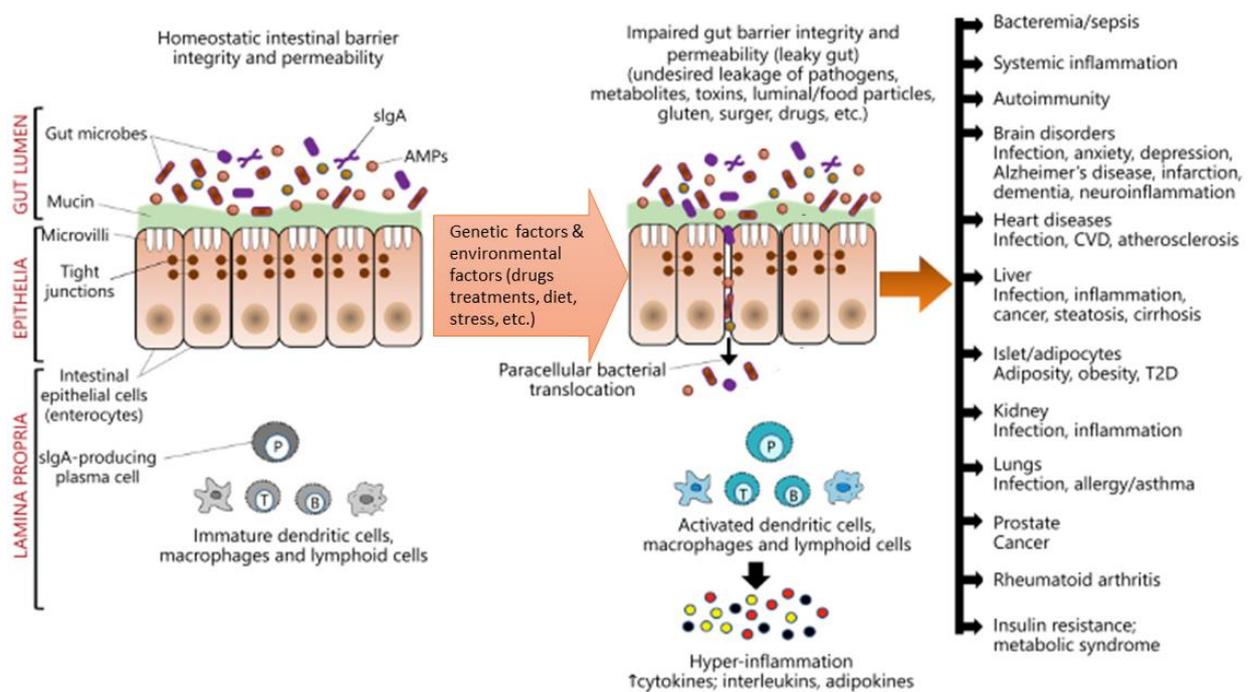
celular y de incorporar las señales intracelulares para mantener la integridad de la barrera intestinal (Dokladny, Zuhl y Moseley, 2016; Chelakkot, Ghim y Ryu, 2018).



**Figura 4. Proteínas de unión entre células intestinales.** Las uniones estrechas, localizadas en la zona apical, están formadas por filamentos de proteínas transmembrana que interaccionan con proteínas citoplasmáticas para regular la apertura entre las células. Las proteínas de unión adherente y los desmosomas (representados en la imagen) refuerzan las uniones intercelulares pero no regulan la permeabilidad. (Extraído de Suzuki, 2013).

A través de las uniones estrechas pueden pasar moléculas no cargadas de gran tamaño, como proteínas o lipopolisacáridos, o bien moléculas grandes que presentan cargas (Dokladny, Zuhl y Moseley, 2016). Sin embargo, la desregulación de estas uniones a consecuencia de factores genéticos o ambientales (como la dieta, el consumo de algunos fármacos, o la actividad de organismos patógenos) (Chelakkot, Ghim y Ryu, 2018) puede producir un aumento de la permeabilidad intestinal. Los estudios clínicos y experimentales señalan la pérdida de integridad entre las uniones estrechas como un agente facilitador de enfermedades tanto intestinales como sistémicas (Suzuki, 2013) debido a la facilidad que ofrece un intestino permeable al paso de metabolitos, toxinas bacterianas o incluso a las propias bacterias intestinales al torrente sanguíneo (Nagpal y Yadav, 2017; Obrenovich, 2018). Este traspaso de bacterias o de sus toxinas, se conoce como translocación bacteriana, y puede producir infecciones en varios órganos, como el hígado, el bazo o incluso en los pulmones. De hecho, si bien está aceptado que una de las principales causas facilitadoras de la infección pulmonar en pacientes isquémicos es la aspiración (entrada de material en el tracto respiratorio) a consecuencia de la disfagia (dificultad para tragar) producida por el ictus, no todos los pacientes que sufren aspiración desarrollan infecciones, lo que sugiere la existencia de otras vías implicadas en la infección (Shim y Wong, 2018). En este sentido, el trabajo realizado por Stanley y colaboradores (Stanley *et al.*, 2016) detectó bacterias típicas del intestino

en muestras de esputo, sangre y orina procedentes de pacientes isquémicos. También detectaron una disminución de la biomasa de bacterias en el íleon de ratones que habían sufrido un ictus, al mismo tiempo que observaron un aumento de las comunidades bacterianas en los pulmones de estos mismos animales, lo que podía sugerir una posible translocación bacteriana. Este mecanismo de translocación desde el lumen intestinal puede activar la respuesta de las células del sistema inmune innato y adaptativo, favoreciendo un entorno proinflamatorio que facilite el aumento de la permeabilidad intestinal y el desarrollo de diferentes enfermedades (figura 5) (Nagpal y Yadav, 2017). De hecho, se ha observado que el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) está implicado en el aumento de la permeabilidad intestinal por promover la internalización de ocludinas (Marchiando *et al.*, 2010), mientras que el interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) produce una disminución de la expresión de *zonula occludens 1* (ZO-1) y de ocludina por activación de la proteína quinasa de AMP (AMPK) (Scharl *et al.*, 2009).



**Figura 5. Complicaciones de la permeabilidad intestinal.** Factores ambientales o genéticos pueden producir una desregulación de las uniones entre las células epiteliales, lo que potencia el transporte paracelular de las bacterias luminales, favoreciendo el desarrollo de infecciones y otras enfermedades y la activación de la respuesta inmune, induciendo un estado proinflamatorio. Esta situación puede participar en el desarrollo de infecciones y enfermedades del CNS. (Modificado de Nagpal y Yadav, 2017).

El aumento de la permeabilidad intestinal es un rasgo frecuente que se observa en las enfermedades inflamatorias intestinales y en algunas enfermedades metabólicas, como la diabetes o la obesidad (Chelakkot, Ghim y Ryu, 2018). En el caso de la isquemia cerebral, varias investigaciones indican que el ictus es capaz de alterar la integridad intestinal, afectando a su motilidad (Singh *et al.*, 2016) y favoreciendo el aumento de la permeabilidad (Stanley *et al.*, 2016; Crapser *et al.*, 2017). Este proceso estaría parcialmente regulado por la vía adrenérgica ya que, aunque trabajos previos habían demostrado el papel del propranolol en la prevención de la bacteremia y la neumonía post-isquemia (Prass *et al.*, 2003), investigaciones recientes han señalado la implicación de esta vía en la permeabilidad intestinal y el desarrollo de infecciones, puesto que la administración de propranolol equiparó los niveles de permeabilidad intestinal de animales isquémicos con los valores de los animales *sham*, lo que permitió disminuir (aunque no eliminar) la carga bacteriana detectada en pulmón, hígado, bazo y fluido bronqueoalveolar (Stanley *et al.*, 2016).

### 6.3 Segunda barrera intestinal: el moco intestinal

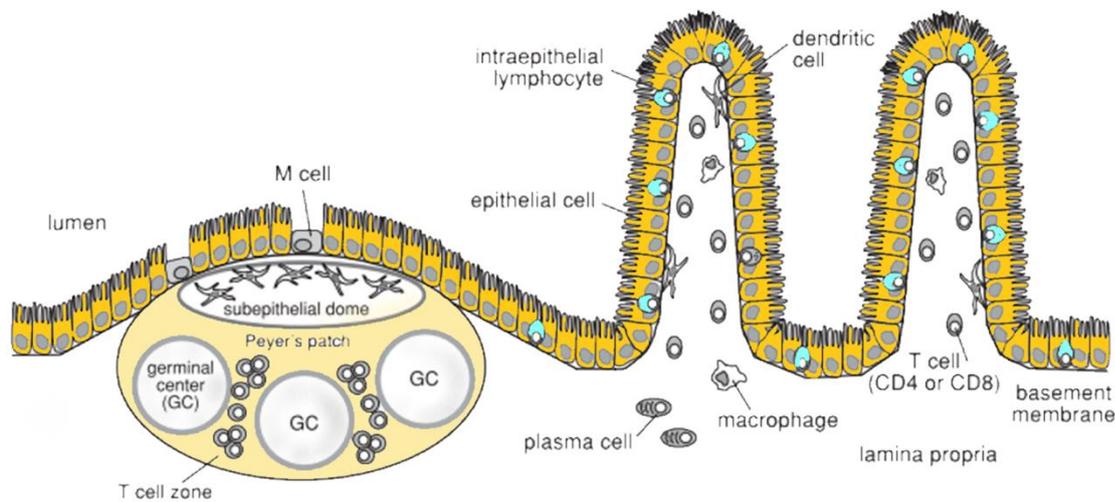
La barrera epitelial está recubierta por una segunda barrera de naturaleza química constituida por moco intestinal, formado por mucinas y péptidos antimicrobianos secretados por las células calciformes y las células de Paneth, y que impiden a los microorganismos alcanzar las células epiteliales. En el caso del ictus, la participación de esta defensa secretora no está estudiada en profundidad, aunque algunos estudios han observado hiperplasia de las células calciformes del intestino delgado en ratones isquémicos (Stanley *et al.*, 2016). Además, el trabajo de Houlden y colaboradores (Houlden *et al.*, 2016) reportó una reducción del número total de células calciformes en el ciego de animales isquémicos 72 horas post-isquemia, así como cambios en las poblaciones bacterianas del ciego mediadas por la producción de mucoproteína activada por señalización adrenérgica, lo que sugiere que la producción de moco intestinal puede verse alterada después de la isquemia.

### 6.4 Tercera barrera intestinal: sistema inmune intestinal

La tercera capa de protección la ofrecen las células del sistema inmune intestinal, que se pueden localizar tanto en estructuras linfoides organizadas, como las placas de Peyer (PP) y los ganglios mesentéricos (mLN, por sus siglas en inglés, *mesenteric lymph nodes*), como a lo largo de la lámina propia (tejido conectivo que permite la irrigación sanguínea, el drenaje linfático y la conexión nerviosa a la mucosa intestinal) o entre el propio tejido epitelial, como los linfocitos intraepiteliales (IELs por sus siglas en inglés, *intraepithelial lymphocytes*) (Perez-Lopez *et al.*, 2016). El conjunto de estos tres niveles permite contener a los microorganismos intestinales evitando su circulación sistémica. Alteraciones de

la barrera intestinal en alguno de estos componentes pueden comprometer la salud del hospedador (Peterson y Artis, 2014).

Tanto las placas de Peyer como los ganglios mesentéricos son esenciales en la inducción de la respuesta inmune adaptativa, ya que en ellos se produce la interacción entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos. Las placas de Peyer se localizan embebidas a lo largo del intestino delgado, especialmente a nivel del íleon, y contienen centros germinales, un reservorio de células B productoras de inmunoglobulina A (IgA), flanqueados por áreas de células T. Esta estructura es un indicativo de la función de las placas en la respuesta a los antígenos del lumen intestinal, para lo que necesita una estimulación inmune continua (Mowat y Agace, 2014). Además, en su zona más apical se localiza el domo epitelial, una región rica en células dendríticas capaces de recibir los antígenos facilitados por las células M (células especializadas en la captación de antígenos), permitiendo de esta manera dar una respuesta ante los antígenos del lumen (figura 6) (Mowat y Agace, 2014).



**Figura 6. Compartimentalización del sistema inmune intestinal.** Diferentes tipos de células del sistema inmune se localizan dispersas a lo largo de la lámina propia intestinal, realizando funciones de patrullaje y de respuesta inmune. De forma más localizada, entre las células epiteliales del intestino, se localizan los linfocitos intraepiteliales. Las placas de Peyer, embebidas en el tejido epitelial, cuentan con centros germinales para la maduración de linfocitos B, rodeados por áreas de células T. En su parte superior, las células dendríticas del domo subepitelial se encargan de la presentación de antígenos luminales. Junto a las placas de Peyer, los ganglios mesentéricos (no representados en la imagen) son estructuras de tejido linfoide organizado que actúan de primera barrera para los antígenos intestinales. (Imagen modificada de Sheridan y LeFrançois, 2012).

A diferencia de las placas de Peyer, los ganglios mesentéricos son estructuras encapsuladas que se encargan de drenaje linfático intestinal, enriquecidos tanto en células T como B, y actúan como una primera barrera en la incorporación de nutrientes y sustancias microbianas que pasan a la lámina propia para evitar la expansión sistémica de sustancias nocivas (Henaó-Mejía *et al.*, 2013). La región efectora de la respuesta inmune intestinal la constituyen el compartimento epitelial con linfocitos intraepiteliales (especialmente linfocitos T) y la lámina propia, enriquecida en células T, B y células de linaje mieloide (Mowat y Agace, 2014), como células dendríticas, capaces de detectar las bacterias del lumen intestinal e internalizarlas para la presentación antigénica gracias a su capacidad de movimiento entre las células epiteliales (Rescigno *et al.*, 2001).

La actividad de todas las células del sistema inmune intestinal garantiza la protección frente a los patógenos. En relación al sistema inmune adaptativo y más concretamente, a las células T, en el epitelio del intestino humano encontramos diferentes tipos de células T que en función de su especialización, pueden estar implicadas en respuestas efectoras o reguladoras.

Las células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas permiten mantener la integridad de la barrera intestinal mediante su acción destructiva, eliminando células dañadas o infectadas (Konjar *et al.*, 2017). Para ello, las células T se activan gracias al receptor de reconocimiento de su superficie (TCR) en la interacción con las células presentadoras de antígenos (normalmente, células dendríticas y macrófagos). Los linfocitos CD8 efectores controlan entonces la infección mediante mecanismos citolíticos, como la liberación de perforinas y granzimas, o citocinas, como TNF $\alpha$  e interferones (Konjar *et al.*, 2017).

A nivel funcional, los linfocitos T colaboradores CD4<sup>+</sup> (Th) pueden mostrar un perfil proinflamatorio o antiinflamatorio, lo que permite regular la respuesta inmune frente a la invasión de agentes patógeno y disminuir la señalización una vez finalizado el peligro (Siracusa *et al.*, 2019). Por ejemplo, las células Th17, abundantes en el tracto intestinal, son las principales secretoras de la interleucinas (IL) IL-17 e IL-22, ambas con papel proinflamatorio, del mismo modo que las poblaciones Th1 están implicadas en la producción de la citocina IFN $\gamma$  (Siracusa *et al.*, 2019), una molécula proinflamatoria activadora de la función fagocítica. Las respuestas proinflamatorias son contrarrestadas por las respuestas antiinflamatorias, como a través de las células Th2 secretoras de IL-4, lo que permite una supresión de la respuesta Th1. De forma similar, las células T CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> reguladoras (Treg) ejercen una función inmunosupresora al inhibir la diferenciación a células Th17 mediante la producción de IL-10 e impedir la proliferación de las células T $\gamma\delta$  (Park *et al.*, 2010). Estas últimas células son especialmente frecuentes en el epitelio, y están altamente representadas entre los linfocitos intraepiteliales (Mowat y Agace, 2014; Nielsen, Witherden y Havran, 2017). Entre las células epiteliales del intestinos, las células T $\gamma\delta$  se mueven a través de las uniones intercelulares para ejercer funciones de vigilancia inmune, regular la permeabilidad, promover la migración de células epiteliales desde las criptas intestinales y ejercer

funciones de memoria frente a patógenos invasores, favoreciendo la puesta en marcha de la respuesta inmune adaptativa (Sheridan *et al.*, 2013; Nielsen, Witherden y Havran, 2017). Estas células también están implicadas en la respuesta inflamatoria, para lo cual utilizan citocinas que permiten el reclutamiento de leucocitos. También se ha descrito, a pesar de la protección que ofrecen estas células en la homeostasis intestinal, su papel en el empeoramiento de enfermedades inflamatorias intestinales (Yeung, 2000; Park *et al.*, 2010; Fay, Larson y Jameson, 2016), por lo que la regulación de su actividad es clave para evitar daño tisular.

Además de estas células, también existen linfocitos innatos (ILC, *innate lymphoid cells*), células del sistema inmune innato sin receptores de antígenos específicos, a diferencia de los linfocitos T o B (Tait Wojno y Beamer, 2018). Estas células, entre las que se incluyen las células asesinas naturales (NK, de *natural killer*) son capaces de mediar en la respuesta contra virus, helmintos, o incluso intervenir en el desarrollo de los tejidos linfoides (Tait Wojno y Beamer, 2018).

Como ya se ha explicado en las primeras secciones del apartado de introducción, existe una conexión estrecha entre el sistema inmune y el SNC que se altera a consecuencia del ictus, tratándose de una respuesta con repercusión bidireccional. No solo el ictus es capaz de favorecer la inmunodepresión sistémica sino que también produce un reclutamiento de células inmunes en la zona de lesión. Se sabe que el daño agudo por ictus produce una respuesta inflamatoria local como consecuencia de la infiltración de células inmunes periféricas, tanto células mieloides (por ejemplo, neutrófilos) como células del sistema inmune adaptativo, como los linfocitos  $\gamma\delta$ , detectados en muestras de cerebros de pacientes y ratones isquémicos 24 horas después de la isquemia (Miró-Mur *et al.*, 2016). De hecho, en isquemia las células  $\gamma\delta$  agravan la lesión cerebral gracias a la actividad quimioatrayente de células mieloides mediante la secreción de IL-17 (Shichita *et al.*, 2009; Gelderblom *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta la relación entre el ictus y el sistema inmune periférico y las investigaciones que señalan el daño de la barrera intestinal a consecuencia del ictus, cabe plantearse que los efectos de la isquemia cerebral no solo afecten a las células inmunes circulantes sino también a los compartimentos inmunes intestinales, lo que podría derivar en una respuesta de retorno al cerebro que agravase la lesión.

### 6.5 ¿Cuál es la relación entre el ictus y la microbiota intestinal?

La conexión entre el sistema inmune intestinal y la microbiota intestinal está estrechamente regulada, ya que debe permitir el reconocimiento entre bacterias comensales y bacterias potencialmente patógenas. Por ejemplo, el polisacárido A producido por la bacteria comensal *Bacillus fragilis* es reconocido a través de los receptores de reconocimiento bacteriano TLR (*toll like receptor*) de las células del sistema inmune, lo que permite la conversión de las células T CD4<sup>+</sup> (respuesta proinflamatoria) a

células Treg capaces de producir IL-10 (respuesta antiinflamatoria) (Kabelitz, 2007). Del mismo modo, bacterias comensales pueden disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias en el intestino mediante la inhibición de la actividad del factor de transcripción NFκB, mediador en los procesos de inflamación (Kelly *et al.*, 2004). Es importante que el sistema inmune reconozca las bacterias propias de la microbiota intestinal y no responda contra ellas, ya que estas cumplen un papel protector frente a la colonización por parte de agentes patógenos externos, manteniendo a raya microorganismos invasores al impedir su acceso a diferentes recursos y además producen metabolitos de interés para el huésped (Perez-Lopez *et al.*, 2016). Sin embargo, ante determinadas circunstancias, la microbiota puede desequilibrarse y favorecer la expansión de microorganismos patobiontes, organismos de la microbiota intestinal inocuos en condiciones normales pero con capacidad infecciosa en determinados estados (Perez-Lopez *et al.*, 2016), lo que puede alterar toda la respuesta inmune del hospedador y aumentar la permeabilidad intestinal. En enfermedades inflamatorias intestinales, donde la respuesta inmune intestinal se caracteriza por un estado inflamatorio, se produce una reducción de la diversidad de especies bacterianas, además de un aumento de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Lane, Zisman y Suskind, 2017). Esta es una de las familias de patógenos oportunistas que más infecciones produce en todo el mundo, tanto en humanos como en animales y una de las principales responsables de las neumonías hospitalarias entre los pacientes isquémicos (Paterson, 2012; Vermeij *et al.*, 2018).

El papel de la composición de la microbiota intestinal no solo es relevante en enfermedades intestinales, sino que también está adquiriendo más importancia en enfermedades extra-digestivas, como las que afectan al cerebro, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, Parkinson e incluso el ictus (Benakis *et al.*, 2020). En relación a este último, varios estudios han demostrado que la isquemia cerebral produce cambios en las poblaciones de bacterias de los animales isquémicos (Singh *et al.*, 2016; Sychala *et al.*, 2018), del mismo modo que la composición bacteriana puede influir en el volumen de la lesión (Benakis *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2016, 2018; Winek *et al.*, 2016; Sychala *et al.*, 2018) (figura 7). Varios de estos estudios indican la implicación de mecanismos inmunes como mediadores en estas respuestas bidireccionales, especialmente a través de células T (Benakis *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2016, 2018) procedentes del intestino (Benakis *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2016).

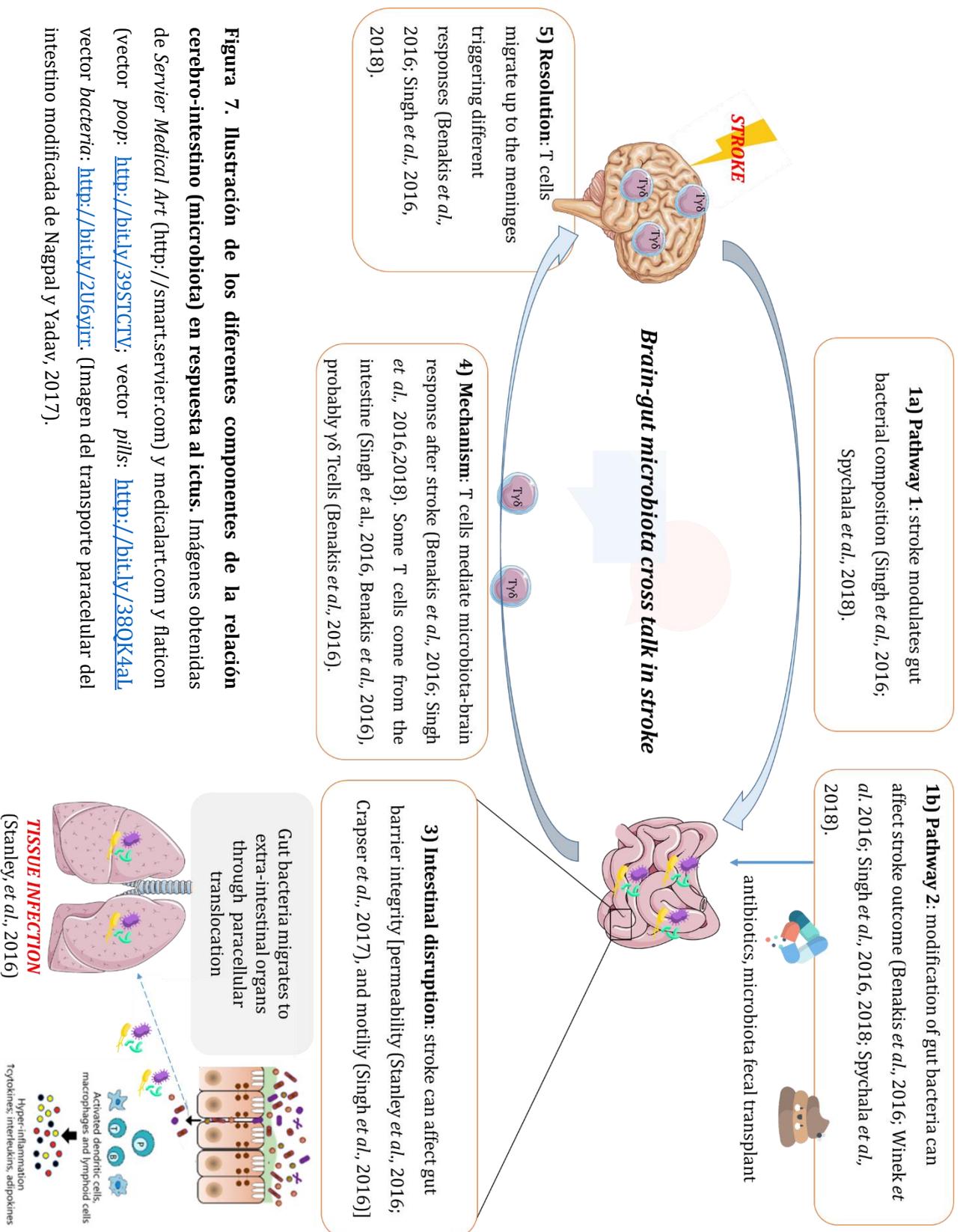
Para estudiar el efecto de la composición de la microbiota en el infarto cerebral, se han realizado intervenciones previas a la isquemia que permiten modular la composición bacteriana, como uso de antibióticos o trasplantes de microbiota fecal. En las investigaciones realizadas por Benakis y colaboradores (Benakis *et al.*, 2016), trataron con antibióticos a ratones salvajes, y a ratones con microbiota resistente a antibióticos. Tras la inducción del ictus, confirmaron que aquellos ratones con microbiota intestinal alterada a causa de los antibióticos, no solo tenían un 60% menos de volumen de infarto sino que además mejoraron su comportamiento neurológico en comparación con los animales

con microbiota resistente. Demostraron que en los animales resistentes al tratamiento por antibióticos la isquemia producía una migración de las células  $T\gamma\delta$  productoras de IL-17 (respuesta proinflamatoria) desde la lámina propia hasta las meninges, donde exacerbaban el daño por isquemia. Por el contrario, en los animales con microbiota sensible a los antibióticos, el tratamiento aumentó el número de células Treg productoras de IL-10 de la lámina propia, lo que permitió inhibir el desarrollo de las células  $T\gamma\delta$  productoras de IL-17 y con ello la neuroinflamación.

Investigaciones posteriores han apoyado la línea de los efectos de la microbiota en la lesión cerebral y su mediación a través de linfocitos T, además del papel modulador del ictus en la composición microbiana intestinal (Singh *et al.*, 2016). Este trabajo demostró que el ictus disminuye la diversidad de especies bacterianas en comparación con los animales *sham*. Además, localizaron células T procedentes de las placas de Peyer (marcadas previamente con una inyección fluorescente) en el hemisferio isquémico tres días después la inducción del ictus. Estos mismos investigadores trasplantaron microbiota fecal procedente de animales no operados libres de algunos microorganismos (SPF, *specific pathogen free*) a animales isquémicos, y observaron una disminución del volumen de infarto así como un mayor número de células Treg en bazo y en el hemisferio isquémico, sugiriendo que la restauración de la microbiota después del ictus tiene un papel neuroprotector. En animales deficientes de linfocitos T el trasplante de microbiota no produjo diferencias de volumen, indicando el papel de estos linfocitos en la mediación de la respuesta microbiana frente al ictus.

Sin embargo, mientras que el trabajo de Benakis demostraba que la depleción de la microbiota intestinal con el uso de antibióticos producía un efecto beneficioso ante el daño por isquemia, otros estudios muestran que la depleción de bacterias mediante el uso de antibióticos de amplio espectro empeora dicho daño (Winek *et al.*, 2016). En este caso, los animales fueron tratados con un cóctel de antibióticos de amplio espectro para deplecionar la microbiota intestinal. Después de la inducción de la isquemia cerebral, los investigadores no encontraron diferencias en el volumen de infarto 24 horas post-reperusión entre los animales con microbiota deplecionada y animales con la microbiota intacta. Sin embargo, la tasa de supervivencia de los animales que habían recibido antibióticos fue significativamente inferior a la de los animales que no habían recibido ningún tratamiento.

Esta contradicción puede ser un reflejo de la falta de estandarización a la hora de plantear experimentos relacionados con la microbiota intestinal y el ictus, las metodologías utilizadas para cuantificar poblaciones bacterianas o a las diferencias metodológicas en la inducción del ictus.



**Figura 7. Ilustración de los diferentes componentes de la relación cerebro-intestino (microbiota) en respuesta al ictus.** Imágenes obtenidas de *Servier Medical Art* (<http://smart.servier.com>) y *medicallart.com* y *flaticon* (vector *poop*: <http://bit.ly/39STCTV>; vector *pills*: <http://bit.ly/38QK4aL> vector *bacteria*: <http://bit.ly/2U6yirr>). (Imagen del transporte paracelular del intestino modificada de Nagpal y Yadav, 2017).

Trabajos posteriores han seguido demostrando el efecto de la modificación de la microbiota en la resolución del infarto cerebral. Hace un par de años unos investigadores demostraron que la colonización bacteriana en ratones libres de microorganismos (GF, *germ free*) reduce los volúmenes de infarto (Singh *et al.*, 2018). Para ello, con el objetivo de que los animales GF recolonizaran su microbiota, los investigadores juntaron en las mismas jaulas animales libres microorganismos con animales SPF durante tres semanas y después de la inducción de la isquemia, al mismo tiempo que mantuvieron un grupo de animales GF aislado. Cuando compararon los volúmenes de infarto cerebral entre los grupos GF que habían sido recolonizados con los animales GF aislados, los primeros mostraron un menor volumen de infarto cerebral. Además, los animales que habían recolonizado su microbiota mostraban un mayor número de células T infiltrantes (los autores no especifican el tipo de célula T detectada) en el hemisferio isquémico, sugiriendo que la presencia de microorganismos es necesaria para la correcta función protectora de las células T en respuesta al daño cerebral. En animales deficientes de linfocitos, los investigadores no encontraron diferencias en cuanto al volumen de infarto entre animales GF y animales convencionales.

Otras investigaciones demostraron que, además de las modificaciones que produce el ictus en la composición de la microbiota, las diferencias de poblaciones microbianas entre animales jóvenes y envejecidos también pueden regular la resolución del infarto. Spychala y colaboradores (Spychala *et al.*, 2018) intercambiaron la microbiota intestinal entre ratones jóvenes y ratones envejecidos mediante trasplante oral de microbiota previamente a la inducción del ictus, y observaron que aquellos animales jóvenes que habían recibido la microbiota de ratones envejecidos tenían mayores tasas de mortalidad, peores resultados en comportamiento neurológico y un aumento de las citocinas proinflamatorias. Por el contrario, los animales que habían recibido microbiota de animales jóvenes mostraron un mejor comportamiento neurológico, menor volumen de infarto y menores tasas de mortalidad en comparación con los animales envejecidos que habían recibido microbiota de animales de la misma edad.

En conjunto, aunque estos trabajos evidencian la regulación bidireccional entre la señalización por ictus y la composición microbiana, con el sistema inmune intestinal como elemento mediador, todavía quedan aspectos por resolver que requieren más investigación.

## 7. El papel de los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) en la isquemia

Un agente que podría estar implicado en la mediación entre el intestino, el sistema inmune y el cerebro son los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs de sus siglas en inglés, *short chain fatty acids*), que son el resultado de la fermentación bacteriana de fibra y carbohidratos. El mayor porcentaje de SCFA presente en el colon está constituido por el ácido acético, el propiónico y el butírico, siendo este último principal responsable de las demandas energéticas de las células epiteliales del colon (Kiela y Ghishan, 2016). De hecho, el ácido butírico está implicado en la diferenciación de las células Treg del colon (respuesta antitumoral), proceso regulado principalmente por la población de bacterias del género *Clostridium* (Atarashi *et al.*, 2011; Furusawa *et al.*, 2013). También pueden modular la respuesta inmune adaptativa al ser capaces de intervenir en la polarización de las células T hacia Treg o Th17 (respuesta anti y proinflamatoria, respectivamente) (Dalile *et al.*, 2019). Además, los SCFAs pueden alcanzar el cerebro, debido a la presencia de transportadores de estas moléculas en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (Dalile *et al.*, 2019). Una vez ahí, los SCFAs pueden modular la neuroinflamación al actuar sobre la morfología y activación de la microglía, un tipo de célula fagocítica del CNS implicada en regulación del daño cerebral después del ictus, entre otros efectos, mediante su acción sobre los neutrófilos infiltrantes (Dalile *et al.*, 2019; Otxoa-de-Amezaga *et al.*, 2019). En esta línea, recientemente se ha descrito el papel de los SCFAs en el ictus, sugiriendo que estos metabolitos actúan sobre la morfología y activación de la microglía en un proceso mediado por linfocitos T circulantes, ya que animales isquémicos deficientes en células T y suplementados con SCFAs en el agua de bebida mostraban una microglía intacta en comparación con animales salvajes suplementados, quienes poseían una microglía menos reactiva que sus correspondientes controles (Sadler *et al.*, 2019). Aunque estos mismos investigadores ponen de manifiesto la potencialidad de los SCFAs como tratamiento en la rehabilitación post-ictus, faltan más estudios que determinen los cambios específicos que produce el infarto cerebral en la producción de SCFAs y que confirmen el papel de estas moléculas en la recuperación del ictus.

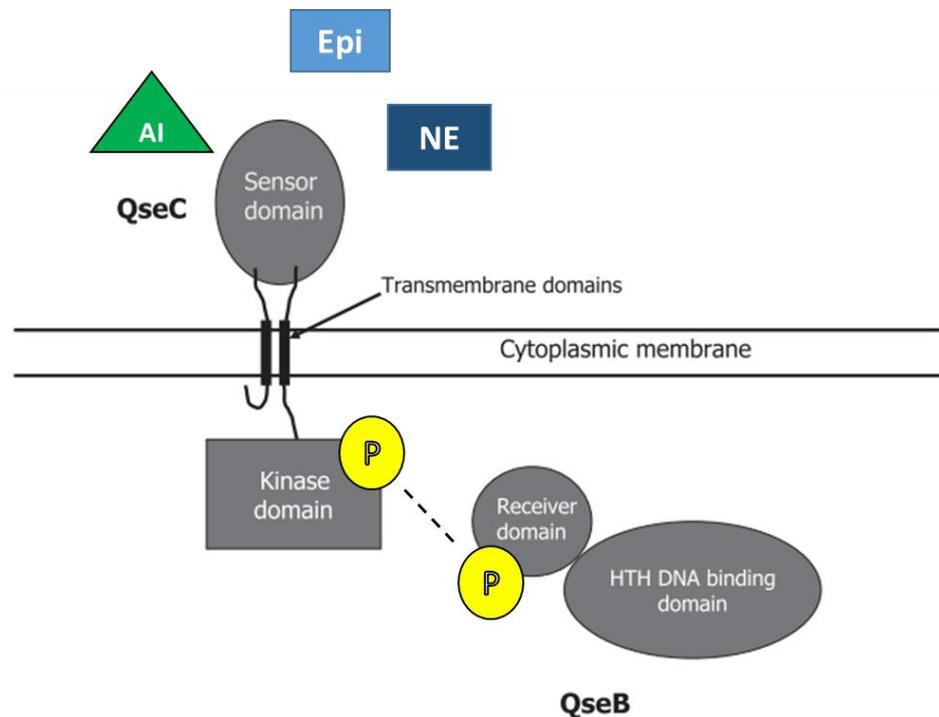
## 8. Mecanismos de comunicación bacteria-hospedador: el sistema QseCB y su potencialidad en el ictus

El grado de complejidad aumenta al identificarse nuevos sistemas de comunicación de las bacterias. Lejos de ser organismos aislados, las bacterias se comunican entre sí y con el hospedador. Para ello, las bacterias utilizan un sistema de dos componentes para la transducción de señales, formado por una proteína que actúa como sensor, que suele ser una histidina quinasa que inicia una cascada de transducción, y una proteína que actúa como un regulador de la respuesta (Tiwari *et al.*, 2017). Estos sistemas permiten responder ante señales del entorno, como las relacionadas con las fluctuaciones de

las poblaciones bacterianas mediante las proteínas de *quorum sensing*. Este mecanismo de señalización responde a proteínas producidas por las propias bacterias, llamadas autoinductores (AI), lo que activa diferentes procesos como la expresión de genes de virulencia, de motilidad, esporulación o formación de *biofilms* (Miller y Bassler, 2001). El QseCB es un sistema de dos componentes para la señalización de *quorum sensing*, en el que QseC actúa como sensor histidina quinasa y QseB como regulador de la respuesta para permitir la expresión de genes de virulencia (Weigel y Demuth, 2016). QseC se activa en respuesta a los autoinductores AI o ante catecolaminas procedentes del hospedador, como norepinefrina y epinefrina (Clarke *et al.*, 2006), lo que permite la fosforilación de su dominio citoplasmático para activar a QseB, factor de transcripción que regulará la expresión de los genes de virulencia (Weigel y Demuth, 2016) (figura 8).

El sistema QseCB está presente en un amplio espectro de especies bacterianas y especialmente conservado, tanto a nivel funcional como estructural, entre las pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y *Pasteurellaceae* (Weigel y Demuth, 2016), quienes lo usan para la activación de los genes de virulencia. Con el fin de reducir esta respuesta, varios estudios experimentales han bloqueado este receptor con el fármaco LED209 (N-fenil-4-benzenosulfamida), una molécula altamente selectiva para el receptor QseC (Curtis *et al.*, 2014) que actúa impidiendo su autofosforilación (Rasko *et al.*, 2008) sin mostrar efectos sobre el hospedador (Rasko *et al.*, 2008; Curtis *et al.*, 2014). El tratamiento con este compuesto demostró la inhibición de la expresión de los genes de virulencia pero no la inhibición del crecimiento bacteriano (Rasko *et al.*, 2008; Curtis *et al.*, 2014). Investigaciones posteriores han confirmado que, en modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal, el fármaco es capaz de evitar la expansión de las enterobacterias en las muestras de heces de aquellos animales que habían recibido el compuesto en comparación con los que había recibido vehículo (Rooks *et al.*, 2017), sugiriendo un nuevo papel para este compuesto.

Teniendo en cuenta la liberación de catecolaminas que se produce después de un ictus, se podría esperar una posible respuesta a las mismas por parte de las bacterias mediante el receptor QseC, que activaría la vía de señalización para la expresión de genes de virulencia, lo que potencialmente podría estar implicado en las complicaciones por infección que experimentan los pacientes isquémicos. Actualmente, la resistencia a antibióticos es un problema que causa más de medio millón de muertes al año y se espera que para el año 2050 cause más de 10 millones de muertes (Tagliabue y Rappuoli, 2018). Por ello, son necesarias medidas estratégicas que eviten la aplicación al uso de antibióticos. Dado que los mamíferos carecen de las moléculas de transducción QseCB, el bloqueo de este receptor es una buena diana terapéutica que evitaría el uso de agentes antibióticos, como es el caso del tratamiento de las infecciones de los pacientes que han sufrido un ictus.



**Figura 8. Estructura y funcionamiento del QseCB.** QseC es una histidina quinasa formada por un dominio sensor periplasmático, dos dominios plasmáticos, y un dominio quinasa citoplasmático. En respuesta a las moléculas autoinductoras (AI) de otras bacterias o a catecolaminas, como la epinefrina (Epi) y norepinefrina (NE) del hospedador, QseC se autofosforila, y fosforila posteriormente a QseB en su dominio receptor, para finalmente regular la expresión de genes bacterianos mediante su dominio hélice-giro-hélice (HTH) de unión a ADN. (Imagen modificada de Weigel y Demuth, 2016).

## 9. Mensaje clave

Como se ha presentado en la introducción, la relación intestino-cerebro en el ictus, además de ser un campo de investigación incipiente, es un tema complejo que requiere una interpretación global de agentes inmunológicos, microbianos y fisiológicos para su entendimiento. Además de quedar aspectos por resolver, hay puntos controvertidos entre las investigaciones realizadas hasta el momento que requieren más investigación.

En esta tesis hemos abordado las relaciones entre el cerebro y el intestino en el contexto del ictus. Considerando los múltiples agentes involucrados en la respuesta sistémica al ictus y su resolución, hemos realizado una aproximación multifactorial, que ha incluido el estudio de la respuesta inmune, la

## ***INTRODUCCIÓN***

---

microbiota y la integridad física la barrera intestinal mediante diferentes estrategias que se detallan en el siguiente apartado de materiales y métodos.

---

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---



## **Hipótesis**

1. El ictus agudo altera las poblaciones del sistema inmune intestinal a través de señalización adrenérgica.
2. El ictus produce cambios en las poblaciones bacterianas intestinales.
3. El ictus altera la integridad de la barrera intestinal.
4. El ictus favorece la translocación bacteriana a otros órganos. Este proceso se puede regular farmacológicamente actuando sobre las vías adrenérgicas.

## **Objetivos**

- 1. Determinar los cambios en las poblaciones celulares del sistema inmune intestinal después del ictus, y su modulación a través de la vía  $\beta$ -adrenérgica.**
  - a. Investigar si la isquemia induce cambios en el sistema inmune intestinal, especialmente a nivel linfocitario, en las regiones de la lámina propia, placas de Peyer, ganglios mesentéricos y linfocitos intraepiteliales.
  - b. Evaluar el efecto de la vía  $\beta$ -adrenérgica sobre las poblaciones linfocitarias intestinales a través del tratamiento con propranolol.
- 2. Determinar el efecto de la isquemia cerebral sobre las poblaciones bacterianas intestinales, y estudiar el papel regulador de los mecanismos adrenérgicos.**
  - a. Determinar los cambios de las poblaciones de bacterias intestinales.
  - b. Determinar el papel de la vía  $\beta$ -adrenérgica en la regulación de las poblaciones bacterianas intestinales.
  - c. Efecto del fármaco LED209, inhibidor del receptor QseC (receptor bacteriano que responde a catecolaminas del hospedador).
- 3. Estudiar la translocación bacteriana tras el ictus**
  - a. Mediante cultivos bacterianos:
    - i. previo tratamiento con propranolol ( $\beta$ -bloqueante)
    - ii. previo tratamiento con el fármaco LED209, inhibidor del receptor QseC (receptor bacteriano que responde a catecolaminas del hospedador)
  - b. Mediante técnicas de imagen por bioluminiscencia.

**4. Elucidar el efecto de la isquemia sobre la función intestinal**

- a. Estudiar el efecto del ictus en la motilidad intestinal.
- b. Cuantificar cambios en la permeabilidad de barrera intestinal *in vivo* y *ex vivo*.
- c. Valorar modificaciones en la electrofisiología intestinal después del ictus.

**5. Modulación de la lesión cerebral mediante tratamiento farmacológico**

- a. Estudiar los cambios en la lesión cerebral tras inhibir los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y el receptor bacteriano QseC.

---

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---



Todos los reactivos se especifican en el anexo I y los anticuerpos en el anexo II.

## **1. Animales, modelo de isquemia y valoración neurológica**

### 1.1 Animales

Todos los experimentos realizados en esta tesis se han realizado de acuerdo con la normativa vigente y las directrices de la Unión Europea. Los protocolos experimentales específicos han sido aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Barcelona (226/19; 227/19) y la Generalitat de Catalunya (117/18, 9987; 472/18 P1, 10566), el Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Generalitat de Catalunya (831/2019, 10656), y el Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Barcelona y la Generalitat de Catalunya (CEEAH 4655, 10710).

Todos los experimentos se han realizado con ratones machos adultos de 11 semanas de edad, de la cepa C57BL/6J procedentes de la casa comercial de *Janvier*. Se ha usado únicamente machos para evitar el efecto de los estrógenos y sus variaciones durante el ciclo ovárico.

Se excluyeron de los estudios aquellos animales que no desarrollaron infarto (medido por TTC, ver sección 2, “evaluación del infarto cerebral”) o que no llegaron a una puntuación mínima de déficit neurológico superior a 5 durante el periodo de oclusión (ver sección 1.5 de materiales y métodos).

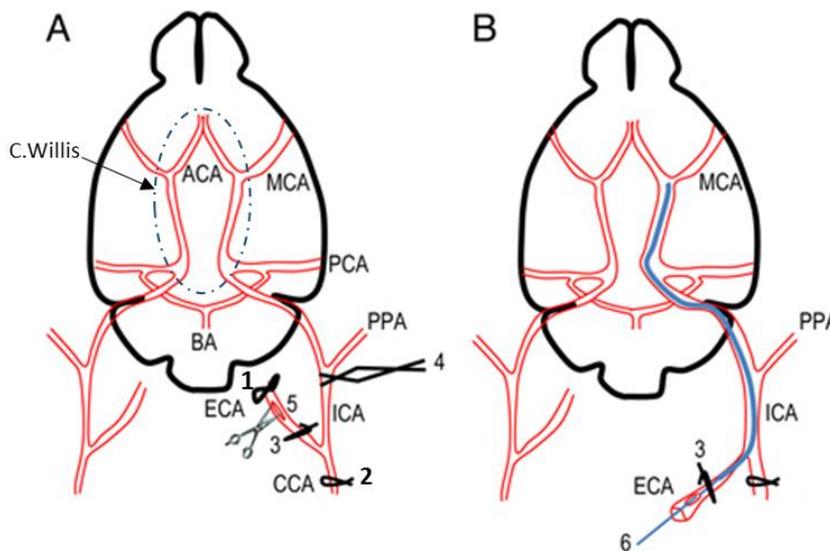
En esta tesis, se han operado 73 animales bajo el modelo “tMCAo dormido” (ver sección 1.3 de materiales y métodos), de los cuales 27 eran animales *sham*, y 46 isquémicos. De estos últimos, 12 animales murieron durante la cirugía, 3 no desarrollaron infarto y 2 murieron a nivel post-operatorio, antes de la fecha de sacrificio. Bajo el modelo “tMCAo despierto” (ver sección 1.4 de materiales y métodos) se operaron 225 animales, de los cuales 67 fueron animales *sham* y 158 animales isquémicos. De los animales isquémicos, 10 murieron durante la operación, 12 no llegaron a la puntuación mínima durante la oclusión, 13 no desarrollaron infarto, y 11 fallecieron durante las siguientes horas después de la cirugía y antes del momento establecido de sacrificio. Ningún animal *sham* murió después de la cirugía.

### 1.2. Modelo de oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAo, transient middle cerebral artery occlusion)

En este modelo (también conocido como modelo intraluminal) se produce la oclusión de la arteria cerebral media (MCA) mediante la inserción de un filamento de silicona, siguiendo el modelo descrito por Longa *et al* (Longa *et al.*, 1989). Para ello, se introduce un filamento a través de la arteria carótida externa (ECA) y se avanza a lo largo de la arteria carótida interna (ICA) hasta alcanzar el origen de la

MCA en el círculo de Willis (figura 9). En ese momento, se inicia el periodo de oclusión, de 45 minutos. Transcurrido ese tiempo, el filamento se retira y se procede a la reperusión arterial.

En esta tesis se realiza este modelo de oclusión arterial con el animal bajo los efectos de la anestesia durante los 45 minutos de oclusión (modelo “tMCAo dormido”), y también retirando al animal de la anestesia durante el tiempo en que se está produciendo el infarto (modelo “tMCAo despierto”). En ambos casos, la aproximación quirúrgica es idéntica, con la excepción de que en el modelo despierto se retira al animal de la anestesia durante el tiempo de oclusión, de modo que el ratón se mantiene consciente durante el infarto cerebral.



**Figura 9. Esquema de la oclusión de la arteria cerebral media a través del modelo intraluminal. (A):** Esquema del sistema arterial cerebral del ratón, indicando las diferentes suturas necesarias para realizar la oclusión. **(B):** Posición del filamento en el círculo de Willis y oclusión de la arteria cerebral media (MCA). ACA: arteria cerebral anterior; BA: arteria basilar; CCA: arteria carótida común; C.Willis: círculo de Willis; ECA: arteria carótida externa; ICA: arteria carótida interna; MCA: arteria cerebral media; PCA: arteria comunicante posterior; PPA: arteria pterigopalatina; 1) ligadura permanente alrededor de la ECA y termocoagulación de la arteria tiroidea superior (no mostrado); 2) ligadura temporal de la CCA; 3) ligadura no apretada en la ECA; 4) Colocación de un clip en la ICA para evitar el desangramiento en el siguiente paso; 5) Corte en la ECA para introducir el filamento; 6) Introducción del filamento después de cortar totalmente la ECA y retirada del clip. (Modificado de Rousselet, Kriz y Seidah, 2012).

### 1.3 Modelo "tMCAo dormido"

Se anestesió al animal en una caja de inducción con una mezcla de oxígeno (30 %), protóxido (70 %) e isofluorano al 5%, y tras inyectar buprenorfina subcutánea a una dosis de 0,05 mg/kg, se mantuvo con 1,5% de isofluorano con una mascarilla facial, sobre una manta eléctrica a 37°C. Con el animal en posición prona se efectuó una pequeña incisión sagital de la piel del cráneo entre las orejas para exponer la superficie del mismo, sobre el que se pegó con cianoacrilato un soporte plástico para una sonda *doppler*, conectada a su vez a un ordenador y a una pantalla. De este modo, se pudo registrar y visualizar en tiempo real el flujo sanguíneo cerebral. La oclusión arterial se confirmó al registrar una disminución de dicho flujo en el momento de la oclusión.

A continuación, se colocó al animal en posición de decúbito supino durante todo el proceso de isquemia. Mediante una incisión mediosagital se abrió la piel y se separaron las glándulas submaxilares, la musculatura pretraqueal y el músculo esternocleidomastoideo de la piel, solamente retirando el tejido conectivo; de esta forma, se accedió al paquete vasculonervioso carotídeo sin dañar el tejido. A continuación, se expusieron la arteria carótida común, la arteria carótida externa, la carótida interna y las ramas de la carótida externa: arteria occipital y tiroidea superior. Esta última se coaguló, mientras la carótida externa se cerró en su parte superior mediante una ligadura permanente.

Se procedió a la ligadura temporal de la arteria carótida común para reducir la presión en el árbol carotídeo y se colocó una ligadura no apretada en la base de la carótida externa. En un siguiente paso, se interrumpió momentáneamente el flujo con un clip en la carótida interna para introducir el filamento que ocluirá la arteria cerebral media. En la carótida externa se realizó una pequeña incisión para introducir un filamento de nailon (tamaño 7/0, Docol, 701923). Se usó la ligadura no apretada colocada previamente en la carótida externa para impedir la retracción del filamento y se retiró el clip de la carótida interna. A continuación, se empujó el filamento a lo largo de la carótida interna hasta al origen de la arteria cerebral media en el polígono de Willis. Durante el tiempo de oclusión (45 minutos) el animal permaneció bajo los efectos de la anestesia inhalada. Tras cumplirse el tiempo de oclusión, se procedió a la retirada del filamento y a la apertura de la ligadura temporal de la arteria carótida común, dejando 10 minutos para la completa reperusión. A continuación, se suturó la piel del animal y se retiró de la anestesia. Se le inyectó al ratón 300 µl de salino subcutáneo y se colocó en una jaula con una manta térmica (36-37°C) para su total recuperación. Finalmente, se devolvió al animal a su jaula con acceso libre a comida y agua hasta el momento del sacrificio. En el caso de los animales *sham*, el protocolo es idéntico al descrito sin la introducción del filamento.

El tiempo total en contacto con la anestesia en este modelo fue de aproximadamente de entre 90 a 100 minutos (teniendo en cuenta el tiempo de manipulación, incluyendo la colocación del láser *doppler* y los 45 minutos de oclusión).

### **1.4 Modelo “tMCAo despierto”**

Este modelo es idéntico al modelo “dormido”, con la excepción de que durante los 45 minutos de oclusión se retiró al ratón de la anestesia y no se usó sonda *doppler*, con el fin de reducir el tiempo de exposición a la anestesia. Tras introducir el filamento, se suturó al animal, se le retiró de la anestesia durante el tiempo de oclusión y se colocó en una jaula con una manta eléctrica a 36-37°C. Se aplicó un primer criterio de exclusión valorando el éxito de la oclusión arterial mediante la realización de un test neurológico a los 30 minutos después de la retirada de la anestesia (para eliminar el estado de aletargamiento causado por el isofluorano) y con el animal consciente (ver el punto 1.5, “valoración neurológica”). Para permitir una inducción correcta y la reapertura de los puntos, se volvió a anestesiarse al animal 8 minutos antes de cumplirse el tiempo de oclusión. Finalizado este tiempo, se procedió a la retirada del filamento y a la apertura de la ligadura temporal de la carótida común, dejando 10 minutos para una reperfusión completa. En el caso de los animales *sham*, el protocolo es idéntico al descrito sin la introducción del filamento.

El tiempo total en contacto con la anestesia en este modelo fue de aproximadamente 35 minutos (20 minutos en la primera anestesia y 15 minutos para la segunda anestesia).

### **1.5 Valoración neurológica**

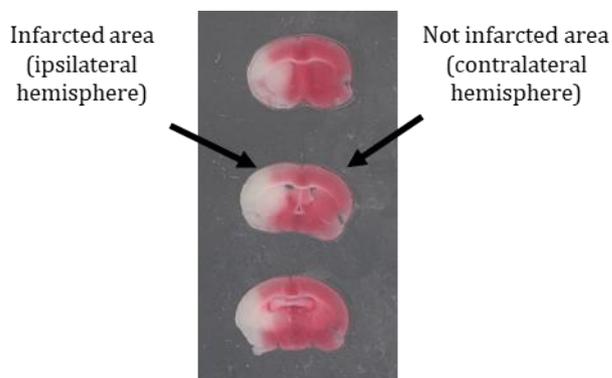
Después de 3 o 48 horas tras la isquemia cerebral (fase aguda del ictus), se cuantificó la afectación neurológica mediante la aplicación de un test con una graduación de 0 a 40 (siendo el 0 la ausencia de daño neurológico y 40 la peor puntuación). El test (también llamado *neuroscore* en inglés), ligeramente modificado desde el test de neurológico de DeSimoni (De Simoni *et al.*, 2003), se basa en la observación del animal fuera de la caja y en la evaluación ante déficits generales y focales. Los déficits generales evalúan el pelo (0-2), la posición de las orejas y su respuesta al sonido (0-2), el estado de los ojos (0-3), la postura (0-3), la actividad espontánea (0-3) y el comportamiento epiléptico (0-4), mientras que los déficits focales incluyen la simetría del cuerpo (0-2), el desplazamiento y capacidad exploratoria del animal (0-4), la habilidad de trepar por una superficie inclinada (0-3), la realización de vueltas sin desplazamiento sobre la superficie (0-3), la simetría del animal sujetado por la cola (0-4), la ejecución de vueltas al apoyar las patas delanteras y sujetando al animal por la cola (0-3), y la sensibilidad de los bigotes ante un ligero contacto (0-4).

En el modelo tMCAo despierto se aplicó un primer criterio de exclusión mediante observación del animal pasados los primeros 30 minutos desde su retirada de la anestesia para evitar el estado de aletargamiento causado por el isofluorano. Con el fin reducir el riesgo de mover inintencionadamente el filamento del lugar de oclusión, se analizaron parámetros generales y focales que no supusieran la manipulación del animal, siendo estos la posición de las orejas (0-2), la actividad espontánea (0-3), la simetría del cuerpo (0-2), el desplazamiento y capacidad exploratoria del animal (0-4), la realización de vueltas sin desplazamiento sobre la superficie (0-3) y la sensibilidad de los bigotes ante un ligero contacto (0-4). Los animales con una puntuación igual o inferior a 5 fueron descartados en ese mismo momento.

## 2. Evaluación del volumen de infarto cerebral

Para determinar el tamaño del infarto cerebral, se realizó la tinción por 2,3,5- trifeniltetrazolio (TTC). El TTC es un agente oxidante de las deshidrogenasas mitocondriales, de modo que al reducirse por estas enzimas el compuesto reacciona dando una coloración roja en el tejido (Kheradpezhohu *et al.*, 2008).

Por el contrario, aquellas regiones del tejido afectadas por la isquemia y sin actividad enzimática mitocondrial no responden al compuesto y quedan de color blanco (figura 10).



**Figura 10. Lonchas de cerebros teñidas con TTC.** A consecuencia de la muerte celular en el área infartada, no hay actividad enzimática mitocondrial y la región queda de color blanco. En el área no infartada las mitocondrias responden al TTC y la región adquiere color

Tras sacrificar al animal, se extrajo el cerebro y se diseccionó en cortes coronales de 1 mm de grosor con ayuda de un rebanador de tejidos (Stoelting, 51425). Los cortes se sumergieron durante 5 minutos en una solución de TTC al 0,5% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4, previamente calentada a 37°C y protegida de la luz. Seguidamente, los cortes se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 a 4°C durante 24horas. Después de fijarse, los cortes se limpiaron en tampón fosfato 0,1M pH7,4 y se mantuvieron en esta misma solución hasta el momento de su utilización.

Para evaluar el volumen de la lesión, se digitalizaron las imágenes de los cortes cerebrales mediante un escáner de sobremesa. Las medidas de las áreas se realizaron con el programa *Image J 1x* (Bourne, 2010). El área de infarto de cada sección se obtuvo por sustracción del área no lesionada del hemisferio ipsilateral (hemisferio afectado por la isquemia) al área total del hemisferio contralateral. El volumen en mm<sup>3</sup> del infarto se obtuvo multiplicando el área obtenida por el grosor de cada una de las secciones y sumando el resultado de todas ellas. Para su conversión a porcentaje (%) se dividió el valor del volumen del infarto entre el volumen total del cerebro y se multiplicó por 100.

### **3. Citometría de flujo**

#### **3.1 Obtención de células de la lámina propia (LP) y linfocitos intraepiteliales (IELs)**

El ratón (previamente anestesiado con isofluorano al 5%) fue perfundido a 7ml/min vía intracardíaca con 60 ml de PBS con heparina (5U/ml). A continuación, se extrajo el paquete intestinal, se separó el estómago del intestino delgado (cortando justo debajo del esfínter pilórico) y se guardó el ciego a -80°C para el estudio de las poblaciones bacterianas. Con la ayuda de una lupa y material de microdisección se retiró la grasa del tejido mesentérico y se aislaron las placas de Peyer (PP) y los ganglios mesentéricos (mLN), que fueron guardados a 4°C hasta su posterior procesamiento, en un tubo de 1,5 ml con medio Harvest (RPMI 1640, FBS 5%, penicilina-estreptomicina 20 U/ml – 20 µg/ml, gentamicina 50 ng/ml). El resto del tejido se usó para el aislamiento de células de la lámina propia (LP) y de los linfocitos intraepiteliales (IELs), siguiendo el protocolo descrito por Sheridan & Lefrançois (Sheridan y Lefrançois, 2012), basado en la separación de las células por métodos químicos y posterior concentración celular por gradiente de percoll. El proceso se resume en la figura 11. Brevemente, se eliminó cualquier resto de comida del intestino con medio CMF (HBSS w/o Ca<sup>2+</sup>, w/o Mg<sup>2+</sup> 1X, FBS 5%, HEPES 10 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, pH 7.2) y el tejido se troceó en fragmentos de 0,5 cm. A continuación, se trató con solución de DTT (medio CMF suplementado con DTT 1mM) en agitación durante 20 minutos a 37°C, y se mezcló en un vórtex a máxima potencia para facilitar la separación de las IELs del tejido epitelial. Tras repetir el proceso, se aisló el tejido epitelial para la obtención de células de la lámina propia, y se separó el componente líquido enriquecido en IELs para su centrifugación a 4°C durante 10 minutos a 300 g. A continuación, las IELs se resuspendieron con 16 ml de percoll isotónico (9:1 (vol/vol) Percoll:HBSS w/o Ca<sup>2+</sup>, w/o Mg<sup>2+</sup> 10x) al 44%, y se creó un gradiente sobre percoll isotónico al 67% (5ml), previamente añadidos en tubos de 15 ml. La muestra se centrifugó a 4°C, 20 minutos a 600 g sin freno y con una pipeta *pasteur* se recogieron las células presentes en la interfase del gradiente 67% - 44%. Las células se lavaron con solución de FACS (PBS, EDTA 2 mM, FBS 2%, NaN<sub>3</sub> 0.05%), se centrifugaron (4°C, 10 minutos, 300 g) y el pellet resultante se resuspendió en un volumen mínimo de 200 µl de solución de FACS para el posterior marcaje con anticuerpos.

El tejido epitelial aislado tras el tratamiento con DTT se trató dos veces consecutivas con solución EDTA (HBSS w/o Ca<sup>2+</sup>, w/o Mg<sup>2+</sup> 1X, HEPES 5 mM, glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina 20 U/ml - 20 µg/ml, gentamicina 50 ng/ml, EDTA 1.3 mM, pH 7.5) durante 30 minutos a 37°C en agitación. Tras eliminar el sobrenadante, rico en células epiteliales, se añadió 35 ml de solución colagenasa (RPMI 1640, FBS 10%, HEPES 5mM, glutamina 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, penicilina-estreptomicina 20 U/ml - 20 µg/ml, gentamicina 50 ng/ml, colagenasa IV 100 U/ml, pH 7.5) durante 35 minutos a 37°C en agitación para la disgregación del tejido. La muestra se pasó por un filtro de 70 µm y se acabó de disgregar mecánicamente con el émbolo de una jeringa. Posteriormente, se centrifugaron (4°C, 10 minutos, 300g), y el pellet se resuspendió en 8 ml de percoll isotónico al 44%, aplicando el mismo gradiente que en la obtención de IELs. Se recuperaron las células presentes en la interfase del gradiente y se lavaron con solución de FACS. Finalmente, se centrifugaron (4°C, 10 minutos, 300 g) y el pellet se resuspendió en un volumen mínimo de 200 µl de solución de FACS.

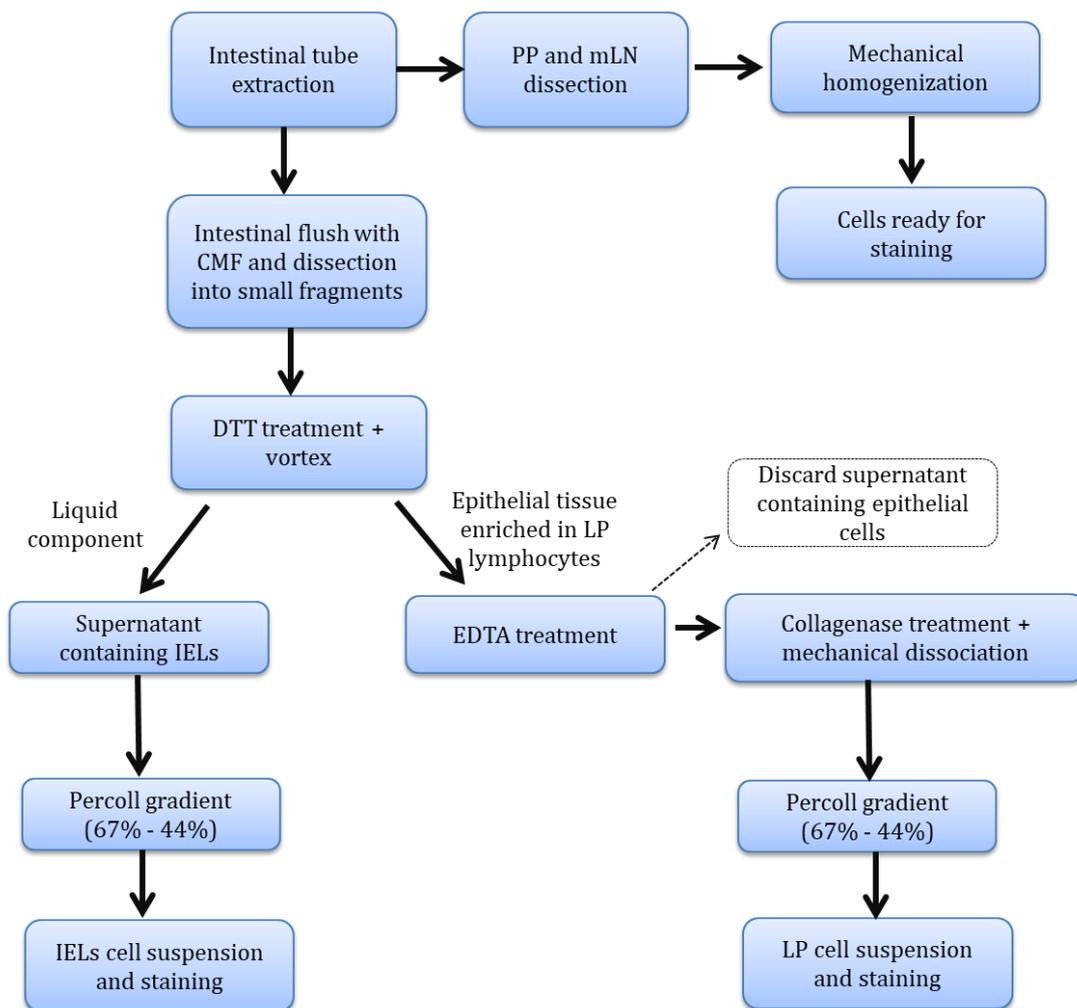


Figura 11. Esquema de la obtención de células de las diferentes regiones intestinales para su análisis por citometría de flujo.

### 3.2 Obtención de células de las placas de Peyer y de los ganglios mesentéricos

Las PP y los mLN se traspasaron, junto con el medio Harvest, a un homogenizador *dounce* de 2 ml (DWK Life Sciences) y se procesaron en todo momento a 4°C. Para su disgregación, se aplicó presión 8 veces con el émbolo A, seguido a continuación de otras 8 veces con el émbolo B. Con una pipeta *pasteur* se pasó el homogenado a un tubo de 15 ml a través de un filtro de 100 µm y se realizó presión ligeramente sobre el mismo filtro usando el émbolo de una jeringa para disgregar los restos de tejido. Se pasó solución de FACS por el filtro hasta alcanzar los 8 ml, y los tubos se centrifugaron a 4°C, 7 minutos y a 400 g. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet con un volumen mínimo de 200 µl de solución de FACS. A continuación, se procedió a la tinción para el marcaje de superficie e intracelular de las muestras.

### 3.3 Marcaje de superficie

Con este marcaje se identificaron las diferentes poblaciones de leucocitos en cada tejido. Para ello, en una placa de 96 pocillos con fondo en *U*, se mezclaron 50 µl de muestra y 50 µl de la mezcla de anticuerpos correspondiente (anexo II, *anticuerpos utilizados para el marcaje de leucocitos*, dilución final 1/200). Tras 25 minutos a oscuras a 4°C, se añadieron 200 µl de solución de FACS y se centrifugó a 350g durante 7 minutos, a 4°C. Las células se lavaron con solución de FACS y se resuspendieron en 200 µl de esta misma solución. En este punto, las muestras estaban preparadas para su análisis por el citómetro (BD FACS-LSRII 5 láseres), con el programa FACS Diva (BD Biosciences). En cada tubo se añadieron un número específico de *beads* fluorescentes (Beckman Coulter) para realizar el conteo absoluto del número de células por tejido.

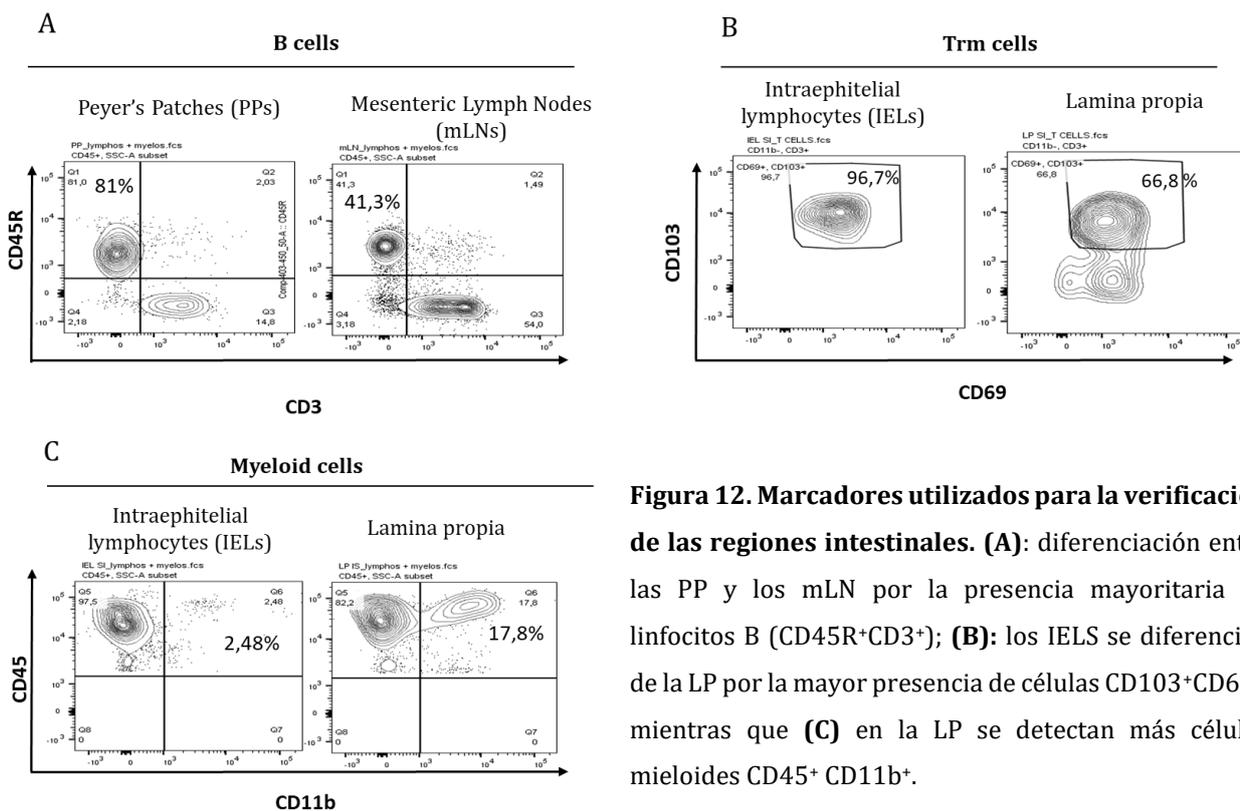
### 3.4 Marcaje intracelular

A través de este marcaje se identifican las poblaciones de células T reguladoras (Treg), identificables a través del marcador FoxP3, y las citocinas producidas por las poblaciones de leucocitos en los diferentes tejidos analizados. Para ello, se realizó el mismo procedimiento que para el marcaje de superficie, pero tras la centrifugación de la placa las muestras se fijaron en 150 µl de solución *FoxP3 Transcription Factor Fixation* para la detección de las células Treg, y para el estudio de las citocinas intracelulares en 150 µl de la solución *BD Cytofix Fixation*, siguiendo las instrucciones de los fabricantes (eBiosciences y BD, respectivamente). Tras 45 minutos en oscuridad a 4°C, las placas se centrifugaron 7 minutos a 350 g, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular con 40 µl de la solución de permeabilización para Treg (*FoxP3 Transcription Factor Permeabilization*) o para citocinas (*BD Cytofix Permeabilization*).

Tras 30 minutos en oscuridad y a 4°C, las muestras se incubaron con 10 µl de la mezcla de anticuerpos (anexo II, *anticuerpos utilizados para el marcaje de células Treg*, o *anticuerpos utilizados para la detección de citocinas intracelulares*, dilución final 1/100) durante 30 minutos en agitación y a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las células se lavaron con 200 µl de cada solución de permeabilización, se centrifugaron a 4°C, 7 minutos, 400 g, y se resuspendió el pellet celular en 200 µl de solución de FACS para pasar las muestras por el citómetro (BD FACS-LSRII 5 láseres), con el programa FACS Diva (BD Biosciences). En cada tubo se añadieron un número específico de *beads* fluorescentes (Beckman Coulter) para realizar el conteo absoluto del número de células por tejido.

### 3.5 Confirmación del correcto aislamiento de las regiones intestinales

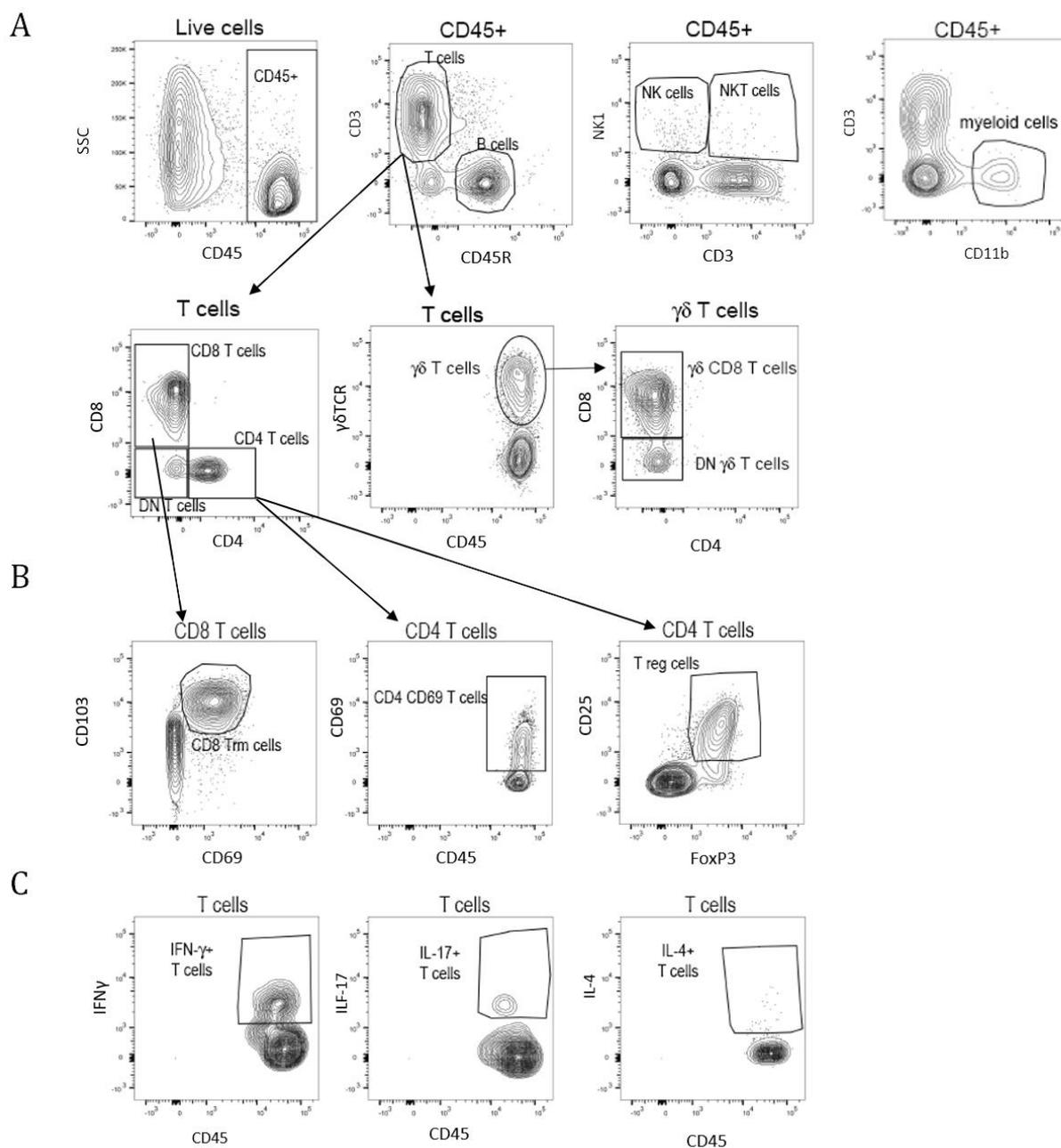
Cada región intestinal (PP, mLN, IELs o LP) se caracteriza por un patrón de expresión específico de células inmunes lo que permite su verificación por técnicas de citometría. Por ejemplo, es posible utilizar marcadores de linfocitos B como CD45R, y de linfocitos T como CD3, para la diferenciación entre las PP y los mLN, dos regiones que son inicialmente separadas mediante disección. Mientras que las PP muestran un perfil enriquecido en células B, en los mLN la cantidad de células B es menor y aumentan las células T (figura 12A). Por otro lado, la diferenciación entre lámina propia y linfocitos intraepiteliales, separados a través de metodologías enzimáticas, se realizó teniendo en cuenta que prácticamente la totalidad de IELs intestinales corresponden a células T de memoria residentes (Trm), identificables por los marcadores CD103 y CD69 (figura 12B), mientras que la LP presenta una mayor cantidad de células de linaje mieloide, reconocidas a través de los marcadores CD45 y CD11b (figura 12C).



**Figura 12. Marcadores utilizados para la verificación de las regiones intestinales. (A):** diferenciación entre las PP y los mLN por la presencia mayoritaria de linfocitos B (CD45R+CD3+); **(B):** los IELS se diferencian de la LP por la mayor presencia de células CD103+CD69+, mientras que **(C)** en la LP se detectan más células mieloides CD45+ CD11b+.

3.6 Estrategia de análisis de datos de citometría de flujo (gating) y análisis por t-SNE

Las células se tiñeron mediante marcaje con anticuerpos para las diferentes poblaciones leucocitarias, T reg o citocinas (anexo II), y las células muertas se excluyeron con la tinción Aqua *live/dead* (Molecular probes). Posteriormente, se procedió a la identificación de los diferentes tipos celulares mediante estrategia de *gating* (figura 13) y se analizaron con el programa FlowJo v10.6.0 (FlowJo-BD).



**Figura 13. Estrategia de *gating* para la identificación de los diferentes tipos de leucocitos y su activación funcional. (A):** Dentro de la población leucocitaria (CD45+) se identificaron varias subpoblaciones: las células mieloides (CD11b+; *myeloid cells*), los linfocitos B (CD45R+; *B cells*) y T (CD3+, *T cells*) así como las células NK (NK1.1+ o CD161+). Dentro de las células T se distinguieron las CD4+ (*CD4 T cells*), las CD8+ (*CD8 T cells*) y las doble negativas (DN *T cells*). En intestino la población de células T $\gamma\delta$  es muy representativa, y se identifica con el marcador  $\gamma\delta$ TCR. Estas células T pueden expresar el marcador CD8 ( $\gamma\delta$  CD8 *T cells*) o no (DN  $\gamma\delta$  *T cells*). **(B):** Las células T CD8 en intestino son células memoria residentes (Trm) caracterizadas por expresar la integrina CD103 y el marcador CD69. Una población importante de células T CD4 expresan el marcador de activación CD69. Otra población característica presente en intestino son las células T reguladoras (*T reg cells*; CD3+ CD4+ CD25+ Foxp3+). **(C):** Imágenes representativas para la cuantificación de la activación linfocitaria en términos de producción de citocinas IFN $\gamma$ , IL-17 e IL-4. Este mismo análisis se aplica para las subpoblaciones de células T CD4 y CD8.

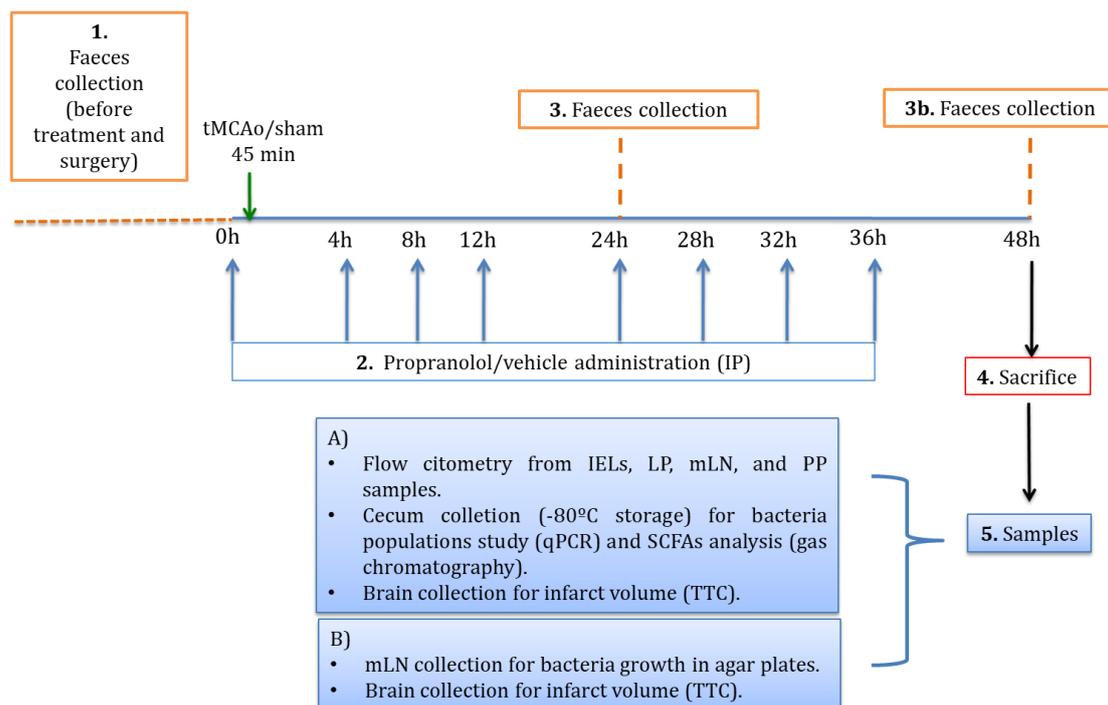
Para la visualización de la distribución de las poblaciones leucocitarias en las diferentes regiones intestinales se analizaron los datos por reducción bidimensional mediante el algoritmo tSNE (*t-distributed stochastic neighbour embedding*, 800 repeticiones, 40 de redundancia) (Van der Maaten y Hinton, 2008; Mair *et al.*, 2016).

#### **4. Tratamientos con fármacos**

Previamente a la intervención quirúrgica y a cualquier tratamiento, se recogieron heces frescas directamente desde el ano de los ratones, y se almacenaron en un tubo de 1,5 ml a -20°C hasta el momento de su análisis.

##### **4.1 Tratamiento con propranolol**

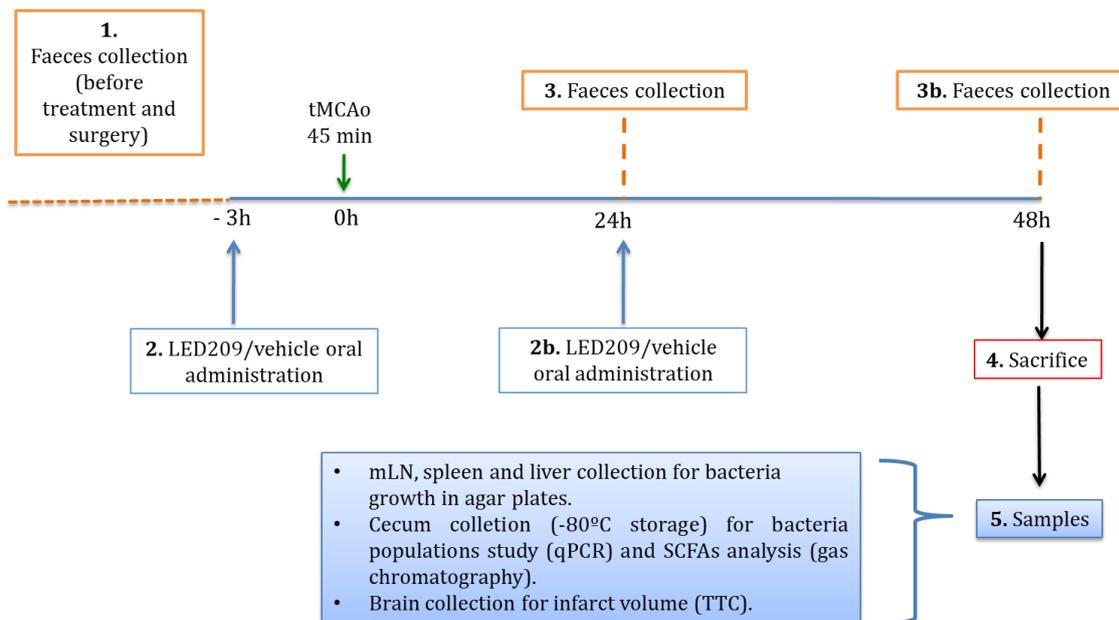
Justo antes de la intervención quirúrgica se administró propranolol (animales isquémicos) o su vehículo (isquémicos y *sham*) intraperitonealmente a una dosis de 30 mg/Kg (6mg/ml, disuelto en salino inyectable al 0,9%). Las siguientes dosis se administraron a las 4, 8, 12, 24,28, 32, y 36 horas después de la reperfusión (figura 14). Se tomaron muestras de heces a las 24 horas y a las 48 horas después de la isquemia en un mismo tubo, antes del sacrificio. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, previa sedación profunda con isoflurano al 5%, a las 48 horas después de la cirugía, y se procesó su intestino para el análisis por citometría de flujo. En otra tanda de animales, se usaron los ganglios mesentéricos para el estudio del crecimiento de bacterias en placas de agar. También se extrajo el cerebro para medición del volumen de infarto por TTC (ver en sección 2, “evaluación del volumen de infarto cerebral”). El ciego se congeló a -80°C para el estudio de los SCFAs y poblaciones bacterianas por qPCR.



**Figura 14. Esquema del procedimiento experimental para el tratamiento con propranolol**

#### 4.2 Tratamiento con LED 209

Tres horas antes de la oclusión, los animales (tMCAo) recibieron oralmente, a una dosis de 16 mg/kg, el fármaco LED 209 (N-fenil-4-benzosulfamida 1,6 mg/ml) o su vehículo (70% bicarbonato de sodio pH 9, 23% polietilenglicol (PEG), 5% DMSO, 2% Tween-80). La siguiente dosis se suministró pasadas las 24 horas después de la isquemia (figura 15). Las muestras de heces correspondientes a las 24 horas y 48 horas después del infarto se recogieron en un mismo tubo de 1,5 ml. A las 48 horas post-ictus los animales se sacrificaron por dislocación cervical, previa sedación profunda con isoflurano al 5% y extrajeron los ganglios mesentéricos, bazo e hígado para el estudio de la infección bacteriana. También se extrajo el cerebro para medición del volumen de infarto por TTC (ver en sección 2, “evaluación del volumen de infarto cerebral”). El ciego se congeló a -80°C para el estudio de los SCFAs y poblaciones bacterianas por qPCR.



**Figura 15. Esquema del procedimiento experimental para el tratamiento con LED209.**

## 5. Crecimiento de bacterias en placas de agar

Todo el material utilizado fue previamente autoclavado y el procedimiento se realizó en condiciones estériles. El ratón fue anestesiado con isofluorano al 5% y eutanasiado por dislocación cervical para la extracción del hígado y el bazo, además del paquete intestinal para el aislamiento de ganglios mesentéricos. Los órganos se introdujeron en tubos, previamente tarados, de 5 ml en el caso del hígado y del bazo, y de 1,5 ml para los mLN, se pesaron y se añadió PBS estéril en la siguiente relación peso/volumen: 1/10 para ganglios mesentéricos; 1/2 y 1/4 para hígado y 1/4 para bazo. A continuación, los tejidos se homogenizaron con la ayuda de un homogenizador automático (politrón PT 2500E, Kinematica AG) a máxima velocidad durante 1 minuto. Entre cada muestra se lavó la sonda de homogenización con cloroformo para eliminar restos biológicos, seguido de etanol al 100% y etanol al 70% para retirar los restos de cloroformo y tres lavados con PBS estéril para eliminar el etanol sobrante. En paralelo, se preparó medio generalista para el crecimiento de microorganismo con BHI (*brain heart infusión*) 37g/L, en agua destilada y agar al 2%, y se autoclavó (121 °C, 15 minutos) antes de su uso. De cada tejido homogenizado se realizaron diluciones seriadas y se plaquearon 100 µl en una placa de Petri, sobre la que se añadió el medio BHI (siembra en profundidad). Con movimientos suaves no circulares se repartió la muestra por toda la placa. Las placas se mantuvieron en una estufa a 37°C durante 24 h y se examinaron las unidades formadoras de colonia (CFU por sus siglas en inglés) mediante el programa *Image J 1x* (Bourne, 2010). Los resultados se expresaron como log CFU/ml. El PBS utilizado para la homogenización de los tejidos se usó como control negativo y el contenido del ciego como control positivo.

## 6. Detección de poblaciones bacterianas en heces y en ciego

Los pellets de heces (~100 mg) se colectaron directamente de los animales colocando un tubo de 1,5 ml al final del ano, y junto con los ciegos de los animales eutanasiados se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Las heces fueron homogenizadas con PBS estéril en una relación 1/10 y homogenizadas mediante el uso de un asa de siembra. Las muestras se centrifugaron 16200 g a 4°C durante 15min. El sobrenadante obtenido se congeló a -20°C hasta su utilización para la detección de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs). A partir del pellet fecal se realizó la extracción de ADN bacteriano en condiciones de esterilidad, usando el kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Ref.: 51604). Cada grupo bacteriano se detectó por qPCR usando las condiciones y los cebadores descritos por Arboleya, *et al* (Arboleya *et al.*, 2012). Las cantidades de bacterias (expresadas en log células/g de materia fecal) se referenciaron a una curva estándar, realizada con diluciones seriadas a partir de una concentración conocida de diferentes cepas bacterianas.

## 7. Detección de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)

A partir de los sobrenadantes fecales obtenidos por centrifugación de las heces (ver sección 6 “detección de poblaciones bacterianas en heces y en ciego”) se detectaron los diferentes ácidos grasos de cadena corta (SCFAs). En un mismo tubo de 1,5 ml se mezcló metanol al 46%, ácido fórmico al 2%, ácido 2-etilbutírico al 8%, y la muestra a estudiar al 38%. Se realizó un vórtex durante 30 segundos, y se centrifugó a máxima velocidad y a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los sobrenadantes (~500 µl) se traspasaron a un vial de cromatografía y se almacenaron a 4°C hasta el momento de su estudio. Para el análisis de las muestras se usó un cromatógrafo de gases-masas, formado por un módulo de inyección (6890N GC, Agilent Technologies), conectado a un detector de ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés) y a un espectrómetro de masas (5973N, Agilent Technologies). La detección y cuantificación de los SCFAs se realizó siguiendo la descripción indicada por Salazar, *et al* (Salazar *et al.*, 2011).

## 8. Detección de *E.coli* bioluminiscente

Para el experimento se usó la cepa bacteriana no patogénica *E.coli* K-12 MG1655, cedida por el Dr. Cormac Gahan, de la Universidad de Cork (Irlanda). Dichas bacterias producen un derivado bioluminiscente gracias a la integración en su cromosoma del plásmido p16Slux, que contiene el operón constitutivo P<sub>HELP</sub>luxABCDE (Riedel *et al.*, 2007). En este operón los genes *luxA* y *luxB* codifican la enzima luciferasa, mientras que los genes *luxC*, *luxD*, y *luxE* constituyen un complejo reductor de ácidos grasos necesario para la obtención de aldehídos de cadena larga. La acción de la luciferasa sobre los aldehídos

produce energía que es liberada en forma de fotones, lo que permite su detección a través de sistemas de imagen (Brodl, Winkler y Macheroux, 2018).

El crecimiento en cultivo de las bacterias se realizó aeróbicamente a 37°C en medio LB con cloranfenicol (25 µg/mL) en agitación 12-16 h, hasta la fase media exponencial (densidad óptica a 600 nm). Las bacterias se centrifugaron a 6000 g durante 5 min y se lavaron con PBS 1x. Se diluyeron con el agua de bebida de ratón hasta las 5x10<sup>6</sup> CFUs/µL para su administración por sonda oral.

Los animales fueron tratados con una combinación de antibióticos (ampicilina, metronidazol y neomicina (1 mg/mL), y vancomicina (0,5 g/mL) en el agua de bebida durante una semana, con el fin de eliminar la microbiota existente para facilitar la colonización de la cepa de *E.coli* bioluminiscente, como sugiere Baban y colaboradores (Baban *et al.*, 2012). Tras el último día de tratamiento, los ratones se mantuvieron en ayunas durante las siguientes 24 horas para evitar restos de comida en el intestino, y se administró oralmente una única dosis de la cepa bacteriana. Al día siguiente y antes de la realización de la cirugía, se confirmó a través del sistema de detección de luz que las bacterias habían colonizado el tracto intestinal del ratón. Para la toma de imágenes los animales se introdujeron en la cámara de detección de alta eficiencia ORCA-2BT *Imaging System* (Hamamatsu Photonics), provista con una cámara C4742-98-LWG-MOD de 512x512 píxeles, cargada con CCD (*charge coupled device*) y refrigerada a -80°C. Los ratones se colocaron a una distancia de 14 cm del objetivo de la cámara (HFP, Shneider Xenon 0.95/25 mm). Inmediatamente después de la adquisición de la imagen, con el animal en la misma posición, se realizó una segunda toma con una fuente de luz blanca del interior de la cámara de detección.

Tras confirmar la colonización bacteriana, se procedió a la intervención quirúrgica. 48 horas después del ictus, se sacrificó al animal por dislocación cervical, previa sedación profunda (Ketamina/Xilacina; 1,395/0,465 mg/kg, respectivamente), y se extrajeron los órganos vitales (riñón, hígado, intestino delgado, intestino grueso, ganglios mesentéricos, y pulmones) para la detección de luminiscencia.

### **9. Metodologías para el estudio de la permeabilidad intestinal**

La integridad y permeabilidad de la barrera intestinal se garantiza gracias a la acción de las proteínas de unión estrecha que se localizan entre las células epiteliales. Alteraciones en esta barrera pueden ser medidas mediante el uso de moléculas acopladas a fluoróforos capaces de atravesarla, como el FITC dextrano de 4KDa, una de las moléculas más comúnmente usadas para este tipo de estudios. Esta macromolécula no digerible se compone de un dextrano de alto peso molecular conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés *fluorescein isothiocyanate*) y se usa con

frecuencia como indicador de permeabilidad paracelular por su transporte pasivo a través del epitelio intestinal (Napolitano *et al.*, 1996; Woting y Blaut, 2018). Se puede aplicar *in vivo*, mediante inoculación oral, o *ex vivo* en sistemas que semejan situaciones fisiológicas intestinales, como el sistema de la cámara de Ussing (Thomson *et al.*, 2019).

Mientras que la metodología *in vivo* proporciona una aproximación indirecta de la permeabilidad intestinal mediante la cuantificación de la presencia del marcador en sangre, en la metodología *ex vivo* un segmento específico de tejido intestinal se expone directamente al compuesto. En el laboratorio se determinó la permeabilidad intestinal a través de ambas metodologías, utilizando como sonda el FITC dextrano de 4 KDa. Además, con el sistema de la cámara de Ussing se determinaron parámetros relacionados con la electrofisiología intestinal.

### 9.1 Permeabilidad intestinal *in vivo*

Después de 3 o 24 horas post-reperusión, se administró oralmente FITC dextrano de 4KDa (83 mg/ml preparado en PBS 1x estéril), a una dosis de 500 mg/kg, y se les retiró el acceso al agua para evitar la dilución de la solución de FITC dextrano. La administración se realizó pasadas 4 horas de ayuno para evitar interferencias en la absorción del marcador o cambios en la motilidad intestinal debido al contenido intestinal (Woting y Blaut, 2018). La obtención de muestras de plasma a partir de sangre de la vena cava caudal se realizó 1 hora después de la administración oral, tiempo óptimo como indicador de permeabilidad del intestino delgado (Woting y Blaut, 2018), y se congelaron a -80°C protegidas de la luz hasta su análisis. Se extrajo también el paquete intestinal para la toma de fotos y la detección del recorrido del FITC dextrano.

Para la lectura de la fluorescencia, las muestras se diluyeron 1:2 con PBS y se preparó una recta patrón a partir de diluciones de concentraciones conocidas de FITC dextrano (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,7; 0,8; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 5 µg/ml). La lectura se realizó en una placa opaca de 96 pocillos, a una excitación de 485 nm y emisión de 528nm, en el espectrofotómetro Synergy™ 2 (BioTek). Las concentraciones de las muestras se obtuvieron por interpolación con los valores de la recta patrón.

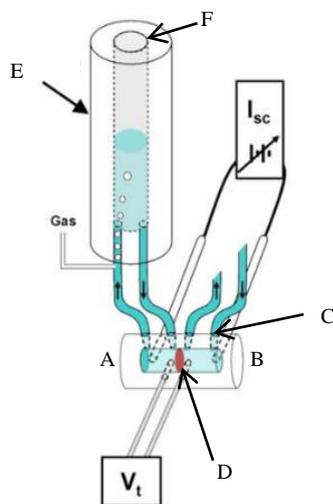
La toma de imágenes del intestino se realizó con el sistema de cámara *The Image Quant LAS 4000* (GE Healthcare), con un filtro de excitación de 312 nm y un filtro de emisión de 605 nm (tiempo de exposición 1/30 s y tamaño del iris 2.8). Para el análisis de las imágenes se usó el programa *Image J 1x* (Bourne, 2010).

### 9.2 Medición de parámetros eléctricos y permeabilidad intestinal *ex vivo*: cámara de Ussing

#### 9.2.1 Conceptos básicos de la cámara de Ussing

El sistema de la cámara de Ussing permite, bajo condiciones fisiológicas, la medida de parámetros eléctricos y permeabilidad intestinal en una región específica del intestino (Clarke, 2009; Westerhout, Wortelboer y Verhoeckx, 2015; Thomson *et al.*, 2019). Para simular las condiciones del cuerpo del mamífero, la temperatura del sistema se mantiene a 37°C en todo momento gracias a una camisa de agua, y se distribuye carbógeno (gas resultado de la mezcla de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>) para oxigenar las soluciones a un nivel suficientemente adecuado de presión parcial de O<sub>2</sub> que permita superar la falta de hemoglobina. El carbógeno también proporciona una presión parcial de CO<sub>2</sub> similar a la sangre de las venas, lo que permite mantener las soluciones a un pH fisiológico de 7.4 (Clarke, 2009).

Cada cámara se constituye por dos hemicámaras que quedan separadas por el tejido. La mucosa (dominio apical o luminal) se orienta hacia una de las hemicámaras, mientras que el lado de la serosa (dominio basolateral) queda expuesto hacia la hemicámara contraria, impidiendo así que las soluciones de cada lado se mezclen entre sí (figura 16).

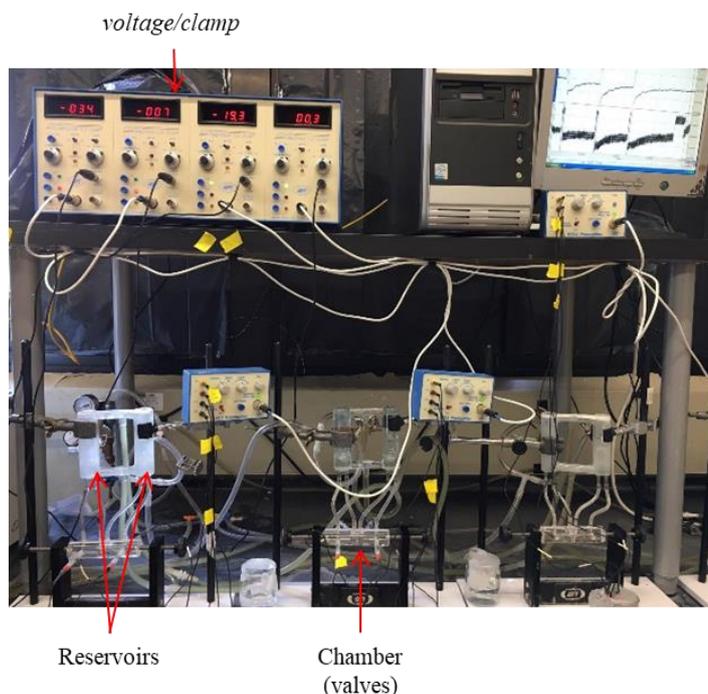


**Figura 16. Estructura de la cámara de Ussing.** A: Hemicámara 1, serosa; B: Hemicámara 2, mucosa; C: entrada para la conexión con el sistema de circulación; D: fragmento de intestino (membrana permeable); E: camisa de agua a 37°C; F: reservorio de la hemicámara 1; V<sub>t</sub>: electrodos para la medición de la diferencia de potencial; I<sub>sc</sub>: electrodos para la medición de la corriente de cortocircuito. Modificado de (Clarke, *et al.* 2009).

Cada hemicámara cuenta con una entrada vertical para la conexión con el sistema de circulación, formado por dos reservorios independientes entre sí (uno para cada hemicámara) y dos entradas horizontales para los electrodos, uno para la medición de la diferencia de potencial transepitelial del tejido (V<sub>t</sub>, expresado en milivoltios (mV)) y situado cerca del mismo, y otro para la medición de la corriente de cortocircuito (I<sub>sc</sub>, expresada en microamperios por centímetro cuadrado (μA/cm<sup>2</sup>)). Estos electrodos se conectan a su vez a un regulador *voltage-clamp* desde el que se registra y controla la diferencia de potencial y se regula la corriente (figura 17).

Los parámetros eléctricos que se pueden obtener a través de la técnica de la cámara de Ussing se basan en la Ley de Ohm. Según esta, la intensidad de corriente eléctrica ( $I$ ) que atraviesa un circuito es directamente proporcional al voltaje o diferencia de potencial ( $V$ ) e inversamente proporcional a la resistencia ( $R$ ) que presenta (Tenny y Keenaghan, 2020), y se formula como:

$$I = V/R$$



**Figura 17. Sistema de medición para el procedimiento de la cámara de Ussing.** Las flechas señalan el regulador para controlar la corriente, la cámara formada por las dos hemicámaras y los reservorios correspondientes a cada hemicámara.

En términos físicos, la diferencia de potencial indica la cantidad de trabajo a realizar por unidad de carga para mover dicha carga dentro de un campo electrostático desde el punto de referencia hasta el punto considerado (Tenny y Keenaghan, 2020). El tejido epitelial intestinal exhibe una diferencia de potencial transepitelial ( $V_t$ ) como resultado del movimiento polarizado de iones en el dominio apical y en el basolateral, como describe Pu, *et al.* (Pu, Cao y McCaig, 2015). Esta magnitud se interpreta como un indicador del estado de salud del tejido (Thomson *et al.*, 2019). Por otro lado, la corriente se define como el flujo de carga eléctrica a través de un material (Tenny y Keenaghan, 2020). En el caso estudiado, la corriente de cortocircuito ( $I_{sc}$ ) se refiere a la corriente que hay que aplicar para anular la diferencia de potencial del tejido, y es la suma de todas las corrientes iónicas que se dan través del mismo (Clarke, 2009; Thomson *et al.*, 2019). Por último, la resistencia es la oposición al movimiento de una carga (Tenny y Keenaghan, 2020). La resistencia transepitelial (TER, medida en ohmios ( $\Omega$ ) por  $cm^2$ ) que ofrece el tejido es un indicador de integridad epitelial. A nivel intestinal una baja resistencia está asociada a una alta permeabilidad (Thomson *et al.*, 2019). Estudios previos han demostrado que valores bajos de resistencia epitelial están asociados a una disminución en el número de cadenas proteicas implicadas en las uniones estrechas entre las células epiteliales (Claude, 1978), o a deficiencias en la expresión de dichas proteínas, como JAM-A (Laukoetter *et al.*, 2007). La resistencia se calcula a partir de la conductancia ( $G$ ), que mide la facilidad de un material para permitir el paso de una corriente eléctrica a

través de sí (Tenny y Keenaghan, 2020). Para conocer el valor de conductancia del tejido se aplica al mismo una corriente de cortocircuito a un voltaje determinado, siendo en nuestro caso de 1mV.

Previamente al montaje en la cámara, cualquier desviación eléctrica no procedente del tejido se eliminó por *zeroing* (Clarke, 2009). Acto seguido, se colocó el tejido en la cámara de Ussing (ver siguiente sección, 9.2.2, “disección del tejido y montaje en las cámaras”) y tras esperar 15 minutos de estabilización se registraron los valores de  $V_t$ ,  $I_{sc}$  y  $G$ . Además, cada 15 minutos durante 1 hora, coincidiendo con el momento de recogida de muestra para el estudio de la permeabilidad, se anotaron los valores de conductancia con el tiempo. Las medidas se grabaron y analizaron con el programa *Acqknowledge* (Biopac).

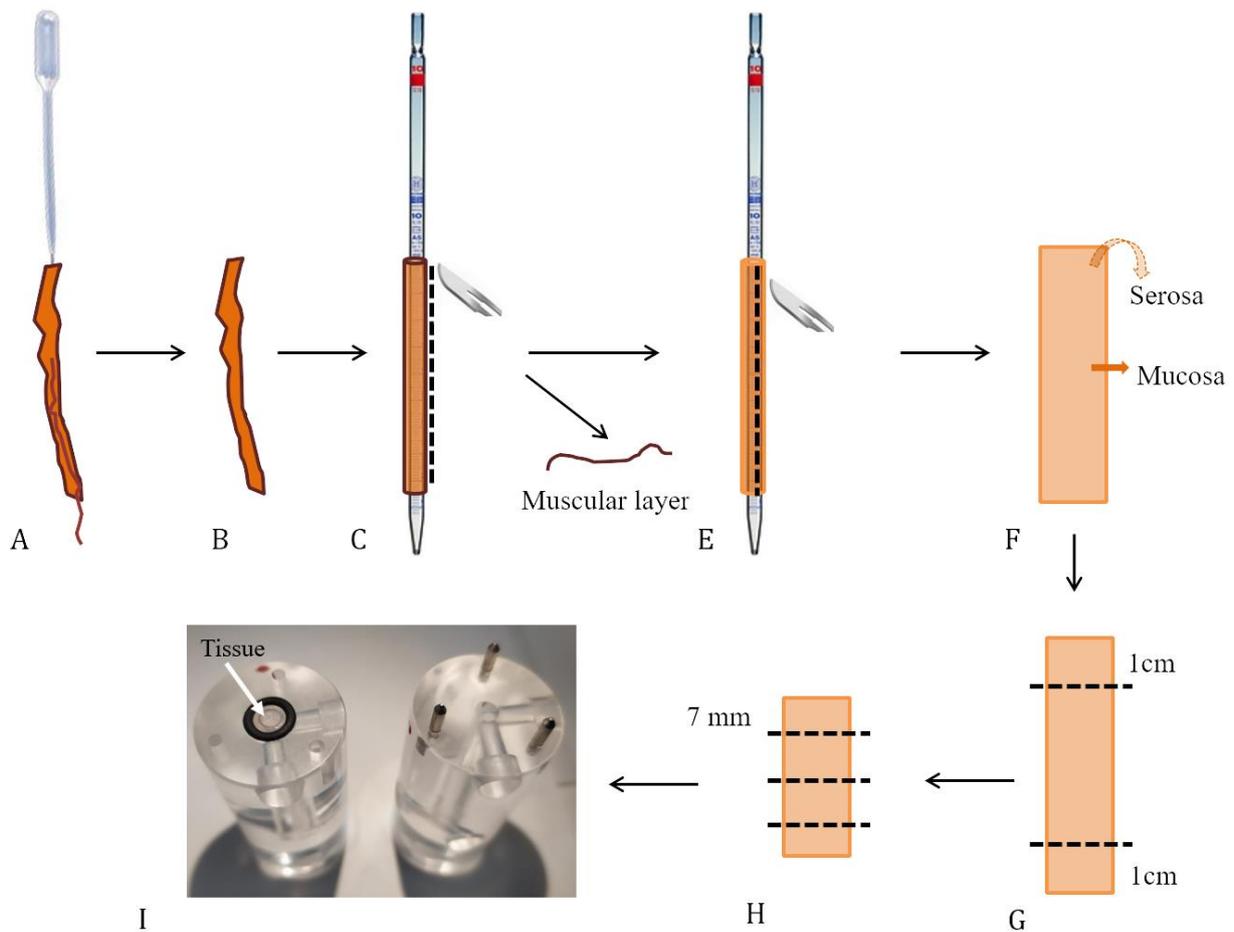
### *9.2.2 Disección del tejido y montaje en las cámaras*

Una vez anestesiado el animal con sedación profunda (isoflurano al 5%), se eutanasió por dislocación cervical y se extrajo todo el paquete intestinal. Para asegurar la viabilidad del tejido, se humedeció cada 30 segundos con la solución Krebs glucosa (KCl 461 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  114 mM,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  250 mM,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  116 mM, NaCl 115 mM,  $\text{NaHCO}_3$  22 mM,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  11 Mm, pH 7.4), previamente carbogenada. A continuación, se dividió imaginariamente el intestino delgado en tres fragmentos de igual longitud y se cortó 3 cm por encima y 3 cm por debajo del punto imaginario de corte. El fragmento obtenido, correspondiente a la región anterior del yeyuno, se utilizó para la técnica de la cámara de Ussing.

El contenido del segmento de intestino se eliminó introduciendo la solución Krebs glucosa con la punta de una pipeta *pasteur* de plástico por el orificio apical del fragmento, aplicando presión suavemente para no dañar la mucosa intestinal. A continuación, se introdujo el intestino a modo de media a lo largo de una punta de pipeta serológica de 2 ml previamente humedecida con Krebs glucosa (figura 18). Con un bisturí con el filo desgastado y aplicando una suave presión, se separó la sección muscular del tejido y se retiró con un torunda humedecida en Krebs glucosa. Una vez retirada toda la capa muscular, con otro bisturí nuevo se abrió longitudinalmente el tejido, y se colocó sobre una placa de hielo cubierta con papel de *parafilm* con el dominio de la mucosa orientado hacia arriba (figura 18).

Tras descartar el primer centímetro de ambos extremos, se cortaron fragmentos de 7 mm de longitud para colocarlos, con la ayuda de unas pinzas de microdisección y con la cara de la mucosa orientada hacia arriba, encima de la apertura  $0,126 \text{ cm}^2$  de unas de las hemicámaras. El tejido se mantuvo en su posición con la ayuda de una goma insertada a presión y se acopló la otra hemicámara.

El reservorio de la hemicámara de la serosa se rellenó con 5 ml de Krebs glucosa para aportar una fuente de energía, mientras que la hemicámara de la mucosa se rellenó con 5 ml de Krebs manitol (KCl 461 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  114 mM,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  250 mM,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  116 mM, NaCl 115 mM,  $\text{NaHCO}_3$  22 mM,  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$  11 mM, pH 7.4) para mantener el balance osmótico sin influenciar en el transporte de glucosa mediado por  $\text{Na}^+$  (Poulsen, Fenton y Rieg, 2015). A continuación, se insertaron los electrodos y se equilibró el tejido con las soluciones durante 15 minutos antes de iniciar el experimento. Tras este tiempo, se registraron los valores basales de los parámetros eléctricos.



**Figura 18. Disección del tejido.** Con ayuda de una pipeta *pasteur* de plástico se eliminan los restos de alimento (A). Una vez limpio (B) el tejido se introduce a lo largo de una pipeta serológica de 2 ml (C). Con ayuda de un bisturí, se elimina la capa muscular (E) y el resto del tejido se corta longitudinalmente (E), de manera que el tejido queda desplegado con la mucosa orientada hacia arriba (F). Tras descartar el primer centímetro de cada extremo (G) se cortaron fragmentos de intestino de 7 mm (H) para colocarlos en las cámaras, con el lado de la mucosa expuesto hacia arriba (I).

### *9.2.3 Adición de la sonda fluorescente*

Tras equilibrar el tejido, se añadieron en la cámara de la mucosa 250  $\mu$ l de una solución de FITC dextrano de 4KDa, a una concentración final de 1000  $\mu$ g/ml y preparada en Krebs manitol. Para mantener la misma presión hidrostática en ambas cámaras se añadieron otros 250  $\mu$ l de Krebs glucosa en la cámara de la serosa. Se tomaron muestras de la cámara de la serosa a tiempo 0 y cada 15 minutos durante una hora.

Para confirmar la preservación del tejido al final del experimento, se añadió carbacol ( $10^{-5}$  mM). El carbacol es un agonista de los receptores colinérgicos por lo que su adición en un tejido sano produce liberación de iones como respuesta, lo que es detectado por los electrodos. Las muestras de tejido que no respondieron al carbacol fueron descartadas del estudio.

Entre cada experimento, las cámaras se lavaron con la ayuda de un cepillo con abundante agua destilada para eliminar restos de FITC.

Para la lectura de la fluorescencia de las muestras se preparó una recta patrón a partir de diluciones seriadas de concentraciones conocidas de FITC dextrano. La lectura se realizó en una placa opaca de 96 pocillos, a una excitación de 485 nm y emisión de 528nm, en el espectrofotómetro Infinite F200 Pro (TECAN). Las concentraciones de las muestras se obtuvieron por interpolación con los valores de la recta patrón.

## **10. Análisis estadísticos**

Para la comparación estadística entre dos grupos se aplicó un T-Test o bien un test de Mann-Whitney, para para aquellos casos con distribución normal y para datos de distribución no paramétrica, respectivamente.

Para la comparación estadística entre más de dos grupos se aplicó una ANOVA de una o dos vías para aquellos casos con distribución normal, o bien un test de Kruskal-Wallis, para datos de distribución no paramétrica, seguido en ambos casos de un test de comparaciones múltiples.

Las significaciones estadísticas se indican en los pies de cada figura. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

Los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)

---

## **RESULTADOS**

---



## Introducción a la sección de resultados

La presentación de los resultados de esta tesis se divide en cinco capítulos. De esta manera, en el capítulo 1 (*efecto de la isquemia en las poblaciones celulares del sistema inmune intestinal*) hemos analizado, a través de citometría de flujo, los cambios de poblaciones de linfocitos en muestras de lámina propia, linfocitos intraepiteliales, ganglios mesentéricos y placas de Peyer de animales isquémicos, *sham* y control sin operar, además de valorar el papel de la vía  $\beta$ -adrenérgica en la modulación de la respuesta del sistema inmune intestinal y su repercusión en la lesión cerebral mediante tratamiento con el agente  $\beta$ -bloqueante propranolol.

Visto el papel de la microbiota intestinal en el ictus, en el capítulo II (*efecto de la isquemia en la microbiota intestinal*) hemos estudiado los cambios de poblaciones de las bacterias y de sus metabolitos en muestras de heces y ciego de animales operados y *sham*. También hemos explorado el potencial papel modulador del propranolol y del fármaco LED209 en las poblaciones bacterianas, así como su posible efecto en el volumen del infarto (esto último, estudiado en el capítulo V de resultados, *modulación de la lesión cerebral mediante tratamiento farmacológico*).

En el capítulo III (*translocación bacteriana después de la isquemia cerebral*) exploramos la translocación bacteriana en muestras de diferentes órganos procedentes de animales isquémicos y *sham*, tanto tratados con el fármaco propranolol como con LED209, mediante cultivo en placa. Además, utilizando bacterias con capacidad bioluminiscente, investigamos la posibilidad del desplazamiento de bacterias desde el intestino hacia órganos extra-intestinales después del ictus.

Finalmente, dada la función de la barrera intestinal en la translocación de bacterias y la infección, en el capítulo IV (*disfunción intestinal después de la isquemia cerebral*) hemos analizado el estado de las uniones del intestino mediante técnicas de valoración de permeabilidad intestinal tanto *in vivo* como *ex vivo*.

Previamente a estos resultados, fue necesario realizar un cambio del modelo de isquemia transitoria focal que nos permitió reducir los efectos sistémicos de la anestesia (este aspecto se aborda dentro del capítulo I de resultados).



---

**RESULTADOS. CAPÍTULO I: efecto de la isquemia en las poblaciones  
celulares del sistema inmune intestinal**

---

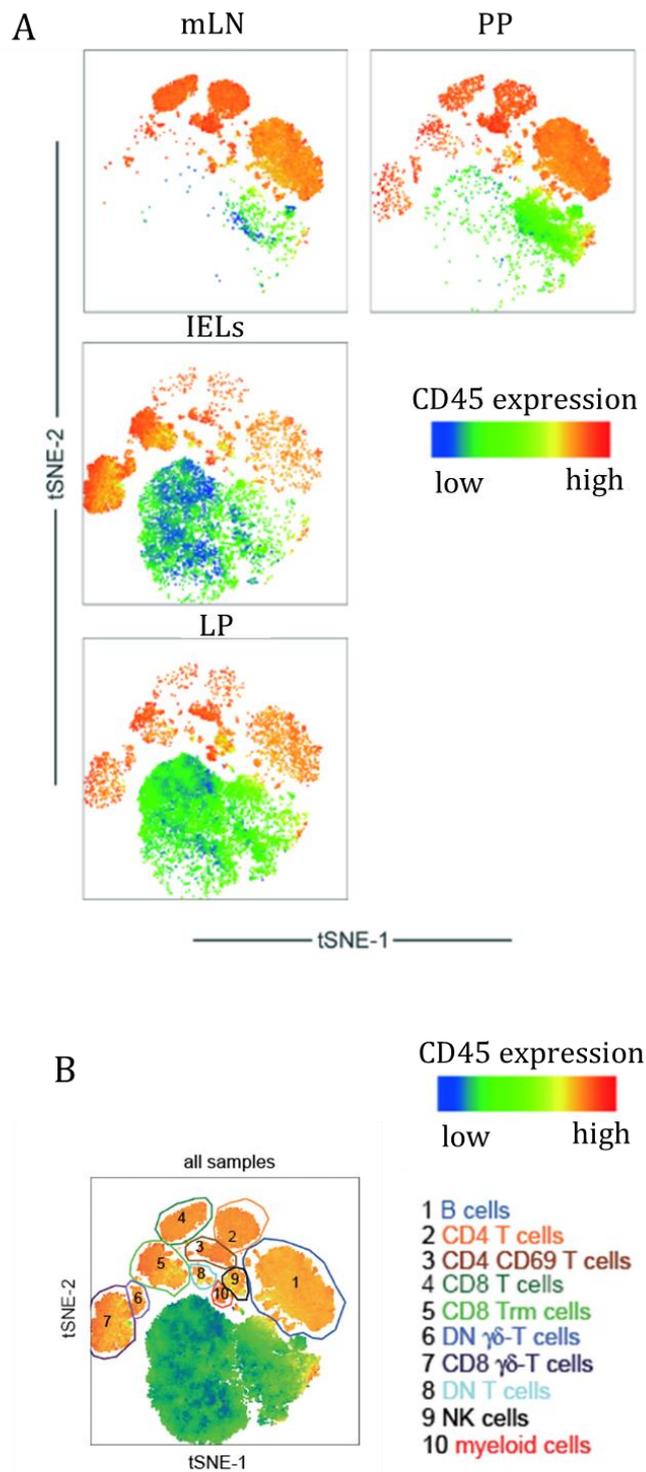


## 1.1 Distribución de leucocitos del sistema inmune intestinal por regiones

Basándonos en los diferentes marcajes de poblaciones leucocitarias indicados en el apartado [3.6 de materiales y métodos](#), realizamos un análisis de distribución y presencia de células inmunes en intestino mediante un análisis por tSNE (*t-distributed stochastic neighbour embedding*) en las diferentes regiones intestinales estudiadas: ganglios mesentéricos (mLN), placas de Peyer (PP), linfocitos intraepiteliales (IELs) y lámina propia (LP).

Los tejidos presentan distintos *clústers* de células (figura 19A). Los mLN y las PP son regiones linfoides altamente enriquecidos en células leucocitarias (correspondientes a una alta expresión de CD45), mientras que los IELS y la LP presentan células estromales, con menor expresión de CD45 (figura 19A).

Sobre esta visualización por tSNE se han identificado las diferentes poblaciones leucocitarias mediante estrategia de *gating* manual (materiales y métodos sección 3.6). Si trasladamos las observaciones de la figura 19B a la figura 19A, vemos que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y los linfocitos B (grupos 1 y 2, respectivamente) están presentes mayoritariamente en PP y mLN, mientras que los IELS y la LP están menos enriquecidos en estas poblaciones. Además, observamos que los IELS están altamente enriquecidas en las poblaciones CD8 *tissue resident memory* (Trm), células T  $\gamma\delta$  doble negativas y células T  $\gamma\delta$  CD8.



**Figura 19. Distribución de las diferentes poblaciones de células linfoides en ganglios mesentéricos (mLN), placas de Peyer (PPs), linfocitos intraepiteliales (IELs) y lámina propia (LP).** El análisis se ha realizado mediante algoritmo tSNE, sobre la muestra resultante de la concatenación de todas las muestras correspondientes a animales control sin operar (n=4), animales *sham* (n=6) y animales isquémicos (n=6). **(A):** visualización por tejido; **(B):** identificación de las poblaciones leucocitarias basado en el *gating* manual.

## 1.2 Efecto de la anestesia sobre las poblaciones linfocitarias intestinales

Una vez analizada la presencia de las diferentes poblaciones leucocitarias en las diferentes regiones intestinales nos preguntamos si estas cambian con la isquemia. Los primeros análisis de citometría de flujo que realizamos para estudiar el comportamiento de las poblaciones del sistema inmune se hicieron después de causar el infarto cerebral aplicando el modelo de isquemia intraluminal “tMCAo dormido”, procedimiento estandarizado en el laboratorio. En este modelo, tanto los animales *sham* como isquémicos permanecen bajo condiciones de anestesia inhalada, incluyendo los 45 minutos de oclusión (figura 21A). Dos días más tarde, analizamos en diferentes regiones del intestino delgado las poblaciones leucocitos totales por el marcador CD45, y su separación en células T por el marcador CD3. Además, dentro de las células T analizamos las poblaciones CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD8 $\gamma\delta$ , y linfocitos T  $\gamma\delta$  doble negativos (CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>).

El estudio de los leucocitos totales identificados por CD45 en las diferentes regiones intestinales no reveló cambios asociados a la isquemia en placas de Peyer, ganglios mesentéricos y lamina propia en comparación con los animales controles sin operar (figura 20). Sin embargo, en los IELs, región altamente enriquecida en leucocitos, detectamos una marcada leucopenia por disminución de células CD45<sup>+</sup>, en los grupos *sham* e isquémico en comparación con los animales controles sin operar (figura 20). Esta leucopenia afectó principalmente a las células T CD8<sup>+</sup>, las más abundantes entre los IELs, y también se vieron afectadas las poblaciones de linfocitos CD8 $\gamma\delta$ , y linfocitos T  $\gamma\delta$  (figura 21B).

Estos resultados indican que el estrés quirúrgico al que se ven sometidos los animales en el modelo tMCAo dormido produce cambios en las poblaciones del sistema inmune intestinal que no son atribuibles a los efectos de la isquemia.

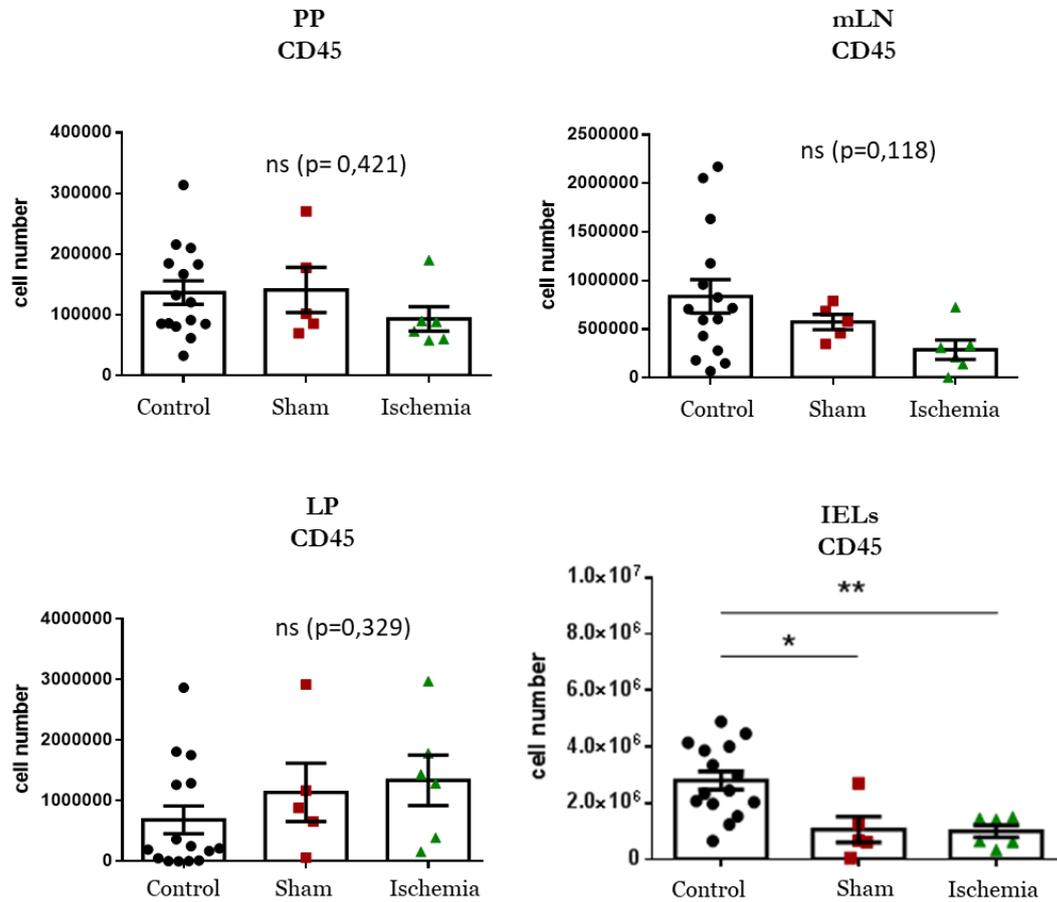
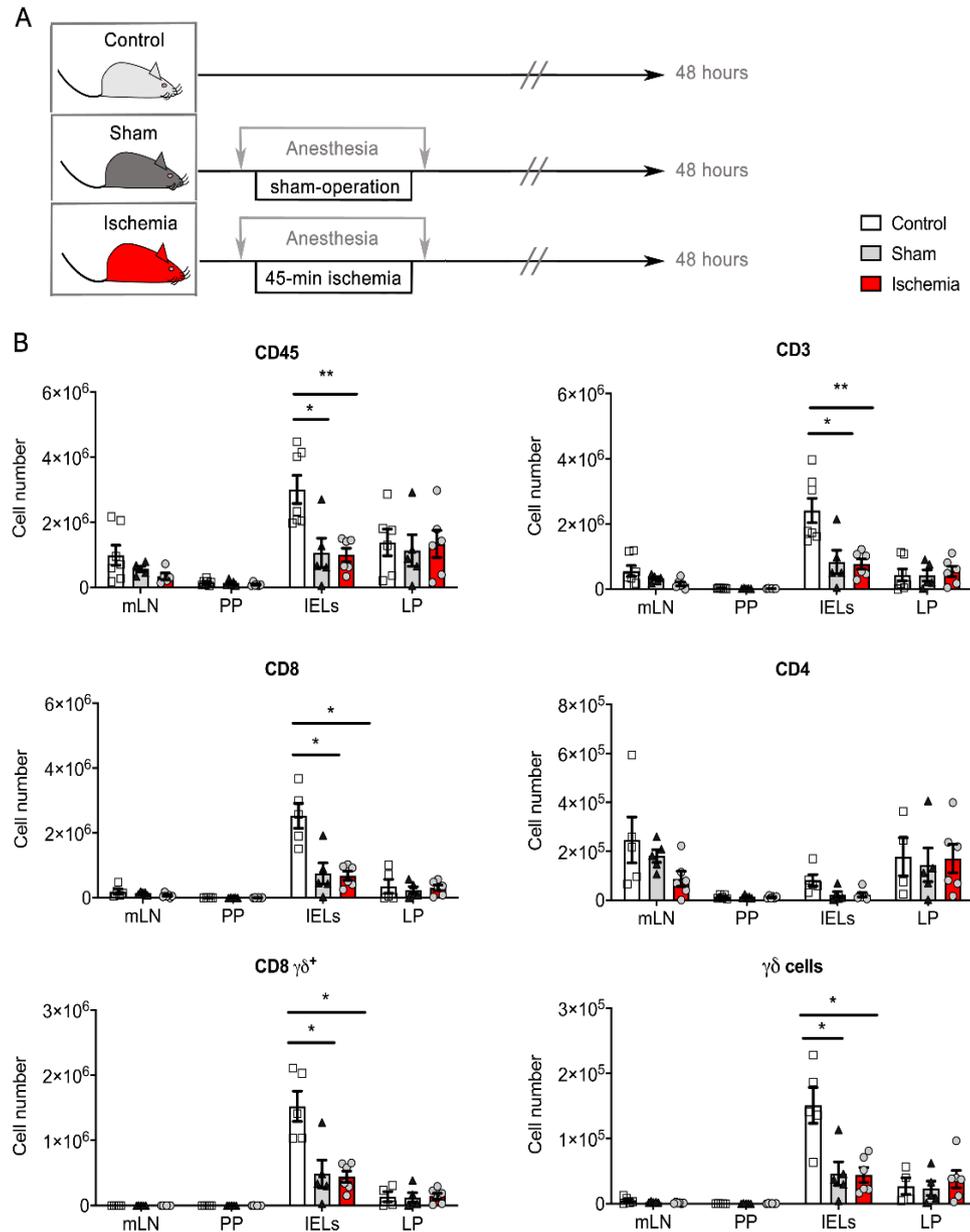


Figura 20. En el modelo tMCAo dormido el ictus no produce cambios en el número total de leucocitos en PP, mLN y LP, pero sí en los IELs. Control, n=15; sham, n=5; isquemia, n=6. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por ANOVA de una vía, seguido del test de Sidak para comparaciones múltiples. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



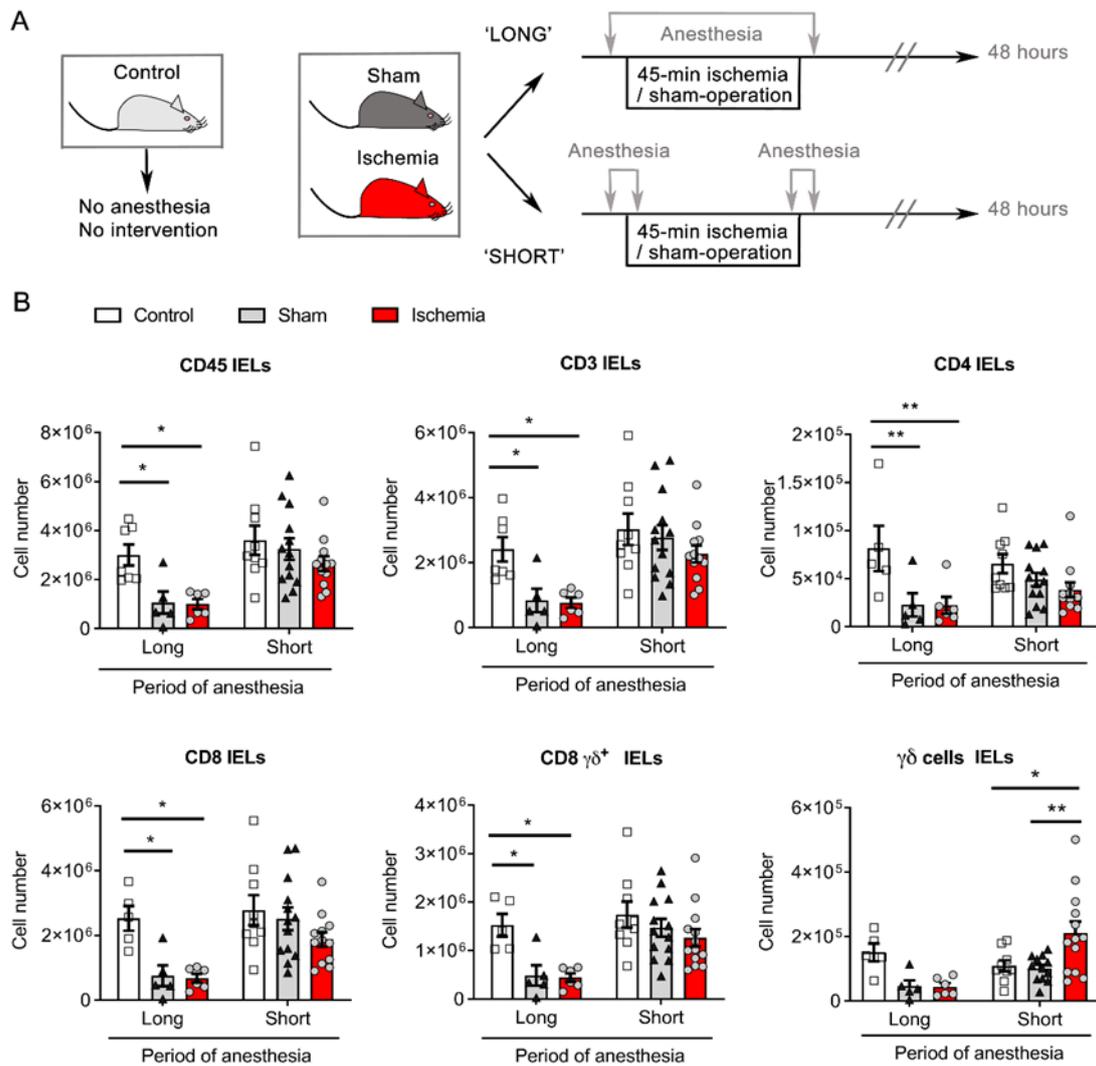
**Figura 21. Efectos de la anestesia en los IELs.** (A): ilustración del modelo dormido, en el que se muestra que tanto animales *sham* como animales isquémicos permanecen bajo los efectos de la anestesia durante el periodo de oclusión (45 minutos). (B): número de células de diferentes poblaciones de linfocitos T en cada región intestinal. Destaca la linfopenia en los IELs. Control, n=5-7; *sham*, n=5; isquemia, n=6. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por ANOVA de dos vías (control, *sham* o isquémico) y por región, seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

### **1.3 Adecuación del modelo experimental para minimizar el efecto de la anestesia**

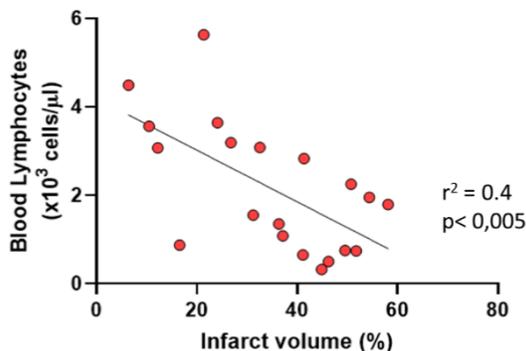
Dado el efecto *sham* y, por tanto, la dificultad de identificar modificaciones verdaderamente asociadas a la isquemia, decidimos explorar nuevas opciones que nos permitiesen reducir dichos efectos. Estudios previos habían advertido de efectos sistémicos causados por el uso prolongado de la anestesia inhalada en modelos de isquemia cerebral (Denes *et al.*, 2011, 2014). Así, decidimos modificar el modelo convencional de isquemia intraluminal que se había estado realizando en el laboratorio (modelo “tMCAo dormido”) despertando al ratón durante el periodo de oclusión (modelo “tMCAo despierto”), distinguiendo dos periodos de anestesia separados por el tiempo de oclusión, de forma que el tiempo de exposición a la anestesia al que se verían sometidos los animales fuera menor que en el modelo dormido (figura 22A). El análisis de las poblaciones linfocitarias del sistema inmune tras la aplicación de este modelo mostró que no se producía linfopenia en los IELs (figura 22B), ya que no observamos diferencias entre los animales controles sin operar y los ratones *sham*. Detectamos un aumento en las células T $\gamma\delta$  después de la isquemia que no se observó en los animales *sham* ni tampoco en los animales isquémicos del modelo dormido.

Además, analizamos la cantidad de linfocitos en muestras de sangre de animales isquémicos operados bajo el modelo tMCAo despierto a través del sistema de hematología ADVIA2120i (Siemens) del laboratorio Core, del Centro de Diagnóstico Médico del Hospital Clínic. Observamos que aquellos animales con mayor volumen de infarto mostraban también un menor número de linfocitos en sangre (figura 23), conforme se había descrito previamente (Urrea *et al.*, 2009; Salas-Perdomo *et al.*, 2018).

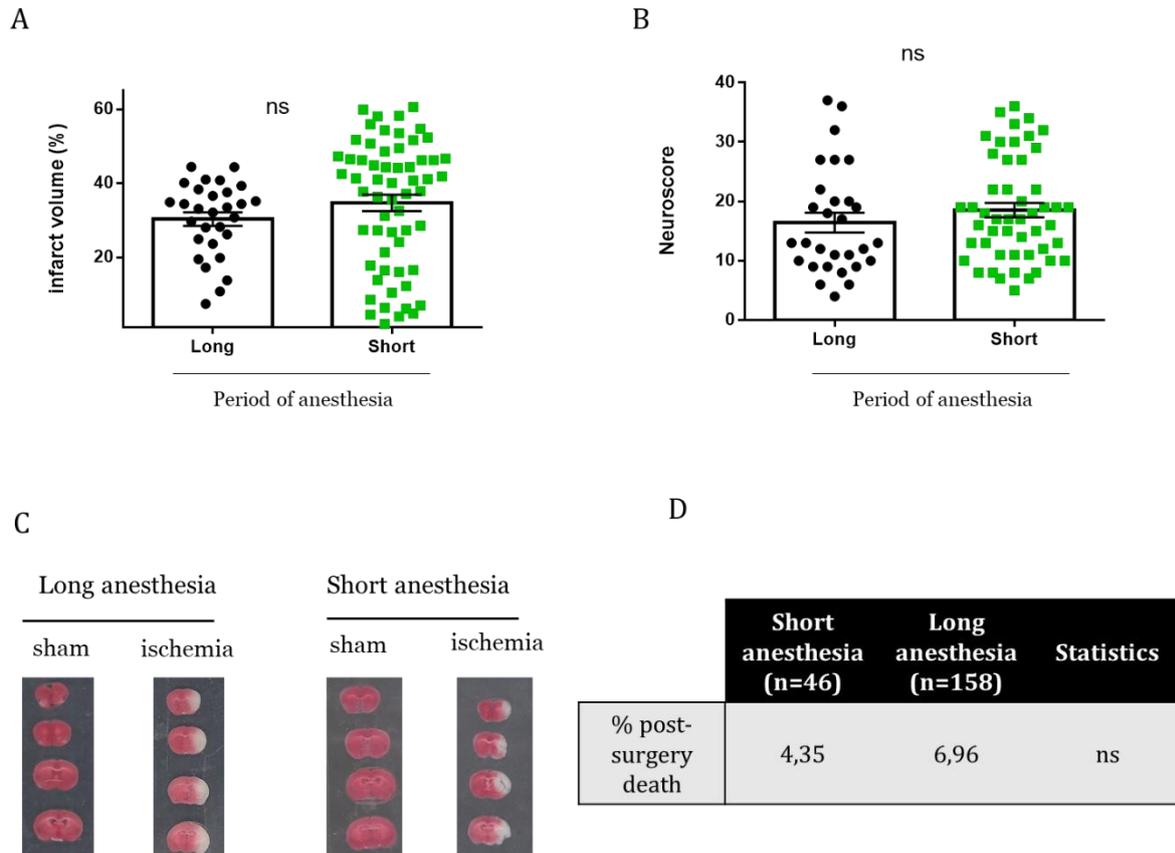
A la luz de los resultados observados por citometría, realizamos los siguientes experimentos aplicando la metodología de cirugía del modelo tMCAo despierto, no sin antes confirmar que el cambio de modelo no producía cambios ni en el volumen de infarto (figura 24A), ni en deficiencias neurológicas medidas por *neuroscore* (figura 24B), ni en el porcentaje de animales que morían después de la cirugía, antes de la finalización del experimento (figura 24D). Del mismo modo que en el modelo tMCAo dormido, los animales *sham* no desarrollan infarto (figura 24C).



**Figura 22. La disminución de la anestesia revierte la linfopenia observada en el modelo dormido en los IELs. (A):** tiempo de exposición a la anestesia en los grupos *sham* e isquémico del modelo tMCAo dormido (*long anesthesia*) y el modelo tMCAo despierto (*short anesthesia*). **(B):** linfopenia en los IELs en diferentes poblaciones de linfocitos T. Control, n=9; *sham*, n=13; isquemia, n=13. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por ANOVA de dos vías por grupo (control, *sham* o isquémico) y por modelo (*long vs short*) seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples. \* p<0.05, \*\* p<0.01.



**Figura 23. Correlación entre el volumen de infarto y los linfocitos detectados en sangre en animales isquémicos del modelo tMCAo despierto.**



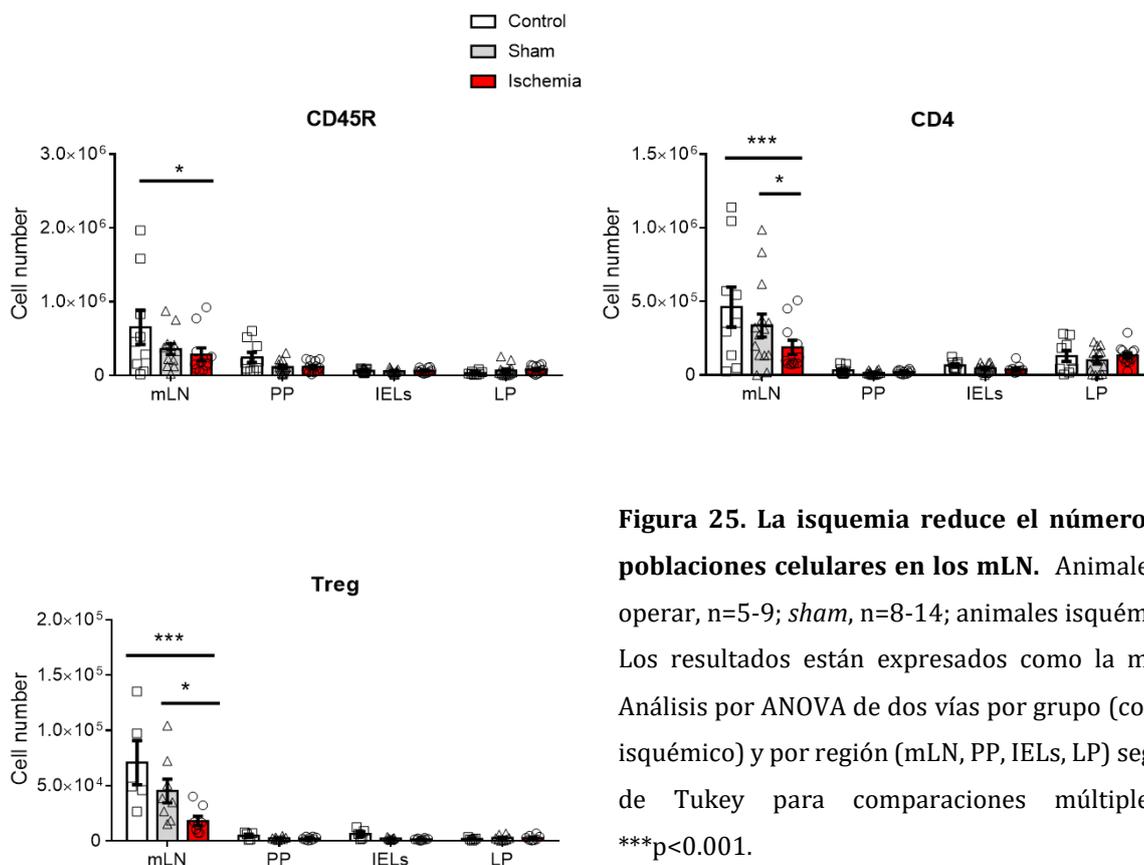
**Figura 24.** El cambio de modelo tMCAo dormido (*long anesthesia*) al modelo tMCAo despierto (*short anesthesia*) no afecta al volumen de infarto, *neuroscore*, ni al porcentaje de mortalidad post-operatoria. **(A):** volumen de infarto de los animales isquémicos del modelo de isquemia transitoria bajo condiciones continuadas de anestesia (*long*) y en el modelo de isquemia despertando al animal (*short*). Animales isquémicos del modelo tMCAo dormido, n =29; animales isquémicos del modelo tMCAo despierto, n=60. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por T-Test. **(B):** comparación del *neuroscore* de los animales isquémicos entre el modelo tMCAo dormido y despierto. Animales isquémicos del modelo tMCAo dormido, n=29; animales del modelo tMCAo despierto, n= 50. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por Mann-whitney. **(C):** el cambio del modelo no afecta a los animales *sham*; **(D):** porcentaje de supervivencia entre ambos modelos. Análisis por Mantel-Cox test.

Estos resultados indican que la operación *sham* para el modelo de 45 minutos de tMCAo con anestesia durante todo el proceso, produce cambios en las poblaciones del sistema inmune intestinal. Esos cambios pueden evitarse al interrumpir la exposición con la anestesia y reduciendo el tiempo de contacto con la misma, lo que sugiere que una anestesia prolongada altera la respuesta del sistema inmune intestinal, y que por tanto, los modelos experimentales de isquemia pueden introducir artefactos atribuibles a periodos largos de exposición a la anestesia.

#### **1.4 Poblaciones intestinales de linfocitos T y B y su estado funcional**

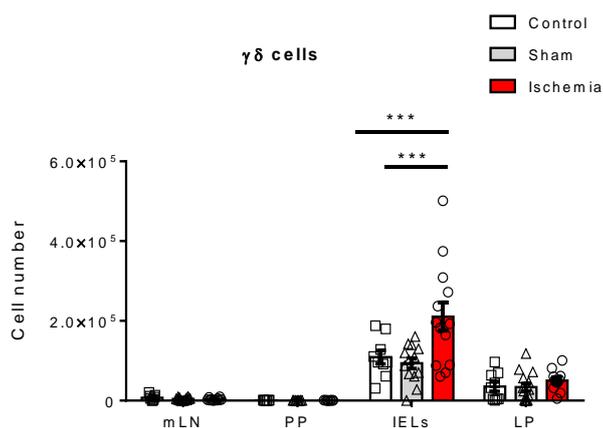
Tras minimizar el efecto *sham* mediante el cambio de modelo de isquemia, analizamos nuevamente las poblaciones de linfocitos B y T, con especial atención en éstos últimos para identificar qué consecuencias tiene la isquemia en las poblaciones de células inmunes intestinales que no se han descrito previamente.

Los animales isquémicos mostraron una reducción de los linfocitos en varias regiones intestinales 48 horas después de la reperusión. Los principales cambios los encontramos en los mLN, en los que detectamos una disminución en el número de células B (CD45R<sup>+</sup>), linfocitos T CD4<sup>+</sup> y células T reguladoras (Treg) (figura 25), mientras que el número de células T $\gamma\delta$  aumenta en los IELs (figura 26).

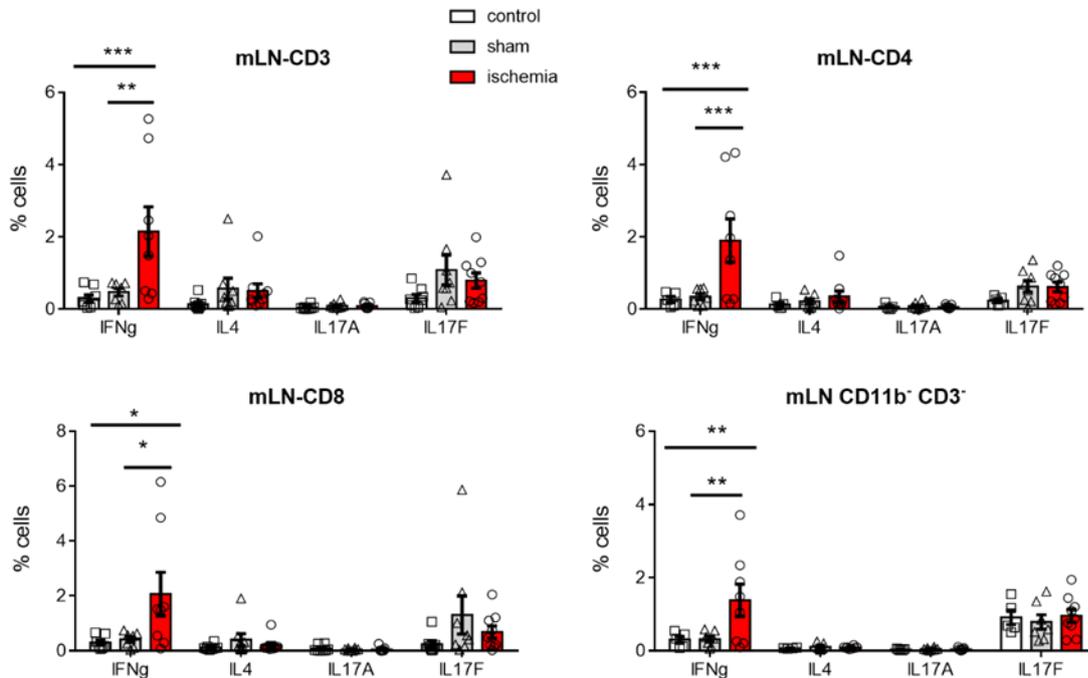


**Figura 25. La isquemia reduce el número de algunas poblaciones celulares en los mLN.** Animales control sin operar, n=5-9; sham, n=8-14; animales isquémicos, n=9-13. Los resultados están expresados como la media ± SEM. Análisis por ANOVA de dos vías por grupo (control, sham o isquémico) y por región (mLN, PP, IELs, LP) seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples. \*p<0.05; \*\*\*p<0.001.

**Figura 26. La isquemia aumenta el número de células Tγδ en los IELs.** Animales control sin operar, n=9; sham, n=13-14; animales isquémicos, n=13. Los resultados están expresados como la media ± SEM. Análisis por ANOVA de dos vías por grupo (control, sham o isquémico) y por región (mLN, PP, IELs, LP) seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples. \*\*\*p<0.001.

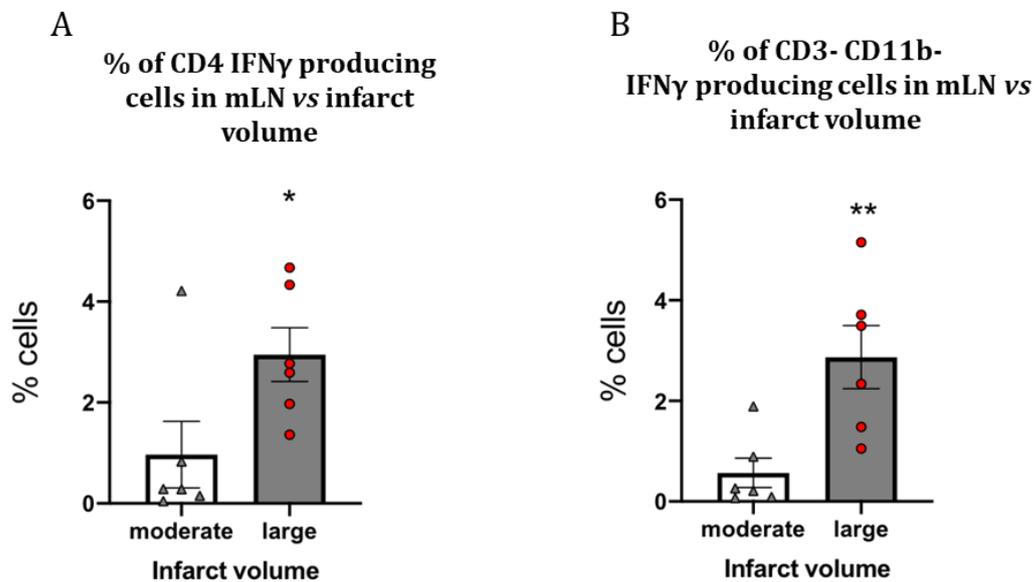


A nivel funcional, las células CD3<sup>+</sup>, sus subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> así como la población CD3<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> de los ganglios mesentéricos producían más interferón gamma (IFN $\gamma$ ) después del ictus, pero no interleucinas (IL) 4, 17A y 17F (figura 27).



**Figura 27. La isquemia aumenta el porcentaje de diferentes células productoras de IFN $\gamma$  en los mLN.** Animales control sin operar, n=5-8, sham, n=7-8, animales isquémicos, n=8-9. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por ANOVA de dos vías por grupo (control, sham o isquémico) y por citoquinas, seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

Nos planteamos si podría haber diferencias en el número de células detectadas en las diferentes regiones intestinales así como en la producción de citocinas de los ganglios mesentéricos según el volumen de infarto. Realizamos una dicotomización por volumen de infarto, utilizando un umbral que permitiera disponer 50% de los animales en un grupo de infarto moderado (con volumen inferior al 40%) y el otro 50% en un grupo de animales con mayor volumen (igual o superior al 40%). A través de esta dicotomización en grupos detectamos que el mayor porcentaje en la producción de IFN $\gamma$  por parte tanto de células T CD4<sup>+</sup> como de células CD3<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> en los mLN lo presentaban los animales con mayor volumen de infarto (figura 28A y 28B, respectivamente).



**Figura 28. La producción de IFN $\gamma$  en los mLN depende del volumen de infarto. (A):** porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> productoras de IFN $\gamma$  en mLN; **(B):** porcentaje de células CD3<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> productoras de IFN $\gamma$  en mLN. Animales con infarto moderado, n=6; animales con infarto grande, n=6. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por T-Test. \*p<0.05; \*\*p<0.01.

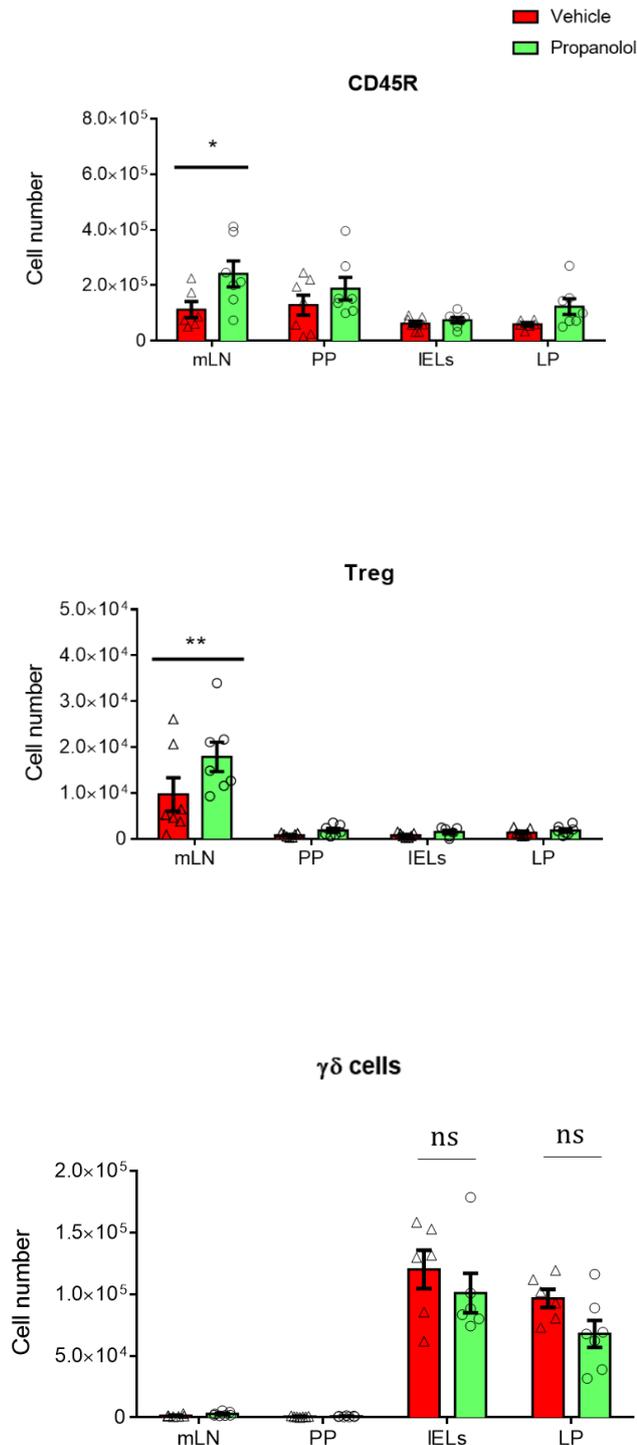
### 1.5 Efecto del tratamiento con propranolol

Teniendo en cuenta los cambios inmunológicos observados en las diferentes regiones intestinales, especialmente en los ganglios mesentéricos, estudiamos el papel de la vía  $\beta$ -adrenérgica y su contribución en la inmunomodulación intestinal después del ictus. Esta vía está implicada en la inmunodepresión asociada al ictus y a la susceptibilidad a la infección (Prass *et al.*, 2003). Se ha visto que el fármaco propranolol, un agente antagonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, previene dicha inmunosupresión (Prass *et al.*, 2003) y también reduce la carga bacteriana en varios órganos después del ictus (Prass *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2016; McCulloch, Smith y McColl, 2017).

Para ello, administramos propranolol o su vehículo en animales isquémicos justo antes de la intervención quirúrgica y a las 4, 8, 12, 24, 28, 32 y 36 horas post-reperusión.

Observamos que mientras que en los animales isquémicos tratados con vehículo se mantenía una disminución del número de células CD45<sup>+</sup>CD45R<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, y Treg de los mLN, en los animales tratados con

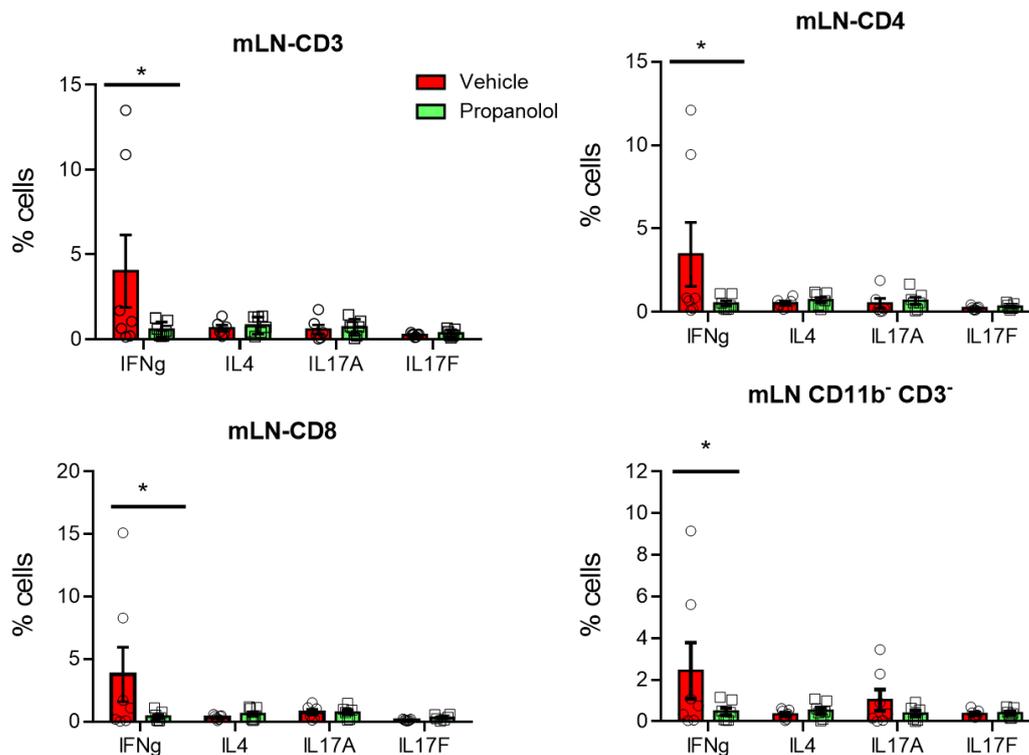
propranolol esta situación revertía (figura 29). Por el contrario, el aumento en el número de células  $T\gamma\delta$  producido por la isquemia no disminuyó tras el tratamiento con propranolol (figura 30).



**Figura 29. El tratamiento con propranolol previene los cambios inmunes en ganglios mesentéricos.** Animales tratados con vehículo, n=6-7; animales tratados con propranolol, n=7. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por ANOVA de dos vías por grupo (propranolol o vehículo) y por región, seguido del test de Sidak para comparaciones múltiples. \*p<0.05; \*\*p<0.01.

**Figura 30. El tratamiento con propranolol no previene el aumento de células  $T\gamma\delta$  en los IELs después de la isquemia.** Animales tratados con vehículo, n=7; animales tratados con propranolol, n=7. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por ANOVA de dos vías por grupo (propranolol o vehículo) y por región, seguido del test de Sidak para comparaciones múltiples.

Además, el tratamiento con propranolol evitó el aumento de IFN $\gamma$  observado en las poblaciones de los linfocitos CD3 $^+$ , y en sus subpoblaciones CD4 $^+$  y CD8 $^+$ , así como en la población CD11b $^-$ CD3 $^-$  de los mLN (figura 31). Por tanto, concluimos que las alteraciones inmunológicas observadas en los mLN son dependientes de la señalización  $\beta$ -adrenérgica, mientras que las alteraciones en los IELs no lo son.



**Figura 31. El tratamiento con propranolol evita el aumento en el porcentaje de diferentes células productoras de IFN $\gamma$  en los mLN.** Animales tratados con vehículo, n=7; animales tratados con propranolol, n=7. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por ANOVA de dos vías por grupo (propranolol o vehículo) y por citoquina, seguido del test de Sidak para comparaciones múltiples. \*p<0.05.

### 1.6 Resumen de resultados del capítulo I

En este capítulo se ha evaluado la respuesta de las células del sistema inmune intestinal, con especial atención sobre los linfocitos T, no sin antes detectar el efecto *sham* producido por la anestesia y que encubría los cambios verdaderamente debidos a la isquemia. Además, se ha analizado el papel de la vía  $\beta$ -adrenérgica en el restablecimiento de dichos cambios.

Así, hemos observado que la anestesia induce cambios en las poblaciones leucocitarias de los IELs. Una vez modificado el modelo, despertando al animal durante el tiempo de oclusión, y tras confirmar que el

cambio no afecta a nivel neurológico ni a nivel de volumen de infarto ni tampoco al porcentaje de mortalidad, y manteniéndose la linfopenia en circulación previamente descrita en la literatura, observamos que uno de los principales efectos de la isquemia ocurre a nivel de mLN, en los que se detecta una disminución de linfocitos B y linfocitos T CD4<sup>+</sup> y Treg en los animales isquémicos. Además, en los IELs detectamos un aumento de linfocitos T $\gamma\delta$ . A nivel funcional, comprobamos que el mayor efecto de la isquemia se da en los mLN, con una sobreproducción de la citocina proinflamatoria IFN $\gamma$  por parte de varias poblaciones linfocitarias. Además, los valores más altos esta citocina se detectaron en aquellos animales con mayor volumen de lesión isquémica.

La inhibición de la vía  $\beta$ -adrenérgica con el fármaco propranolol evitó la disminución del número de linfocitos y la producción de citocinas que se había visto alterada en los mLN.



---

**RESULTADOS. CAPÍTULO II: efecto de la isquemia en la microbiota  
intestinal**

---



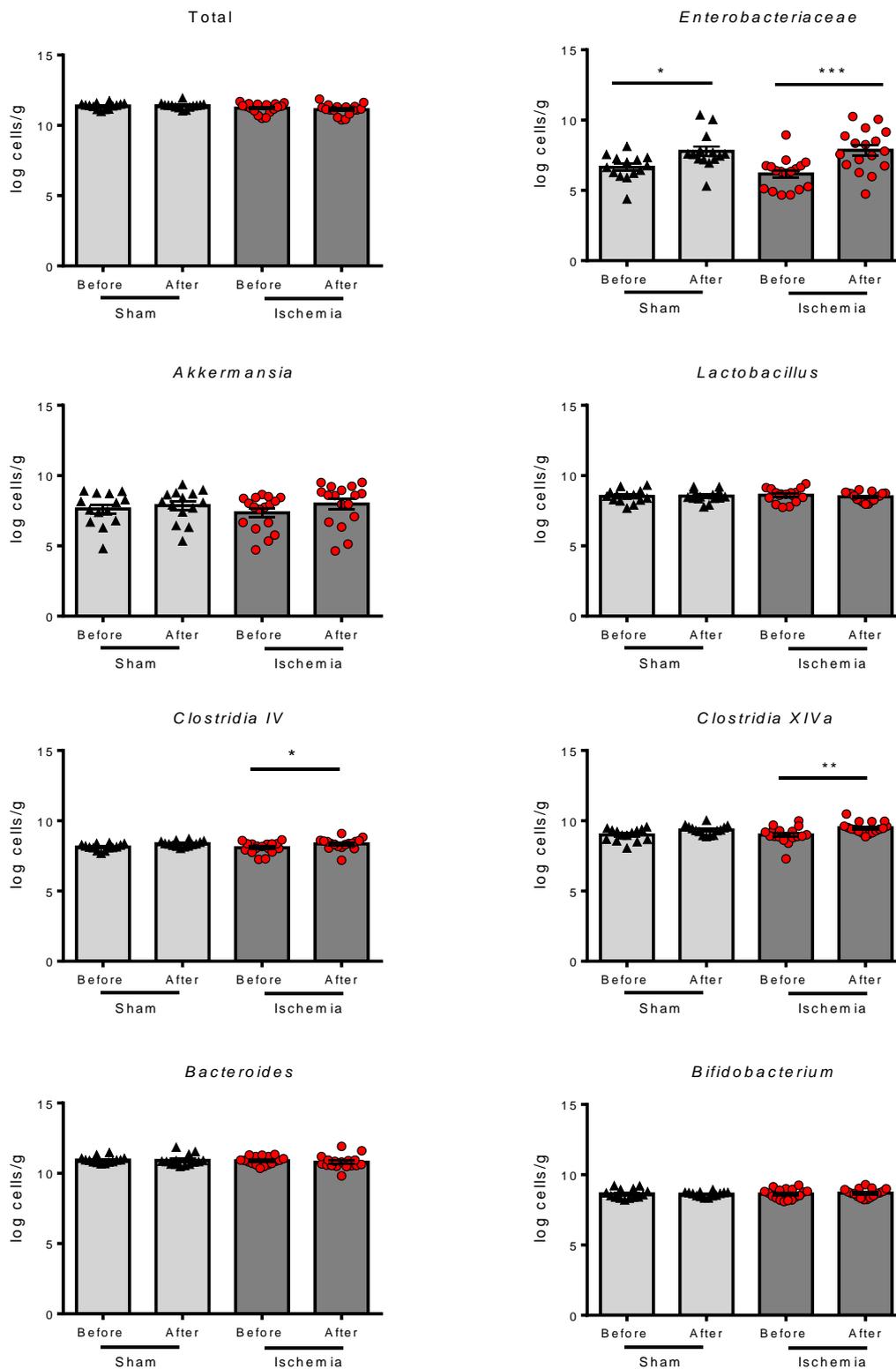
## 2.1 Efecto de la anestesia sobre las poblaciones bacterianas y la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)

Estudios previos habían sugerido que las poblaciones bacterianas intestinales experimentaban cambios en su composición en respuesta al ictus (Singh *et al.*, 2016; Sychala *et al.*, 2018), por lo que quisimos confirmarlo en nuestras muestras. En el [capítulo 1.2 de resultados](#) se confirmó el efecto de la anestesia sobre las poblaciones intestinales de linfocitos. Con el fin de evaluar si la anestesia causaba alguna afectación a nivel de poblaciones microbianas y su metabolismo, analizamos el contenido de diferentes poblaciones bacterianas mediante PCR cuantitativa, y la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, por sus siglas en inglés) mediante cromatografía de gases, en las muestras de heces y ciego de los ratones isquémicos y *sham*, antes y después de la cirugía y que habían sido sometidos al modelo tMCAo dormido, con exposición continua a anestesia inhalada.

Observamos un efecto *sham* en las poblaciones de enterobacterias en muestras de heces, ya que aumentaban tanto en los animales *sham* como en los isquémicos (figura 32), mientras que en el ciego no se observó ningún aumento de estas bacterias (figura 33). El grupo de bacterias *Clostridia* clúster IV y XIVa mostró un aumento significativo en muestras de heces después de la isquemia que no se observó en los animales *sham* (figura 32). Estas poblaciones también se vieron aumentadas en muestras de ciego (figura 33).

En cuanto a la producción de SCFAs, observamos una disminución de ácido butírico en los animales isquémicos, tanto en muestras de heces como en muestras de ciego (figura 34). El resto de los ácidos grasos analizados (propiónico y acético) no se vieron alterados tras la isquemia (figura 34).

Estos resultados muestran que las poblaciones de enterobacterias se ven afectadas por la propia intervención, mientras que en otras poblaciones de bacterias, así como en la producción de SCFAs, se observan cambios atribuibles a la isquemia que no se detectan en muestras de animales *sham*. Dado que decidimos aplicar un cambio del modelo en base a los resultados observados en la sección 1.2 del capítulo I de resultados, los análisis de bacterias y de sus metabolitos que continúan en los siguientes capítulos se realizaron a partir de muestras de animales operados bajo el modelo tMCAo despierto.



**Figura 32.** En el modelo tMCAo dormido las poblaciones de *Clostridia IV* y *XIVa* aumentan después de la isquemia en muestras de heces. Animales sham, n=14; animales isquémicos, n=17. Los resultados están expresados como la media ± SEM. Análisis por ANOVA de dos vías (sham e isquemia) y por tiempo (antes y después), seguido del test de Sidak para comparaciones múltiples. \*p<0.05; \*\*p<0.01.

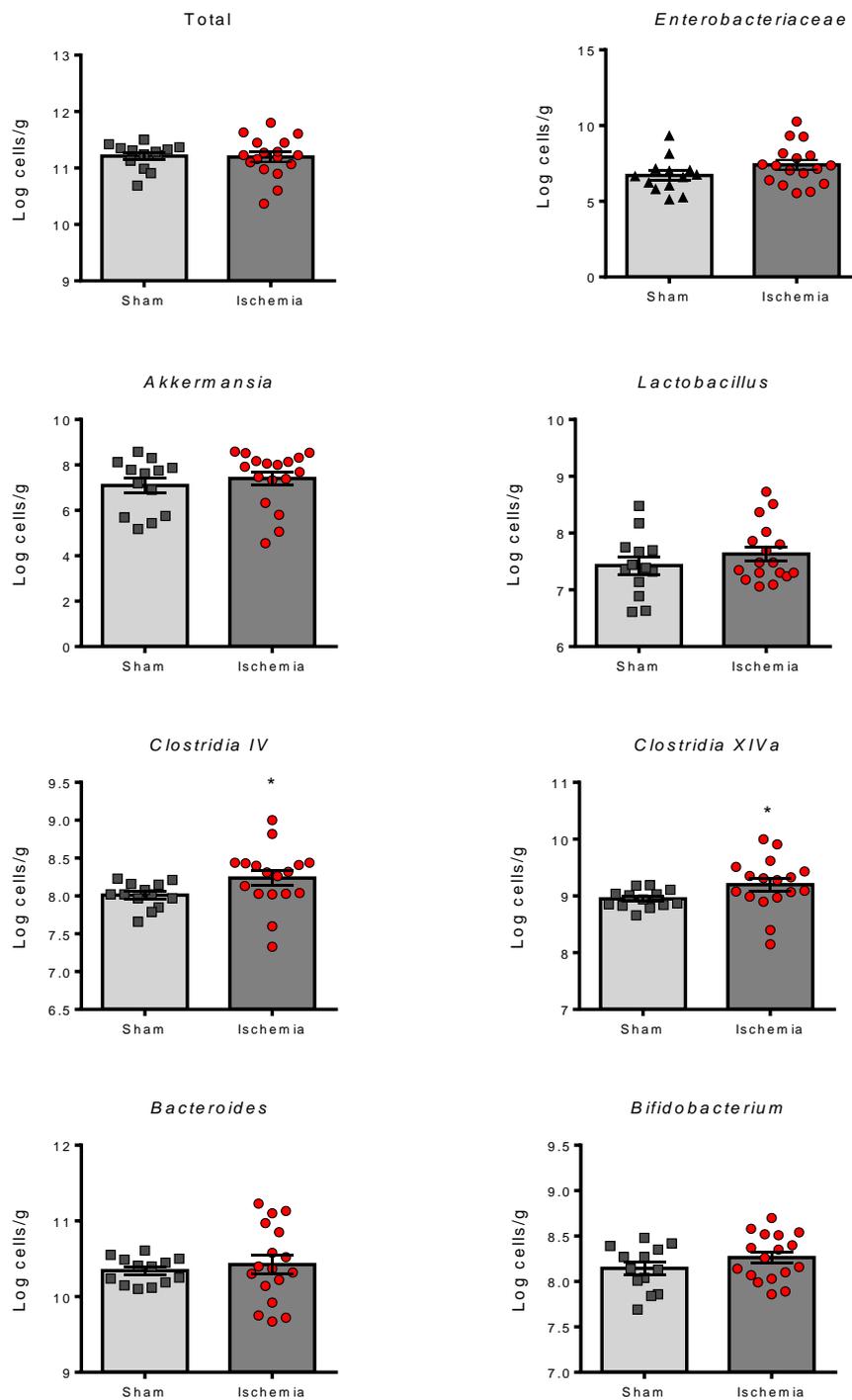
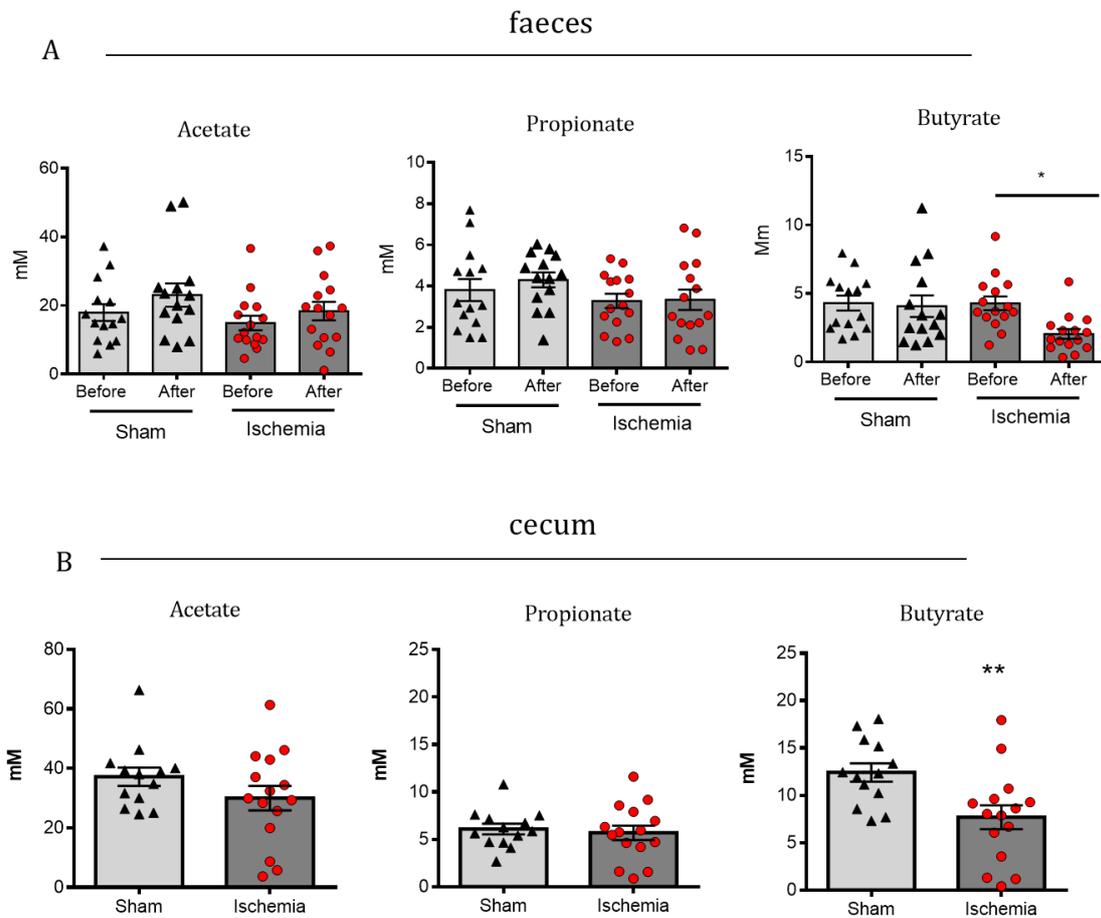


Figura 33. En el modelo tMCAo dormido las poblaciones de *Clostridia IV* y *XIVa* aumentan en muestras de ciego después de la isquemia. Animales sham, n=13; animales isquémicos, n=17. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por T-Test. \*p<0.05.



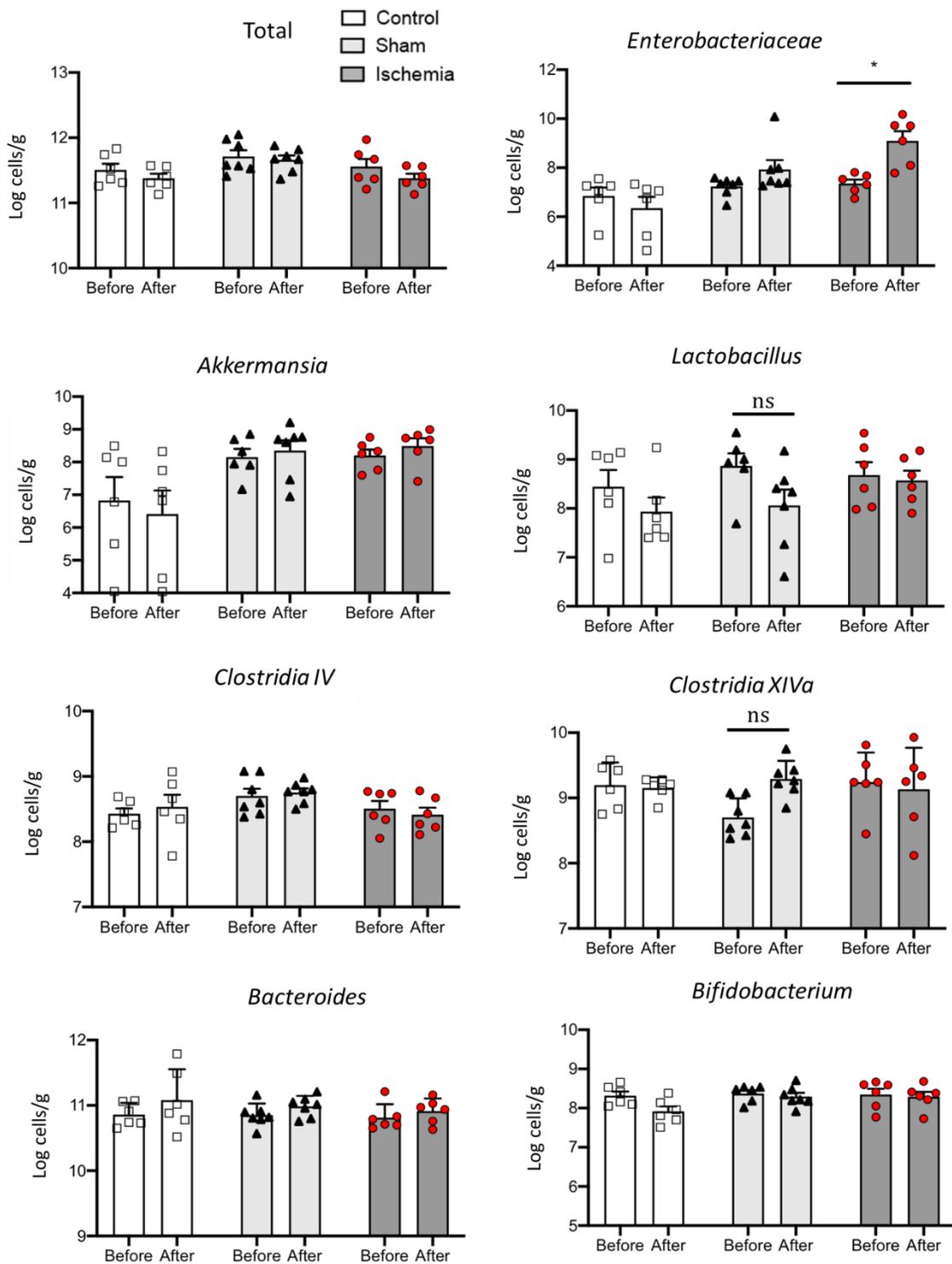
**Figura 34. En el modelo tMCAo dormido disminuye la concentración de ácido butírico en muestras de heces y ciego. (A):** concentraciones de ácidos grasos en muestras de heces; **(B):** concentraciones de ácidos grasos en muestras de ciego. Animales *sham*, n=13-14; animales isquémicos, n=15. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. El análisis de los ácidos grasos en heces se realizó por ANOVA de dos vías (*sham* e isquemia) y por tiempo (antes y después), seguido del test de Sidak para comparaciones múltiples. El análisis en muestras de ciego se realizó por T-Test. \* $p < 0.05$ .

## **2.2 Cambios en las poblaciones bacterianas y SCFAs en heces y en ciego después del ictus**

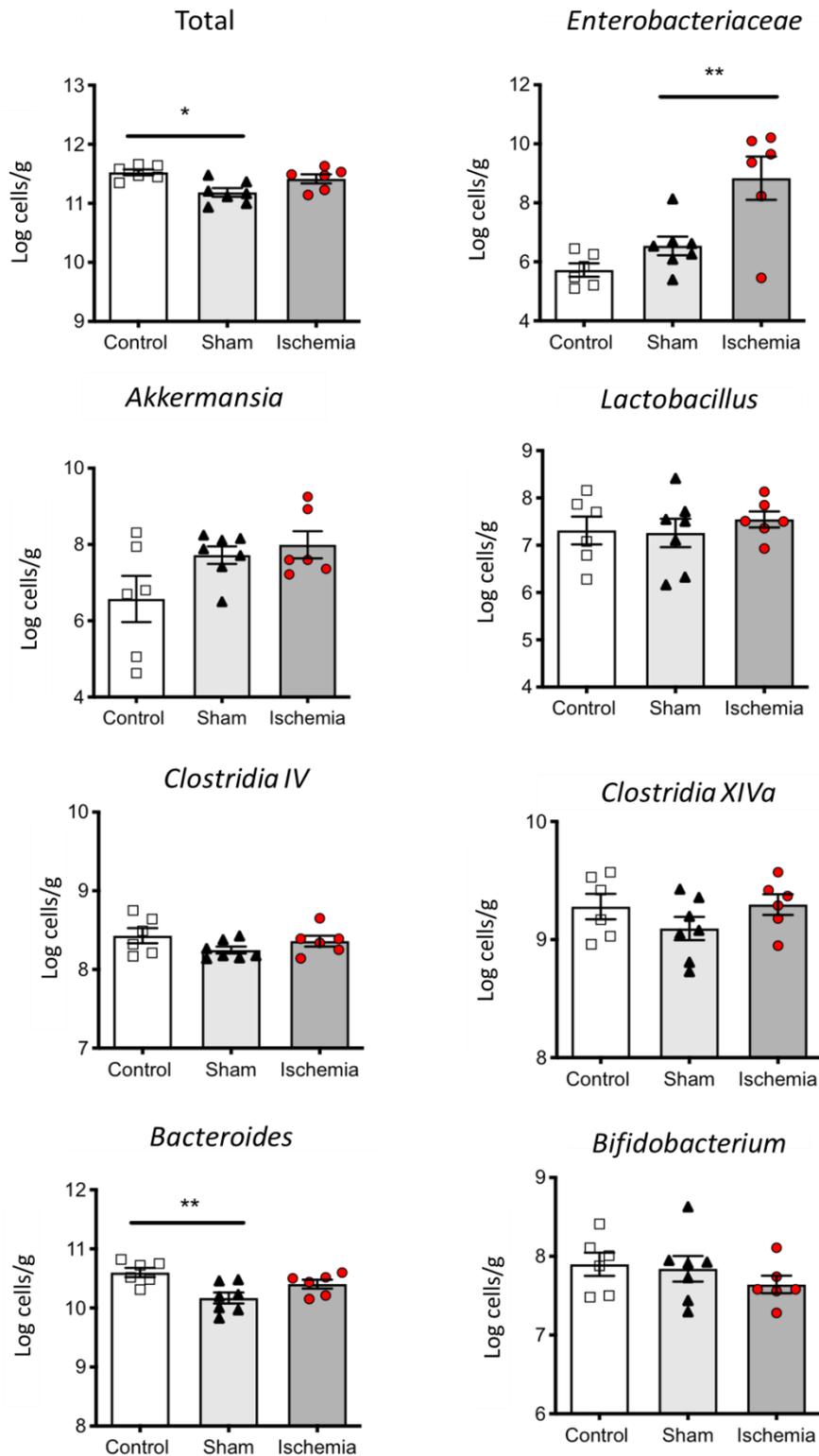
Dado los [resultados de citometría descritos en el capítulo 1.4](#), ya con la aplicación del modelo tMCAo despierto, quisimos comprobar si la disminución en células T observada en los mLN, además del aumento de citocinas proinflamatorias como el IFN $\gamma$ , podría tratarse de una respuesta inmunitaria frente a una desregulación del contenido de las poblaciones bacterianas.

Analizamos diferentes poblaciones bacterianas y la producción de SCFAs a partir de muestras de heces, antes y después de la cirugía, y de ciego de ratones controles (sin operar), *sham* e isquémicos.

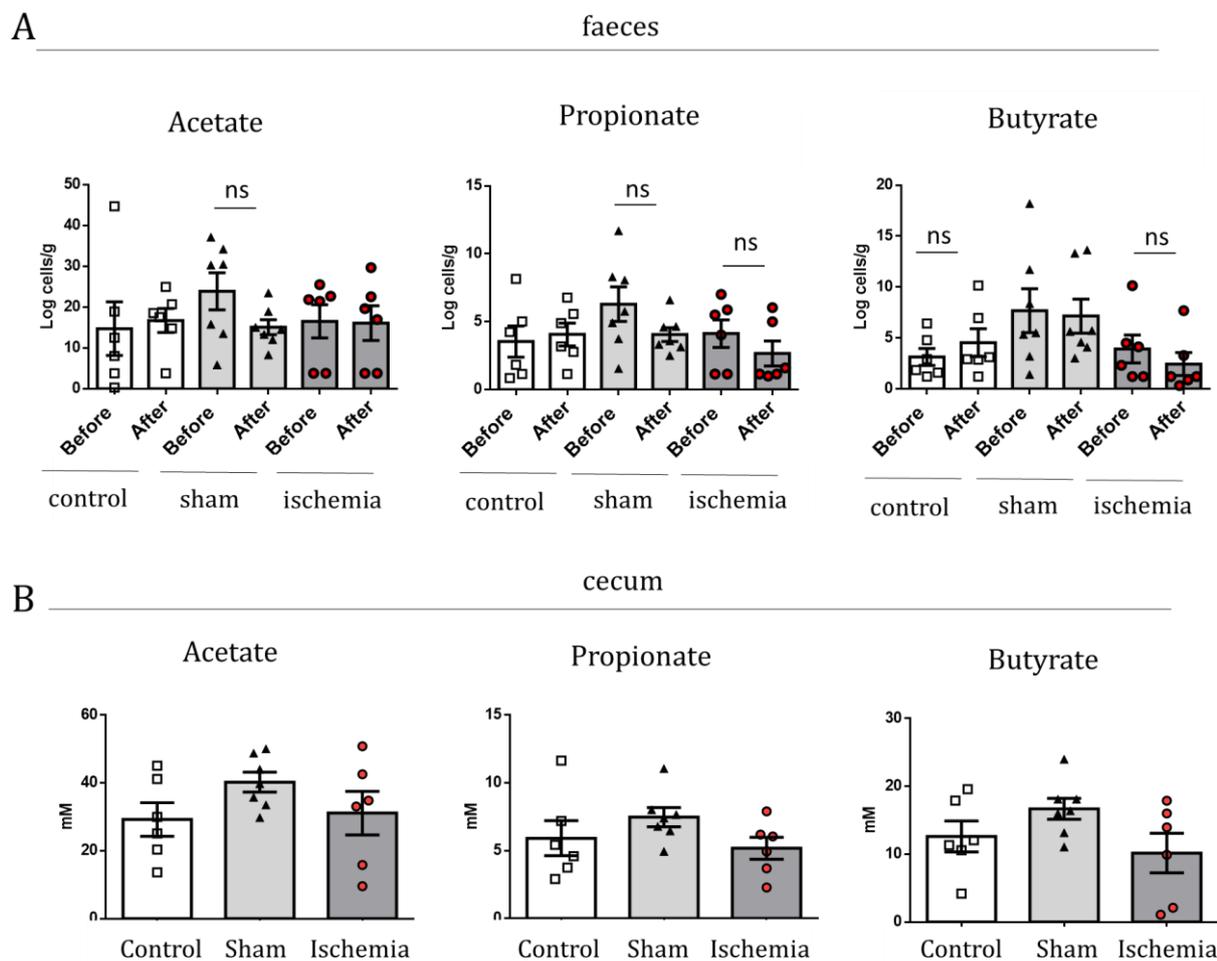
Tanto en heces como en ciego, los animales isquémicos mostraron niveles más elevados de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (figuras 35 y 36), bacterias responsables de un amplio rango de enfermedades tanto en humanos como en animales (Paterson, 2012). No observamos diferencias ni en heces ni en ciego en el contenido bacteriano entre *sham* e isquémicos para el resto de los grupos bacterianos analizados (*Clostridia* clúster XIVa y IV, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Akkermansia*). Tampoco detectamos diferencias en las concentraciones de los ácidos grasos (ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico) en las muestras de heces y ciego (figura 37A y 37B, respectivamente).



**Figura 35. La isquemia produce un aumento en la familia de las enterobacterias en las heces.** Animales control sin operar, n=6; animales sham, n=7; animales isquémicos, n=6. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por ANOVA de dos vías por grupo (control, sham o isquémico) y por tiempo (antes y después), seguido del test de Sidak para comparaciones múltiples. \*p<0.05.



**Figura 36. La isquemia produce un aumento en la familia de las enterobacterias en el ciego.** Animales control sin operar, n=6; animales tratados sham, n=7; animales isquémicos, n=6. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por ANOVA de una vía (control, sham o isquémico), seguido del test de Dunnett para comparaciones múltiples. \*p<0.05; \*\*p<0.01.



**Figura 37. No se observaron diferencias en las concentraciones de los SCFAs en muestras de heces y ciego. (A):** concentraciones de ácidos grasos de cadena corta detectados en heces; **(B):** concentraciones de ácidos grasos de cadena corta en muestras de ciego. Animales control sin operar, n=6; animales *sham*, n=7; animales isquémicos, n=6. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Para el análisis de las heces se realizó una ANOVA de dos vías por grupo (control, *sham* o isquémico) y por tiempo (antes y después), seguido del test de Sidak para comparaciones múltiples; para el análisis del ciego se realizó una ANOVA de una vía seguido del test de Sidak para comparaciones múltiples.

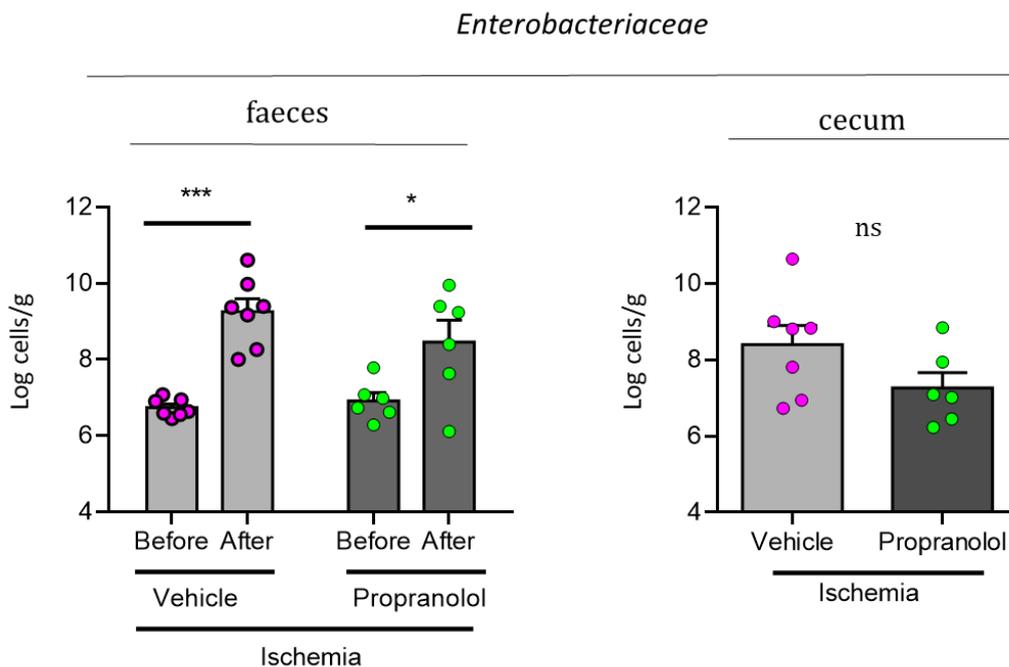
### 2.3 Efecto del propranolol sobre las poblaciones bacterianas y la producción de SCFAs

La familia *Enterobacteriaceae* muestra la capacidad de expandirse en microentornos intestinales caracterizados por un estado de inflamación (Lupp *et al.*, 2007). El aumento de esta población de bacterias en muestras de heces y ciego de animales isquémicos, y el estado inflamatorio que observamos en los mLN de animales que habían sufrido un ictus, nos llevó a pensar que el efecto antiinflamatorio del propranolol en las muestras de ganglios podría ser debido a un efecto del mismo derivado de su acción sobre las poblaciones de las enterobacterias.

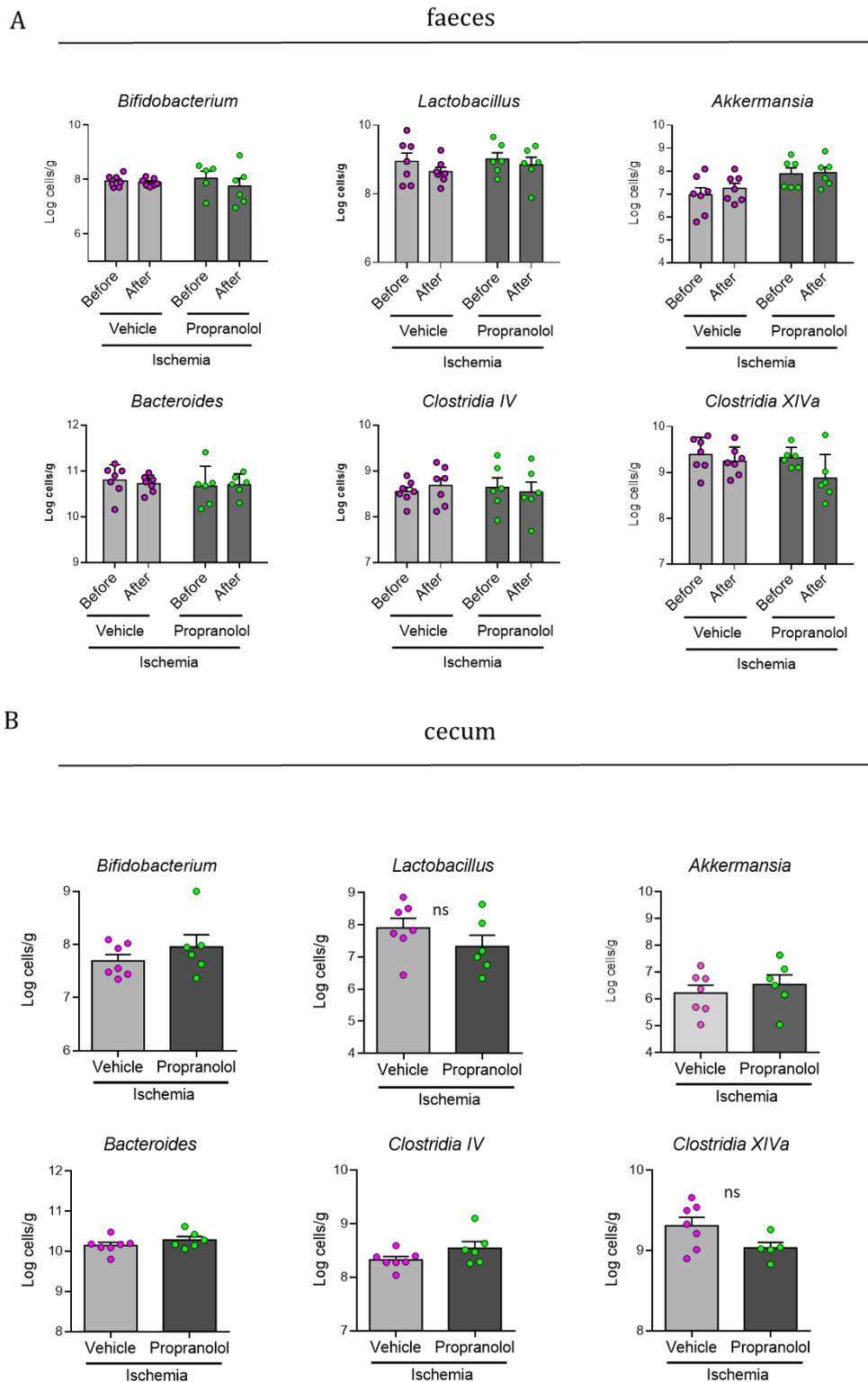
Los resultados mostraron que, nuevamente, los animales isquémicos presentan un aumento de enterobacterias tanto en ciego como en heces que no es reversible por tratamiento con propranolol (figura 38). En el caso del ciego, si bien el propranolol parece disminuir la cantidad de enterobacterias, la diferencia no es significativa con respecto al vehículo.

El resto de poblaciones bacterianas tampoco se vieron modificadas por el tratamiento ni en heces ni en ciego (figura 39A y 39B, respectivamente).

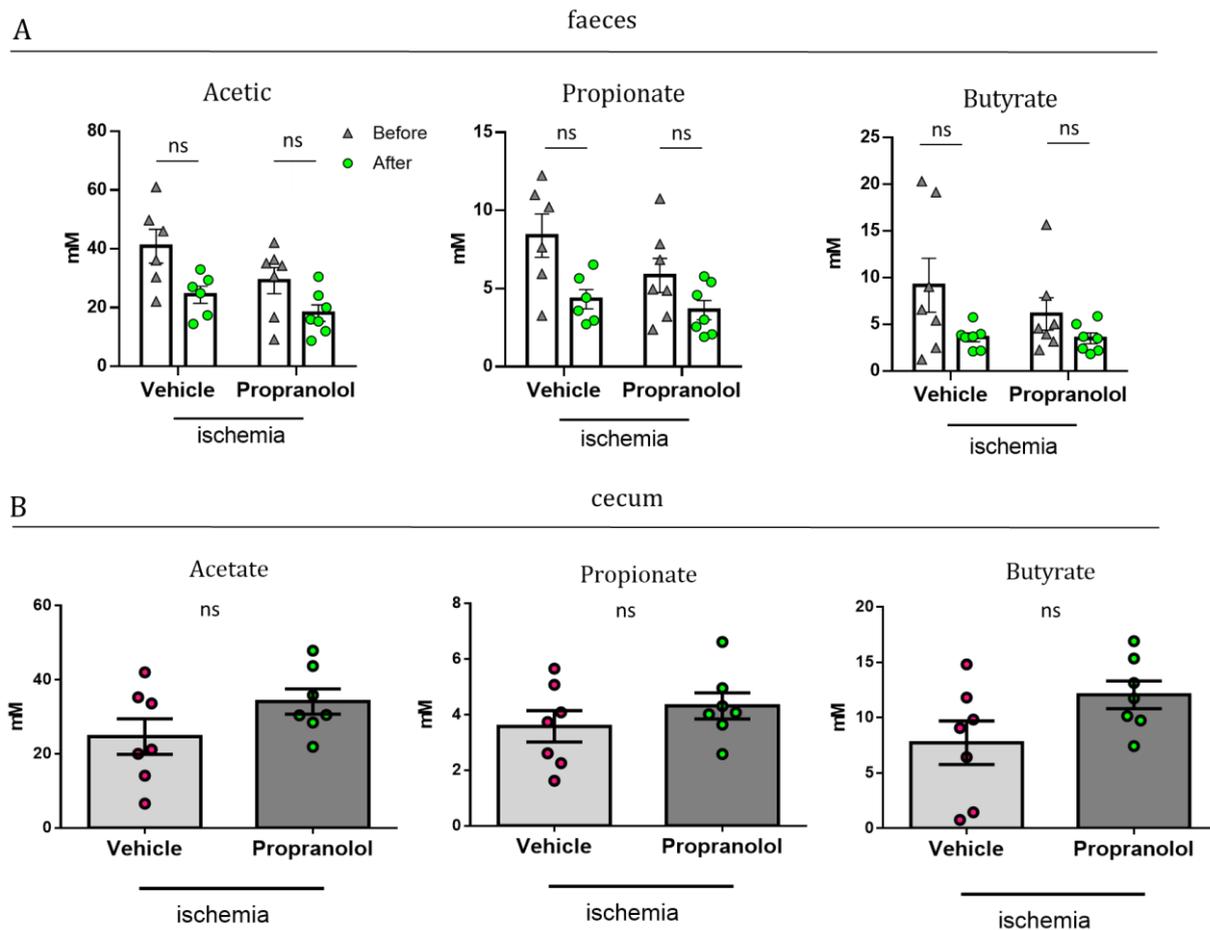
En cuanto a la producción de SCFAs, en muestras de heces detectamos una disminución no significativa tanto del ácido acético, como del propiónico y del butírico (figura 40A), pero no así en las muestras de ciego (figura 40B).



**Figura 38. El propranolol no modifica las poblaciones de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* en heces y en ciego.** Animales tratados con vehículo, n=7; animales tratados con propranolol, n=6. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Para el análisis de las heces, se realizó un ANOVA de dos vías por grupo (vehículo o propranolol) y por tiempo (antes y después), seguido del test de Sidak para comparaciones múltiples; para el análisis del ciego se realizó por T-Test. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figura 39. El propranolol no modifica las poblaciones bacterianas analizadas en heces y en ciego. (A):** poblaciones bacterianas en heces de animales tratados con vehículo o con propranolol; **(B):** poblaciones bacterianas en el ciego de animales tratados con vehículo o con propranolol. Animales tratados con vehículo, n=7; animales tratados con propranolol, n=5-6. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Para el análisis de las heces, se realizó un ANOVA de dos vías por grupo (vehículo o propranolol) y por tiempo (antes y después), seguido del test de Sidak para comparaciones múltiples; el análisis del ciego se realizó por T-Test.



**Figura 40. El propranolol no modifica la producción de SCFAs en heces y en ciego. (A):** concentraciones de SCFAs en las heces de animales tratados con vehículo o con propranolol; **(B):** concentraciones de SCFAs en el ciego de animales tratados con vehículo o con propranolol. Animales tratados con vehículo, n=6-7; animales tratados con propranolol, n=7. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Para el análisis de las heces, se realizó un ANOVA de dos vías por grupo (vehículo o propranolol) y por tiempo (antes y después), seguido del test de Sidak para comparaciones múltiples; el análisis del ciego se realizó por T-Test.

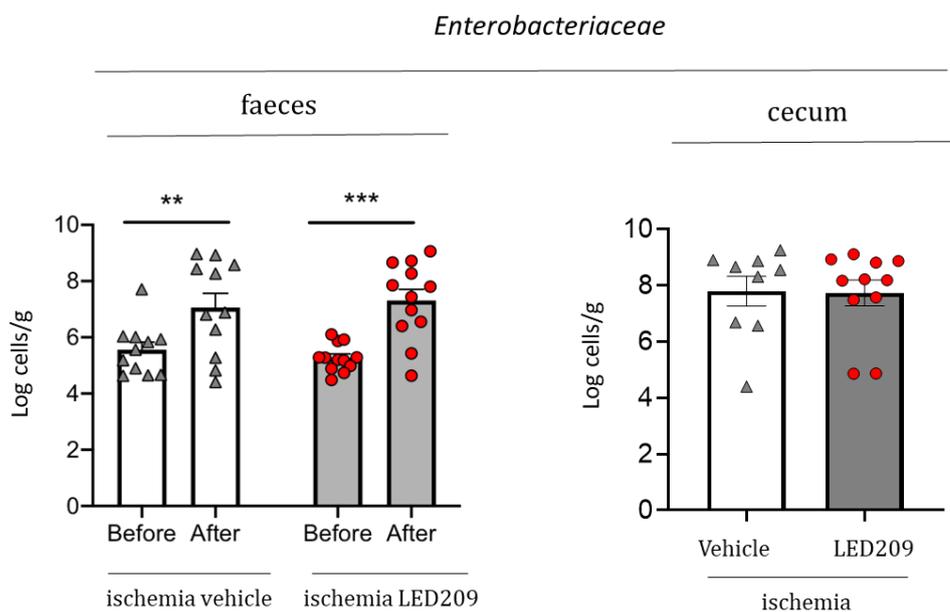
#### 2.4 Efecto del tratamiento con el fármaco LED209, bloqueante del receptor bacteriano QseC

Considerando los resultados negativos respecto a la capacidad del propranolol para evitar el aumento de enterobacterias, pensamos en la intervención de otras vías que regulasen la extensión de las mismas. Algunos investigadores consideran que el receptor de *quorum sensing* QseC podría actuar como un receptor adrenérgico, capaz de bloquearse con inhibidores de la vía  $\alpha$ -adrenérgica (como la fentolamina) pero no con inhibidores de la vía  $\beta$ -adrenérgica (como el propranolol) (Clarke *et al.*, 2006; Rasko *et al.*, 2008). Este receptor es capaz de responder tanto a moléculas bacterianas (autoinductores) como a la epinefrina y la norepinefrina del hospedador eucariótico (Clarke *et al.*, 2006). El bloqueo bioquímico de este receptor con el fármaco LED209 impidió la expansión de las bacterias pertenecientes

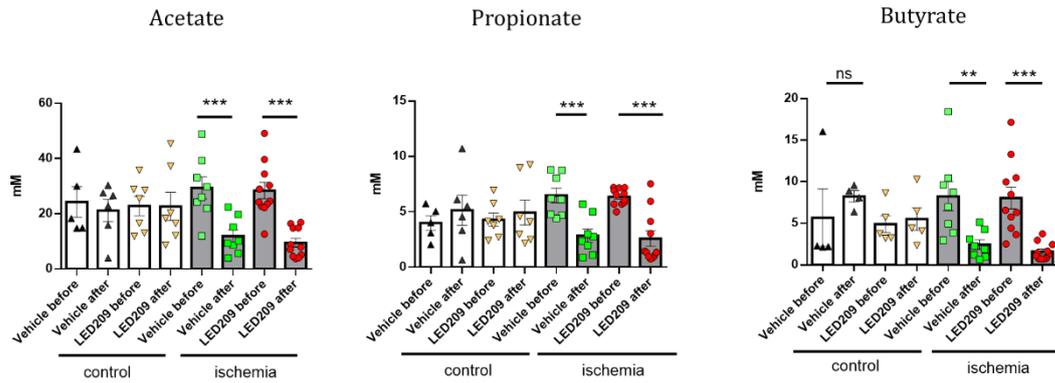
a la familia *Enterobacteriaceae* en modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal en ratón (Rooks *et al.*, 2017). Por esta razón, pensamos que la vía  $\beta$ -adrenérgica bloqueada por el propranolol no era suficiente debido a que la vía de respuesta del receptor QseC podría estar más relacionada con la vía  $\alpha$ -adrenérgica como respuesta de las bacterias ante el aumento de catecolaminas liberadas post-isquemia (reacción de estrés inducida por la lesión cerebral).

Así, decidimos administrar el fármaco LED209 y su vehículo a animales control sin operar y a animales isquémicos. Administramos el fármaco 3 horas antes de la cirugía y 24 horas después de la primera dosis. A las 48 horas post-reperusión sacrificamos al animal para estudiar el efecto del fármaco sobre las poblaciones de enterobacterias en heces, y en ciego, y determinar su efecto sobre la producción de SCFAs.

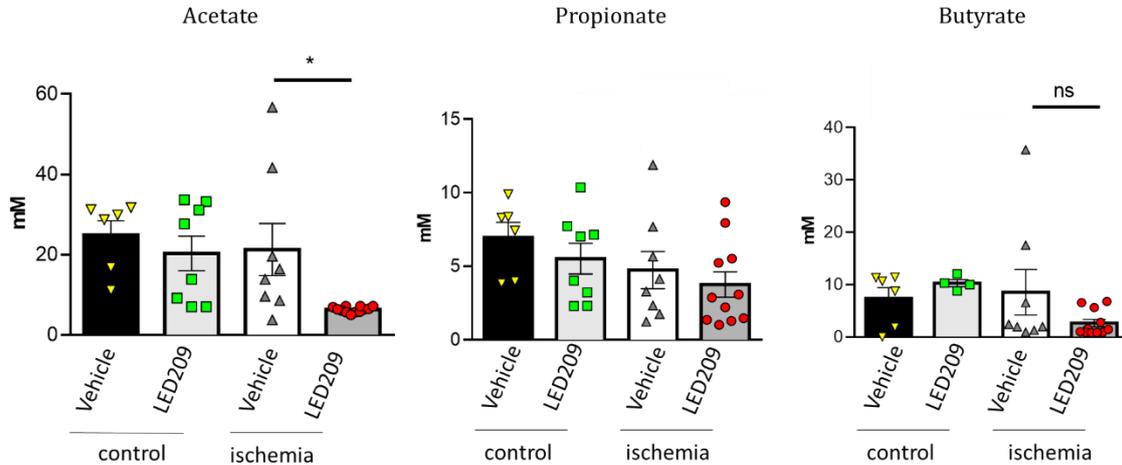
El fármaco no consiguió disminuir el número de enterobacterias ni en heces ni en ciego (figura 41). En cuanto a los SCFAs, si bien no observamos diferencias entre el tratamiento con el vehículo y el fármaco, en muestras de heces apreciamos una disminución del ácido acético, propiónico y butírico después de la isquemia que no se detectó en tandas previas de experimentos (figura 42). También observamos una reducción del ácido acético en muestras de ciego exclusiva del tratamiento con LED209 solo en animales isquémicos (figura 43).



**Figura 41. El tratamiento con el fármaco LED209 no previene el aumento de enterobacterias en heces y ciego.** Animales control sin operar tratados con vehículo, n=5; animales control sin operar tratados con LED209, n=7; animales isquémicos tratados con vehículo, n=9-11; animales isquémicos tratados con LED209, n=11-12. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Para el análisis de heces se ha realizado una ANOVA de una vía seguido del test de Sidak para comparaciones múltiples. El análisis del ciego se ha realizado por Mann-Whitney. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.



**Figura 42. No hay diferencias entre el tratamiento con LED209 y el vehículo en la producción de SCFAs después de la isquemia en muestras de heces.** Animales control sin operar tratados con vehículo, n=5; animales control sin operar tratados con LED209, n=7; animales isquémicos tratados con vehículo, n=8; animales isquémicos tratados con LED209, n=11. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por ANOVA de dos vías por grupo (vehículo o LED) y por tiempo (antes y después), seguido del test de Sidak para comparaciones múltiples. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



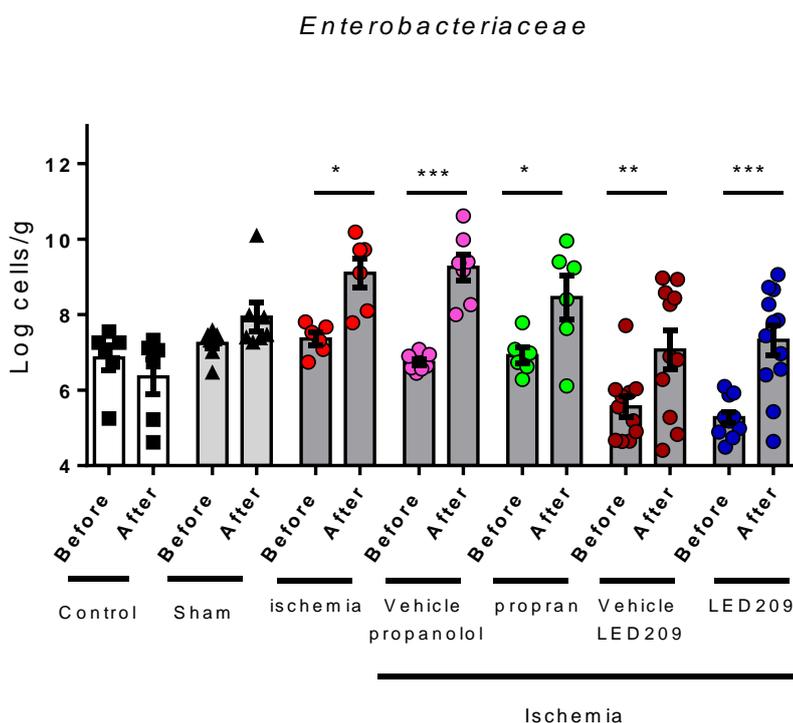
**Figura 43. El tratamiento con el fármaco LED209 produce una disminución del ácido acético en muestras ciego.** Animales control tratados con vehículo, n=6; animales control tratados con LED209, n=4-8; animales isquémicos tratados con vehículo, n=8; animales isquémicos tratados con LED209, n=10-12. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Para el análisis del ácido acético y del ácido propiónico se ha realizado un ANOVA de una vía, seguido del test de Sidak para comparaciones múltiples. Para el análisis de ácido butírico se ha realizado un test de Kruskal-Wallis, seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples. \* $p < 0.05$ .

## 2.5 Resumen de resultados del capítulo II

En este capítulo se ha evaluado la respuesta de la microbiota al ictus a través del análisis de las poblaciones bacterianas y de sus productos metabólicos tanto en heces como en ciego, así como el efecto del tratamiento del propranolol y del fármaco LED209 sobre las mismas.

Estos resultados indican que las poblaciones bacterianas intestinales son capaces de responder a la isquemia, tanto a través de modificaciones en la composición microbiana como en la producción de SCFAs.

De forma consistente en varios análisis independientes, detectamos un aumento del número de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* tanto en heces (figura 44) como en ciego después del ictus, efecto que no observamos en las muestras de los animales operados bajo el modelo tMCAo dormido, o bien en animales *sham*.



**Figura 44. Las enterobacterias aumentan después de la isquemia de forma consistente en varios grupos experimentales independientes.** La gráfica muestra de forma conjunta los resultados de la población de enterobacterias en muestras de heces de las diferentes tandas de experimentos. “Propran” = propranolol. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. La estadística corresponde al análisis realizado en cada experimento. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

El tratamiento con propranolol no consiguió revertir dichos efectos lo que sugiere que el aumento de estas bacterias no es dependiente de la vía  $\beta$ -adrenérgica. El tratamiento mediante el fármaco LED209, inhibidor del receptor QseC, similar a los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, tampoco evitó el aumento de enterobacterias ni en las heces ni en el ciego. Al ser la primera vez que se aplicaba un protocolo con este compuesto *in vivo* en el contexto del ictus, desconocemos si un posible cambio en la frecuencia de su administración podría dar resultados positivos en la prevención del aumento de las enterobacterias.

En cuanto a la producción de SCFAs observamos que, mientras que en el modelo dormido se produce una disminución del ácido butírico tanto en heces como en ciego, este efecto no se repite de forma consistente en el resto de los grupos experimentales con muestras de animales operados con el modelo tMCAo despierto, aunque sí se identifica una tendencia general en la disminución de la concentración de SCFAs, especialmente en muestras de heces. Los tratamientos con propranolol y con LED209 no produjeron cambios específicos en la concentración de SCFAs, a excepción del ácido acético, que se vio disminuido en muestras de ciego en animales isquémicos tratados con LED209

Es importante destacar el papel que ocupan las enterobacterias como patógenos oportunistas en las infecciones (Paterson, 2012), especialmente en el caso del ictus (Zeng *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta estos factores, pensamos que como consecuencia del ictus los ganglios mesentéricos estarían realizando una respuesta proinflamatoria para contener una posible infección local, e impedir la propagación bacteriana al organismo. En caso de que esta respuesta fuera insuficiente, se favorecería la expansión bacteriana lo que podría dar lugar a una posible translocación bacteriana a otros órganos. En el capítulo III de resultados se estudió este aspecto.



---

**RESULTADOS. CAPÍTULO III: translocación bacteriana después de  
la isquemia cerebral**

---

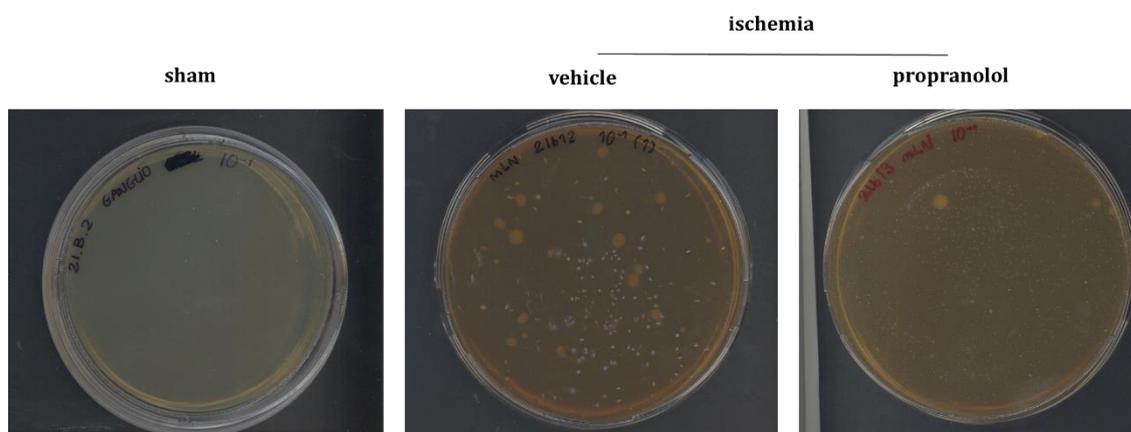


### 3.1 Estudio de la translocación bacteriana mediante cultivos en placas

#### 3.1.1 Efecto del tratamiento con propranolol

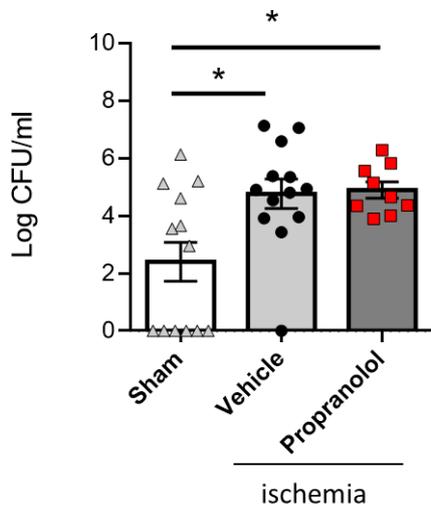
Tras observar el efecto inmunomodulador del propranolol en los mLN en respuesta a la isquemia, pensamos que, si bien no revertía el aumento de las poblaciones bacterianas de enterobacterias, el tratamiento con este fármaco podría tener un papel relevante en la translocación bacteriana a los mLN.

Para ello, 48 horas después del ictus, sacrificamos ratones *sham* tratados con vehículo, y animales isquémicos tratados con propranolol o con vehículo, extrajimos los mLN en condiciones estériles, y cultivamos el homogenado de este tejido en placas con medio LB para la detección de unidades formadoras de bacterias (CFU, por sus siglas en inglés, *colony forming unit*), durante 24 horas a 37°C (figura 45).

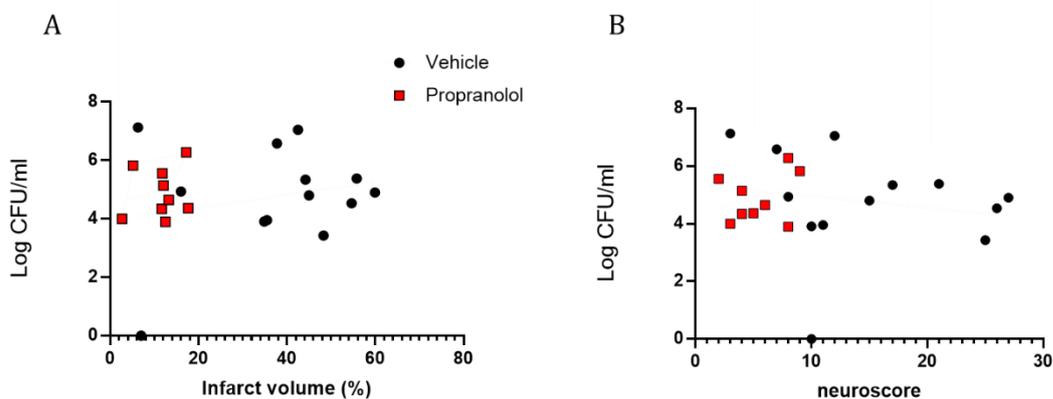


**Figura 45. Crecimiento de bacterias en placas de agar.** Muestras de ganglios mesentéricos de animales *sham*, e isquémicos tratados con propranolol y vehículo.

Los resultados mostraron una mayor presencia de CFUs en los mLN de los animales isquémicos en comparación con los animales *sham* (figura 46). El propranolol no evitó el aumento de CFUs en los animales isquémicos tratados con este compuesto (figura 46). Tampoco observamos una correlación entre el número de CFUs y mayor daño neurológico través de volumen de infarto o de *neuroscore* (figura 47). Curiosamente, sí que observamos un menor volumen de infarto y *neuroscore* en los animales tratados con propranolol, aspecto que se detallará más adelante en el capítulo V.



**Figura 46** La isquemia produce un aumento de bacterias en los mLN que no es reversible por tratamiento con propranolol. Animales sham, n=13; animales isquémicos tratados con vehículo, n=13; animales tratados con propranolol, n=9. Los resultados están expresados como la media ± SEM. Análisis por Kruskal-Wallis seguido de test de Dunn para comparaciones múltiples. \*p<0.05.



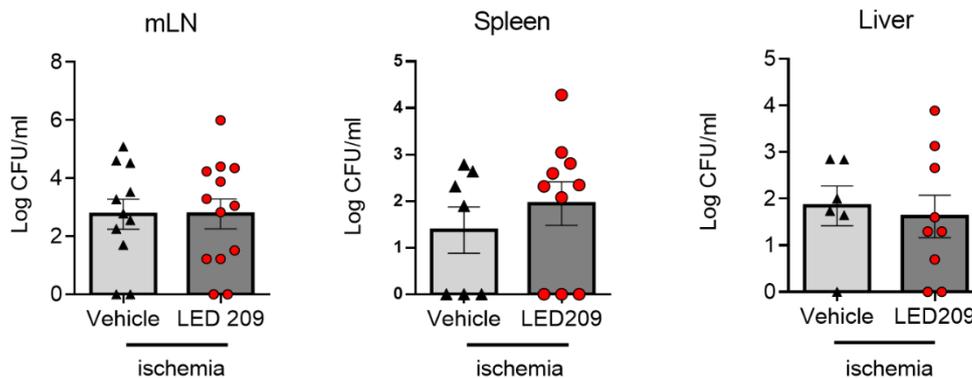
**Figura 47.** El volumen de infarto y la afectación neurológica no están correlacionados con el número de CFUs detectadas en cultivos de mLN en animales tratados con vehículo y propranolol. **(A)** Correlación entre el número de CFUs y el volumen de infarto;  $r^2$  vehículo = 0.046;  $r^2$  propranolol = 0.028; **(B)**: Correlación entre el número de CFUs y la afectación neurológica por *neuroscore*;  $r^2$  vehículo = 0.028;  $r^2$  propranolol = 0.081.

3.1.2 Efecto del tratamiento con LED209

Estudiamos el efecto del fármaco LED209 en la translocación bacteriana en varios órganos. Tras la administración del fármaco o de su vehículo y la inducción de la cirugía, sacrificamos a los ratones y realizamos el cultivo del homogenado de muestras de mLN, hígado y bazo en placas de agar con LB y analizamos la cantidad de CFUs tras 24 horas a 37°C.

No encontramos diferencias en el número de CFUs detectadas en cultivos de muestras procedentes de mLN, bazo e hígado, entre animales tratados con vehículo y con LED 209 (figura 48).

Como se abordará en el capítulo 5 de resultados, el tratamiento con el fármaco LED 209 no afectó ni al volumen de infarto ni al comportamiento neurológico. Por esta razón, correlacionamos el número de CFUs con el volumen de infarto y el *neuroscore*. Del mismo modo, realizamos una dicotomización de las CFUs y su correspondencia con volumen de infarto y *neuroscore*, en función de un umbral de CFUs (2,4 log CFU/ml), resultado de la mediana de los valores obtenidos a partir de muestras previas de cultivos de mLN procedentes de animales control sin operar y animales *sham* (n=15, datos no mostrados). Consideramos este valor para determinar si había o no infección en los órganos estudiados.

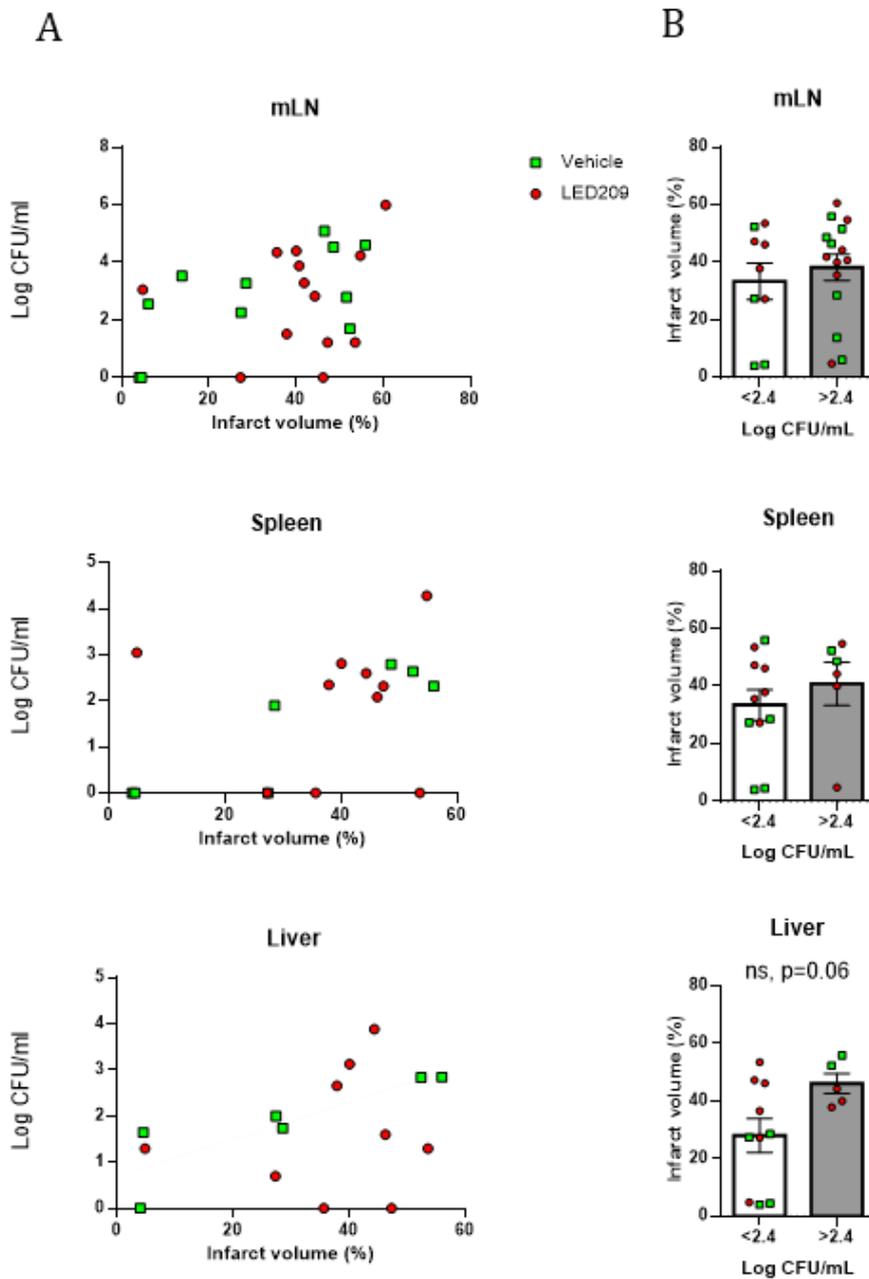


**Figura 48. El tratamiento con el fármaco LED209 no impide la translocación bacteriana a los mLN, al bazo y al hígado.** Animales tratados con vehículo, n= 6-11; animales tratados con LED, n=9-13. Los resultados están expresados como la media ± SEM. Análisis por T-Test.

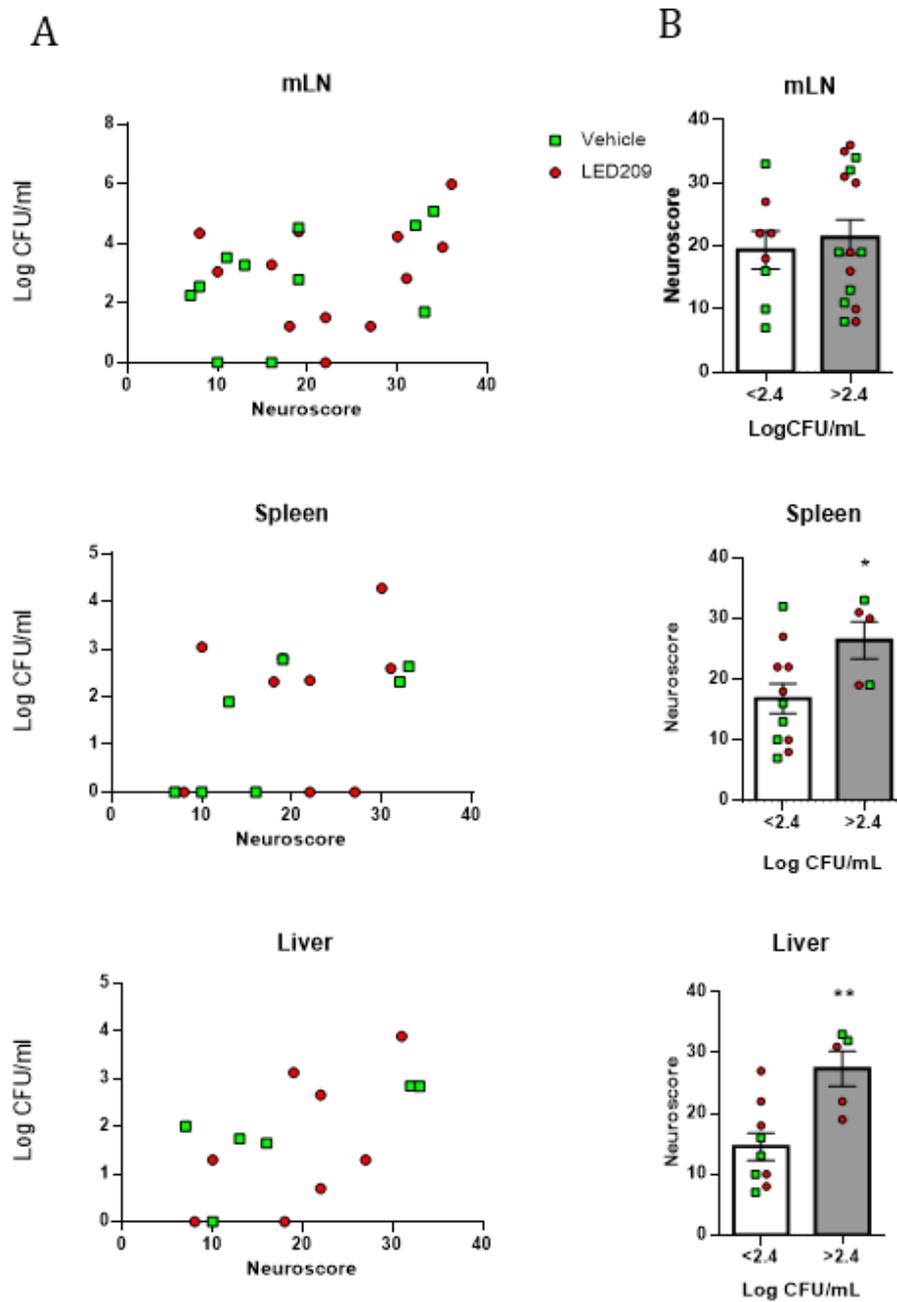
No observamos correlación significativa entre el número de CFUs y el volumen de infarto en ninguno de los órganos estudiados (figura 49A). Del mismo modo, en ningún tejido confirmamos una relación entre infección (valores de log CFUs/ml mayores a 2,4) y volumen de infarto (figura 49B), aunque en el hígado hay una tendencia no significativa por la que los animales infectados muestran un mayor volumen de infarto.

Las CFUs y el *neuroscore* no correlacionaron en ningún tejido (figura 50A). Tampoco observamos que los animales con mayor infección en ganglios mesentéricos correspondiesen con un peor *neuroscore*. Sin embargo, los animales con infección en bazo o en hígado sí mostraban un mayor déficit neurológico (figura 50B).

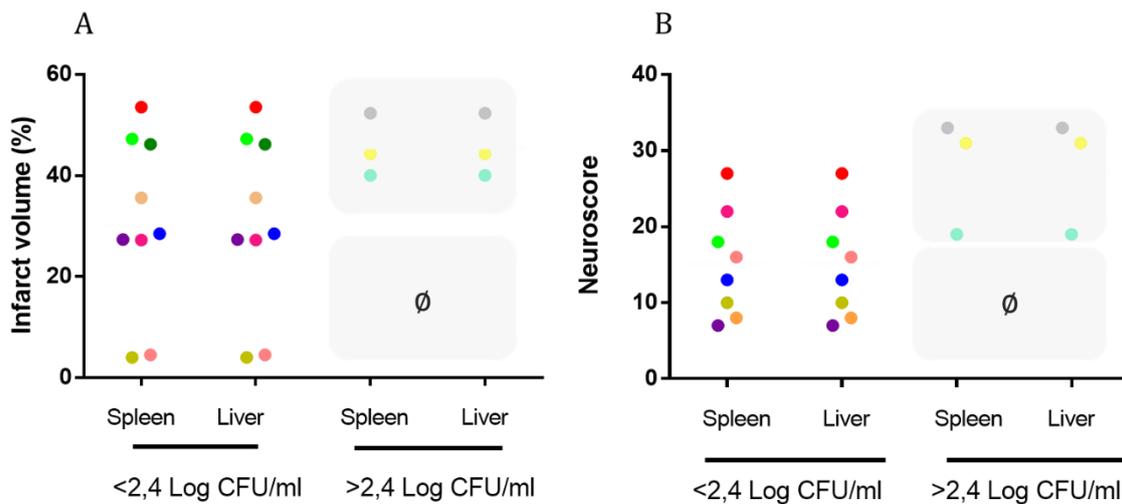
Observamos que la infección en un órgano o tejido concreto no correlacionaba con el volumen del infarto cerebral ni con el comportamiento neurológico. También analizamos la presencia de infección en uno o más tejidos de forma conjunta (figura 51). Así, pudimos detectar que a pesar de que no todos los animales con lesiones grandes se infectaron, sí observamos que aquellos animales con infección conjunta en bazo e hígado eran los que tenían mayor lesión y déficit neurológico (área gris de la figura 51). Los animales que tenían infección en mLN (figura 48) pero no en bazo e hígado no se presentan en la figura 51.



**Figura 49. No hay correlación entre el número de CFUs y el volumen de infarto ni los animales con más infección presentan mayor volumen de infarto. (A):** correlación entre el número de CFUs y el volumen de infarto en mLN ( $r^2 = 0.17$ ), bazo ( $r^2 = 0.20$ ) e hígado ( $r^2 = 0.15$ ). **(B):** dicotomización del volumen de infarto de los animales según el número de CFUs que presentaban en mLN, bazo e hígado en función del umbral de infección. Animales tratados con vehículo, n= 6-11; animales tratados con LED, n=9-13. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por t-Test.



**Figura 50.** No hay correlación entre el número de CFUs y el *neuroscore*, pero los animales con más infección presentan mayor afectación neurológica en bazo e hígado. **(A):** correlación entre el número de CFUs y el *neuroscore* en mLN ( $r^2 = 0.10$ ), bazo ( $r^2 = 0.22$ ) e hígado ( $r^2 = 0.37$ ). **(B):** dicotomización del *neuroscore* de los animales según el número de CFUs que presentaban en mLN, bazo e hígado en función del umbral de infección. Animales tratados con vehículo, n= 6-11; animales tratados con LED, n=8-12. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por t-Test.

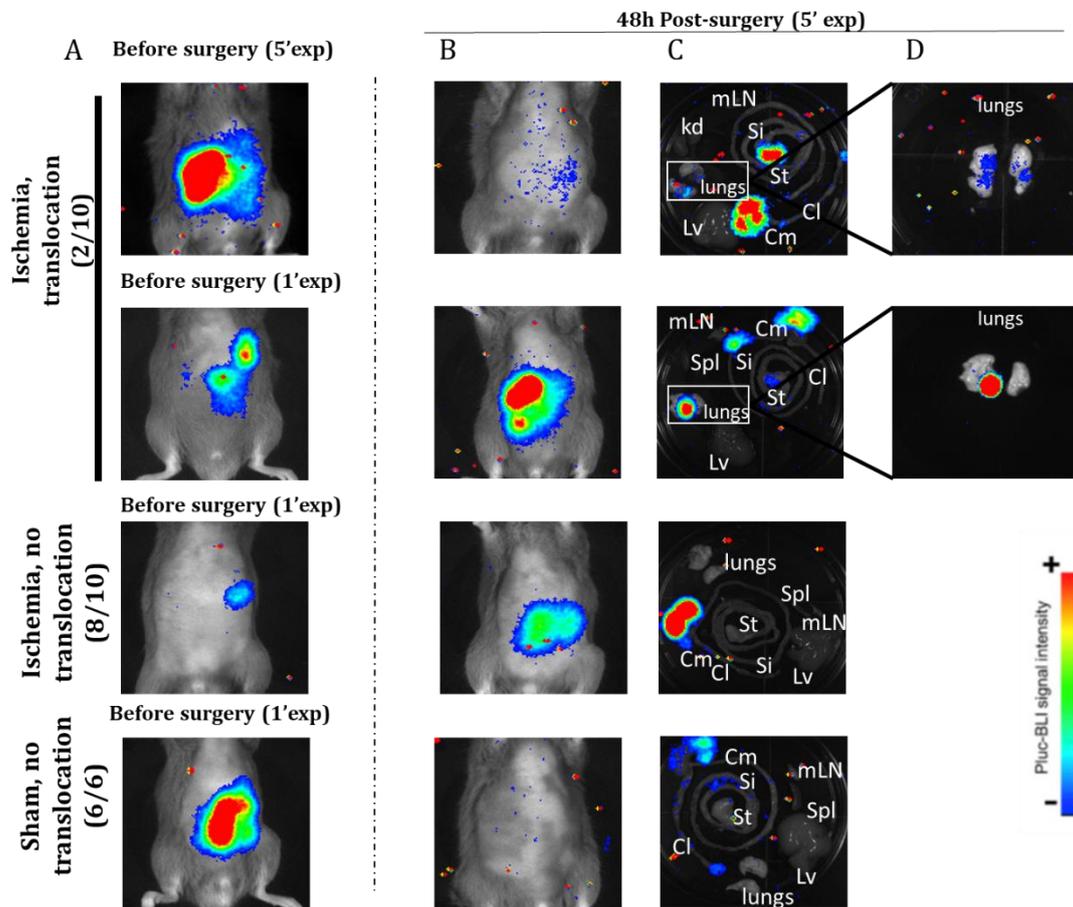


**Figura 51. Representación por colores de la distribución de cada animal según la infección en hígado y en bazo.** Los puntos del mismo color en cada uno de los órganos corresponden a un único animal y es coincidente entre las gráficas A y B. **(A):** distribución del volumen de infarto de los animales según el número de CFUs que presentaban en mLN, bazo e hígado en función del umbral de infección; n= de un total de 15 animales hay 12 animales con infección en ambos tejidos. **(B):** distribución del *neuroscore* de los animales según el número de CFUs que presentaban en mLN, bazo e hígado en función del umbral de infección; n= de un total de 14 animales hay 11 animales con infección en ambos tejidos.

### 3.2 Estudio de la translocación bacteriana mediante bacterias bioluminiscentes

Investigaciones previas habían sugerido que los microorganismos detectados en muestras de esputo, sangre y orina de pacientes isquémicos con infección correspondían a bacterias comensales intestinales (Stanley *et al.*, 2016). Esos mismos estudios sugerían una posible translocación bacteriana desde el intestino a los pulmones de los animales isquémicos al observar una disminución de la biomasa de las comunidades bacterianas al mismo tiempo que un aumento de las mismas en los pulmones de los animales isquémicos. Mediante un sistema de imagen quisimos confirmar si se producía tal translocación y si esta se podría observar. Para ello, en colaboración con el laboratorio del Dr. Josep Lluís Torres y gracias al trabajo de la investigadora Dra. Sara Ramos, del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC), se administró oralmente la cepa bacteriana no patogénica *E.coli K-12 MG1655* previo tratamiento de los ratones con un cóctel de antibióticos. Tras confirmar que la bacteria había colonizado exitosamente el tracto intestinal del ratón, realizamos la cirugía en 6 ratones *sham* y 10 ratones isquémicos. 48 horas después de la intervención, se sacrificó al ratón y se extrajeron sus órganos para evitar el apantallamiento por la piel y visualizar de forma directa la señal luminosa procedente de la bacteria.

En 2 de los 10 animales isquémicos detectamos luz no solo en regiones del intestino delgado y grueso, sino también en los pulmones, mientras que en los 6 animales *sham* solo observamos luz en regiones intestinales correspondientes al ciego, al colon y al intestino delgado (figura 52).



**Figura 52. La isquemia induce la translocación bacteriana a pulmones en un 20% de los ratones isquémicos. (A):** imágenes de los animales antes de la realización de la cirugía para confirmación de colonización de las bacterias bioluminiscentes. Para la detección de luz de la imagen del margen superior izquierdo fue necesario un periodo de exposición de 5 minutos. Exp= exposición. **(B):** imágenes abdominales de los ratones 48 horas después de la intervención y previamente al sacrificio. **(C):** imágenes correspondientes a los órganos extraídos inmediatamente después del sacrificio del ratón (Cl: colon, Cm: ciego, Kd: riñones, Lv: hígado, mLN: ganglios mesentéricos, Si: intestino delgado, Spl: bazo, St: estómago). Las imágenes en color se generan según un patrón arbitrario que representa niveles de intensidad, siendo el azul baja intensidad y el rojo alta intensidad. **(D):** imágenes aumentadas de los pulmones de los animales isquémicos en los que se detectó emisión de luz correspondiente a las bacterias bioluminiscentes.

### **3.3 Resumen de resultados del capítulo III**

A lo largo de este capítulo se ha estudiado la translocación bacteriana tras el infarto cerebral, a través de la intervención con fármacos y mediante técnicas de imagen.

Se ha observado signos de translocación bacteriana a los mLN en algunos de los animales isquémicos. Los resultados del tratamiento con propranolol indican que la translocación bacteriana a los mLN no es dependiente de la vía  $\beta$ -adrenérgica. Además, en algunos animales encontramos crecimiento bacteriano en uno o más órganos, y observamos que los animales con infección presentaban una mayor alteración neurológica.

El tratamiento con el fármaco LED209 no evitó la translocación a los mLN, hígado y bazo en comparación a los animales que habían recibido vehículo, y tampoco detectamos una correlación entre el volumen de la lesión isquémica y el daño neurológico y el número de CFUs. Sin embargo, cuando dicotomizamos todos los valores de *neuroscore* y volumen de infarto en función de un umbral de infección sí observamos que aquellos animales que mostraban un número de CFUs por encima de dicho umbral en las muestras de homogenado de bazo e hígado correspondía con los animales con mayor afectación neurológica por *neuroscore*. También observamos que no todos los animales infectados lo hacían de forma simultánea en mLN, bazo e hígado, lo que sugiere una ausencia de relación entre el grado de infección y el tejido afectado.

Los resultados en la detección de luz en pulmón por *E.coli* bioluminiscente sugieren una posible translocación desde el intestino, lugar donde se había producido la colonización inicial, a los pulmones. Dado que solo lo hemos observado en 2 de 10 animales isquémicos necesitamos un mayor número de réplicas para confirmar si este efecto es dependiente o no del estado neurológico y del volumen de infarto.



---

**RESULTADOS. CAPÍTULO IV: disfunción intestinal después de la  
isquemia cerebral**

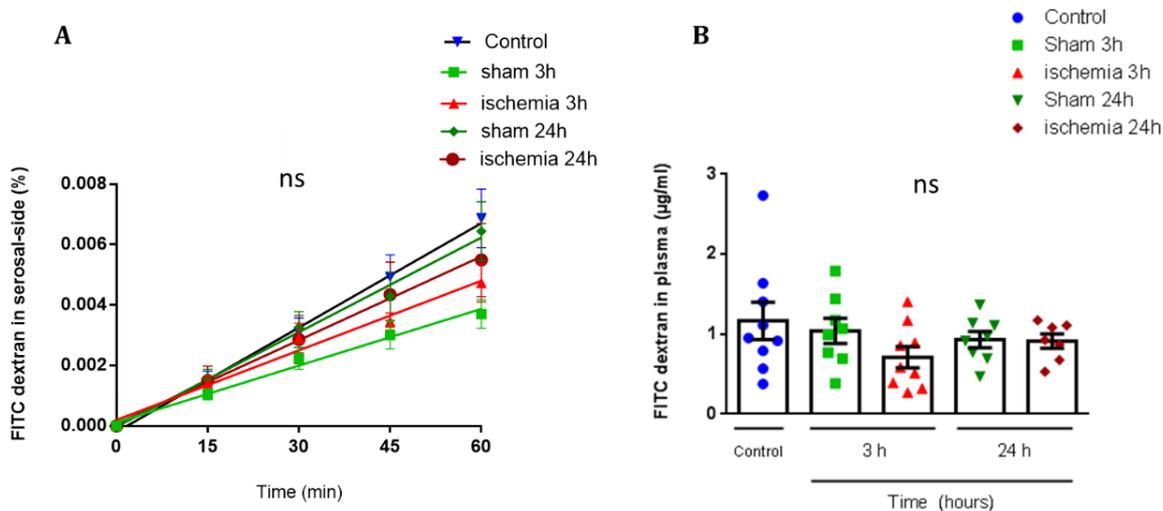
---



#### **4.1 Estudio *ex vivo* e *in vivo* de la permeabilidad de la barrera intestinal después del ictus**

En colaboración con la empresa SIAL (Serveis Integrats d'Animals de Laboratori) de la Dra. Patrocinio Vergara, y el laboratorio del Dr. Marcel Jiménez, y gracias a la aportación de las investigadoras Sara Traserra y Emma Martínez, todos ellos pertenecientes a la unidad de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), pudimos estudiar la integridad de la barrera intestinal analizando la permeabilidad de la misma al FITC dextrano de 4 KDa, una molécula fluorescente no digerible comúnmente utilizada para estudios de esta naturaleza. En el laboratorio se aplicaron tanto metodologías *in vivo* como *ex vivo* para su análisis. Para la metodología *in vivo*, administramos FITC dextrano (500 mg/kg) vía oral en animales control sin operar, *sham* e isquémicos después de 3 o 24 horas post-cirugía, y tras 60 minutos, cuantificamos la cantidad de la molécula extravasada en el plasma del ratón. Además, se observó el recorrido del FITC dextrano a lo largo del intestino delgado exponiendo el tejido en un sistema de imagen (*The Image Quant LAS 4000*, GE Healthcare), que permite la excitación de la molécula fluorescente y la recogida de su señal. Para el estudio *ex vivo*, se utilizó el sistema de la cámara de Ussing, que a través de la exposición de un segmento específico de tejido intestinal permite simular situaciones fisiológicas intestinales. Cada 15 minutos durante 1 hora se obtuvieron muestras para analizar la cantidad de FITC dextrano que había extravasado desde el dominio apical hacia la membrana basolateral del fragmento de intestino expuesto, tanto en animales control sin operar como en animales *sham* e isquémicos, a las 3 y 24 horas después de la intervención.

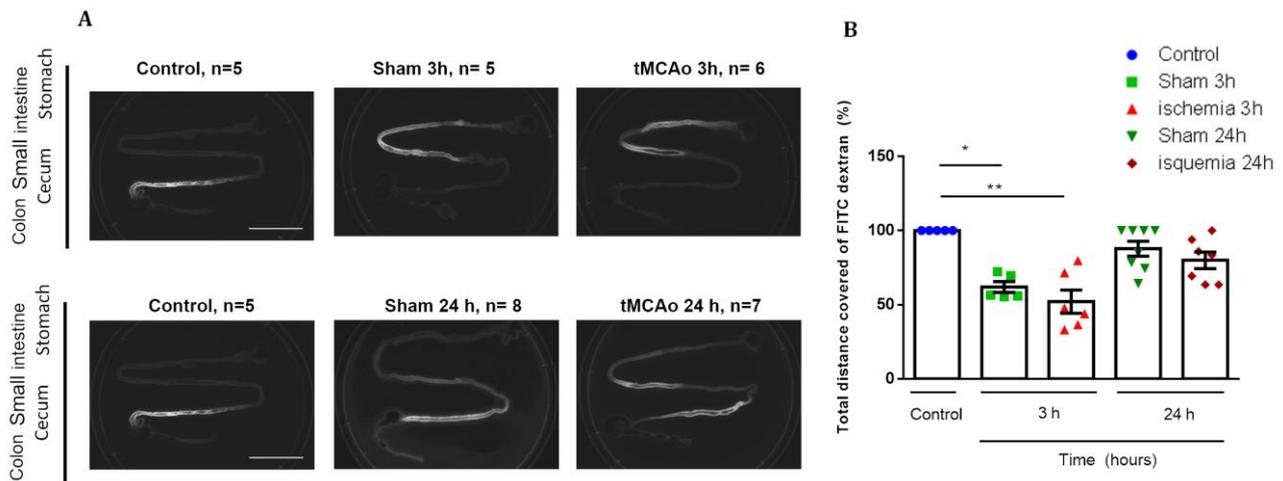
La medición de la permeabilidad mediante trazabilidad de la molécula de FITC dextrano, no mostró diferencias aparentes entre ninguno de los grupos, ni a través de la metodología de la cámara de Ussing (sistema *ex vivo*) (figura 53A) ni a través de la administración oral (sistema *in vivo*) (figura 53B).



**Figura 53. La isquemia no produce cambios en la permeabilidad intestinal a las 3 y a las 24 horas post-reperusión medido por extravasación de FITC-dextrano. (A)** Porcentaje de FITC-dextrano medido cada 15 minutos en la hemicámara del lado de la serosa por el sistema de la cámara de Ussing. Cada punto corresponde a la media del valor de permeabilidad del grupo, entre 2 y 4 réplicas por animal. Animales control sin operar, n=8, número de réplicas =26; animales sham 3 horas después de la intervención, n=8, número de réplicas =30; animales isquémicos 3 horas post-reperusión, n=7, número de réplicas =27; animales sham 24 horas después de la intervención, n=8, número de réplicas =31; animales isquémicos 24 horas post-reperusión, n=9, numero de réplicas= 29, a tiempo 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por ANOVA de dos vías seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples. **(B)** Cantidad de FITC dextrano en  $\mu\text{g/ml}$  cuantificado en plasma 60 minutos después de su administración por vía oral. Animales control sin operar, n=9, animales sham a 3 horas, n=8, animales isquémicos a 3horas, n=9, animales sham a 24 horas, n=8, animales isquémicos a 24 horas, n=7. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por ANOVA de dos vías seguido del test de Sidak para comparaciones múltiples.

#### 4.2 Efecto de la isquemia en la motilidad intestinal

Valoramos la motilidad intestinal mediante el análisis del recorrido realizado por el FITC dextrano a lo largo del intestino delgado después de su administración oral (500 mg/kg). Dicho análisis reveló diferencias entre los grupos *sham* e isquémicos a 3 horas en relación al control sin operar, pero no entre los animales isquémicos y los animales *sham* (figura 54). A las 3 horas después de la reperfusión, tanto en los animales *sham* como en los animales isquémicos, el FITC dextrano había recorrido la mitad del intestino delgado, mientras que a las 24 horas el FITC dextrano alcanzaba el ciego en los dos grupos de animales, de forma similar al control. Esto podría sugerir una posible acción residual de la anestesia sobre la motilidad intestinal durante las primeras horas después del ictus, y que dejaría de tener efecto a partir de las 24 horas post-isquemia.



**Figura 54. La isquemia no afecta a la motilidad intestinal a las 3 y a las 24 horas post-reperfusión (A)**

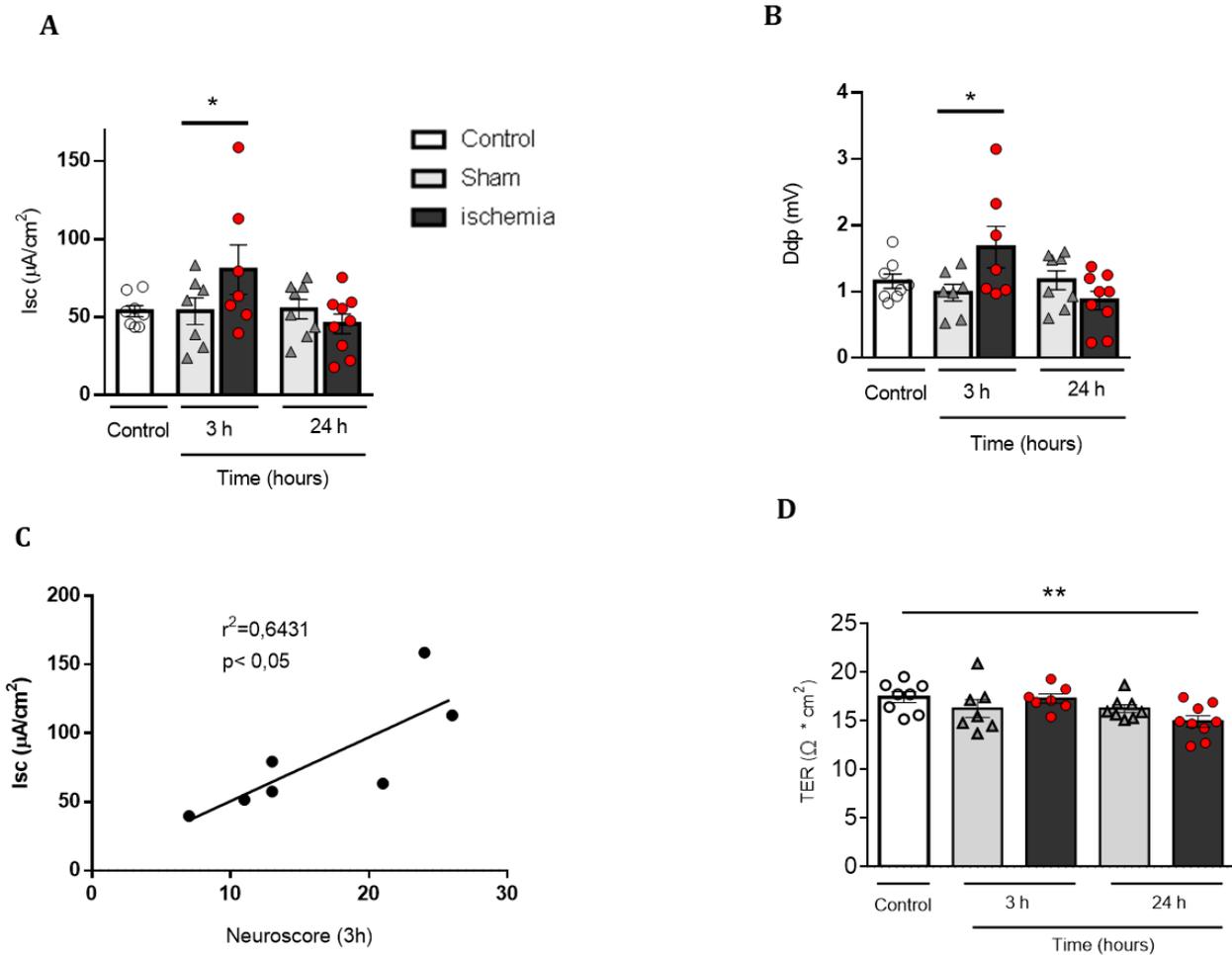
Imágenes del paquete intestinal (desde el estómago hasta el final del colon) 1 hora después de la administración oral de FITC-dextrano en los grupos control, *sham* e isquémico a las 3 y 24 horas post-ictus. Barra de escala: 4 cm. **(B)** Cuantificación del recorrido del FITC dextrano considerando la longitud total del intestino delgado. Animales control sin operar, n=5, animales *sham* a 3 horas después de la intervención, n=5; animales isquémicos 3 horas post-reperfusión n=6; animales *sham* 24 horas después de la intervención; n=8, animales isquémicos 24 horas post-reperfusión, n=7. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM. Análisis por test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples. \*p<0.05; \*\*p<0.01.

### **4.3 Cambios electrofisiológicos en el intestino delgado después de la isquemia**

A través del sistema de la cámara de Ussing también estudiamos parámetros electrofisiológicos, como la corriente de cortocircuito y la diferencia de potencial (Isc y Ddp respectivamente, ambos indicadores del grado de secreción iónica), y la resistencia transepitelial (TER, indicador electrofisiológico de la permeabilidad del tejido) en animales control sin operar, *sham* e isquémicos, a las 3 y 24 horas post-reperusión. Medimos varias réplicas de estos parámetros para cada animal, utilizando fragmentos intestinales correspondientes a la región del yeyuno.

A nivel de parámetros eléctricos, observamos diferencias en los valores de corriente de cortocircuito (Isc) (figura 55A) y en la diferencia de potencial (Ddp) (figura 55B) entre animales *sham* e isquémicos 3 horas después de la oclusión.

Los animales isquémicos que a 3 horas mostraban un mayor daño neurológico también presentaban una mayor secreción iónica (figura 55C). En cuanto a la resistencia transepitelial (TER) detectamos una disminución de la misma entre los animales control sin operar y animales isquémicos a las 24 horas post-ictus, lo que podría sugerir una alteración de las uniones interepiteliales a nivel de barrera intestinal (figura 55D).



**Figura 55. La isquemia afecta a la corriente de cortocircuito intestinal 3 horas después de la reperusión.**

**(A):** Valores de corriente de cortocircuito; **(B):** diferencia de potencial, **(C):** correlación de la Isc y el daño neurológico; **(D):** resistencia transepitelial. Cada punto corresponde a la media del valor de cada parámetro considerando entre 2 y 4 réplicas por animal. Animales control sin operar, n=8, número de réplicas =26; animales sham 3 horas después de la intervención; n=7, número de réplicas =27; animales isquémicos 3 horas post-reperusión, n=7, número de réplicas =26; animales sham 24 horas después de la intervención, n=8, número de réplicas =32; animales isquémicos 24 horas post-reperusión (n=9, numero de réplicas= 34). Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM y fueron analizados por una ANOVA de dos vías seguida del test de Sidak de comparaciones múltiples, salvo la figura C, que corresponde a una regresión lineal. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ .

#### **4.4 Resumen de resultados del capítulo IV**

Los valores de permeabilidad intestinal medidos a través de la cuantificación FITC dextrano tanto *ex vivo* como *in vivo* indican que la isquemia no produce grandes alteraciones en la permeabilidad intestinal ni a 3 ni a 24 horas post-reperfusión. No obstante, los resultados de resistencia transepitelial sugerirían que la isquemia podría afectar a las uniones interepiteliales del intestino a 24h. La motilidad intestinal no se vería afectada de forma específica por la isquemia, ya que si bien a 3 horas post-reperfusión la motilidad intestinal es menor que a 24 horas, no hay diferencias entre animales *sham* e isquémicos. Sin embargo, la isquemia sí induce un aumento de la secreción intestinal 3 horas después de la reperusión que se reestablece pasadas las 24 horas, mostrando además una correlación entre mayor daño neurológico y mayor secreción iónica. Estos datos sugerirían que si bien el infarto cerebral no causa aumentos masivos de la permeabilidad intestinal, sí podría tener un papel modulador sobre la secreción intestinal en las primeras horas post-isquemia y podría causar alguna alteración en la resistencia del epitelio. Queda por esclarecer si dichas alteraciones son causa o consecuencia de los cambios en la microbiota intestinal y si pueden facilitar la translocación bacteriana e infección.

---

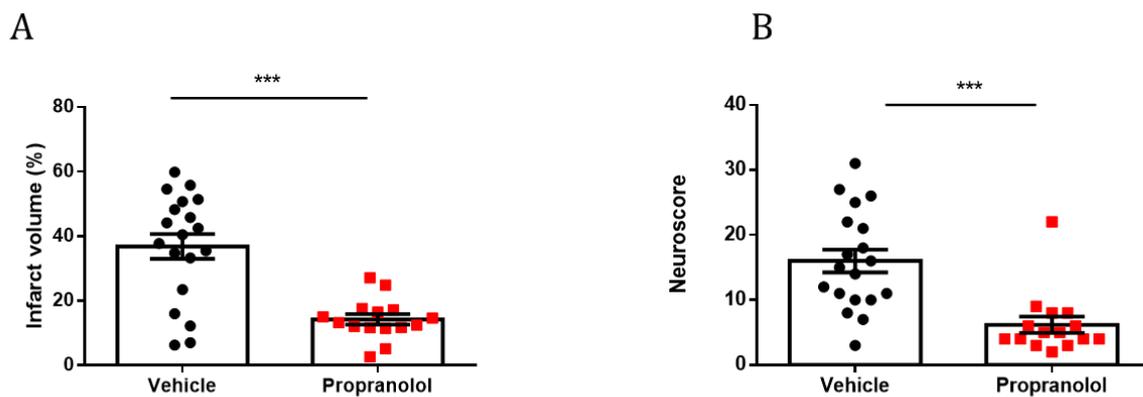
**RESULTADOS. CAPÍTULO V: modulación de la lesión cerebral  
mediante tratamiento farmacológico**

---



### 5.1 Efecto del propranolol en el volumen de infarto y la afectación neurológica

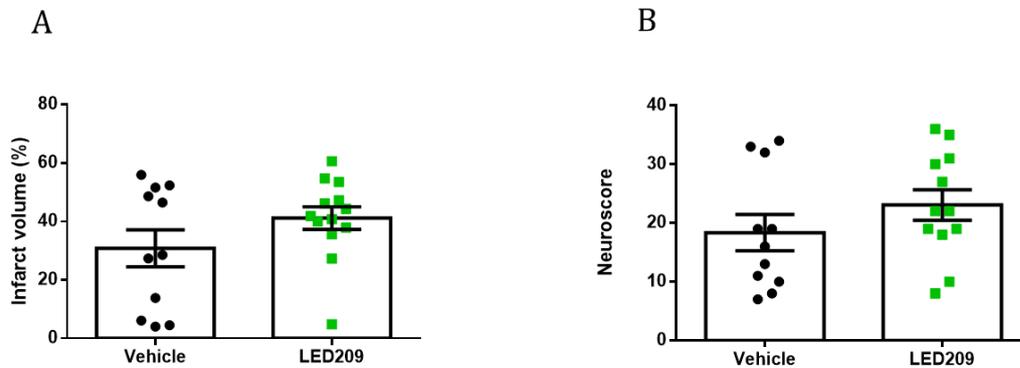
Tras el tratamiento con propranolol, evaluamos la afectación neurológica de los animales isquémicos tratados y sus vehículos determinando el volumen de infarto y el *neuroscore* 48 horas después del ictus. Comprobamos que el tratamiento con propranolol reduce drásticamente el volumen de infarto y mejora el comportamiento neurológico (figura 56).



**Figura 56. El propranolol disminuye el volumen de la lesión cerebral y mejora la afectación neurológica. (A):** volumen de infarto; **(B):** *neuroscore*. Animales tratados con vehículo, n=19; animales tratados con propranolol, n=15. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM, y fueron analizados mediante T-test para el volumen de infarto y Mann-Whitney para el *neuroscore*. \*\*\*p<0.001.

### 5.2 Efecto del fármaco LED209 en el volumen de infarto y la afectación neurológica

El estudio del volumen de infarto y de la afectación neurológica 48 horas después de la isquemia y tras el tratamiento con el fármaco LED209 mostró que no se producen cambios en comparación con los animales que habían recibido el vehículo (figura 57)



**Figura 57. El fármaco LED209 no afecta al volumen de infarto ni a la respuesta neurológica. (A):** Volumen de infarto; **(B):** *neuroscore*. Animales tratados con vehículo, n=11, animales tratados con LED209; n=12-13. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM, y fueron analizados mediante T-test.

### 5.3 Resumen de resultados del capítulo V

El tratamiento con propranolol mejoró considerablemente el volumen de infarto y la puntuación por *neuroscore*. Esto indica un efecto protector neurológico del fármaco frente al ictus. El tratamiento con propranolol se inició justo antes de la intervención quirúrgica, con el objetivo de bloquear la señalización aferente adrenérgica antes que se diera esta respuesta a consecuencia del ictus.

Por otro lado, el tratamiento con LED209 como agente bloqueante de receptores QseC en las bacterias, no produjo ningún cambio en la lesión cerebral ni en el comportamiento neurológico, pero tampoco detectamos alteraciones en la microbiota intestinal después del tratamiento. Por consiguiente, serán necesarios más experimentos para confirmar una posible implicación patogénica de las bacterias como agente agravante de un ictus.

---

## **DISCUSIÓN**

---



## 1. Sobre el efecto de la anestesia en las poblaciones del sistema inmune intestinal

La anestesia es necesaria en modelos experimentales de ictus, pero constituye un artefacto ya que los pacientes no están anestesiados cuando sufren un ictus. No obstante, en la clínica los pacientes que han sufrido un ictus son sometidos a sedación, anestesia local o anestesia general cuando son tratados con trombectomía mecánica (una terapia endovascular para la eliminación de coágulos y el restablecimiento del flujo sanguíneo). La elección del tipo de anestesia es un factor importante, ya que, aunque la anestesia local o la sedación permite mantener hemodinámicas más controladas, no impide el movimiento del paciente, lo que puede dificultar la intervención (Anastasian, 2014). Sin embargo, aunque la anestesia generalizada permite el control del movimiento y evita el dolor del paciente, puede tener efectos no deseados en la recuperación. Un meta-análisis reciente demostró que pacientes que habían sufrido un ictus sometidos a trombectomía mecánica bajo anestesia general pueden tener peor pronóstico en comparación con los pacientes que habían sido sedados o habían recibido anestesia local, aunque es necesario confirmar estos resultados en ensayos controlados (Brinjikji *et al.*, 2017)

En nuestros resultados hemos confirmado que la exposición prolongada a anestesia inhalada con isoflurano reduce el número de linfocitos intraepiteliales en el intestino delgado en animales isquémicos y animales *sham* sometidos al modelo de cirugía de isquemia transitoria focal. Previamente, se ha reportado en modelos *ex vivo* que la exposición de linfocitos T humanos a isoflurano y sevoflurano favorece la apoptosis de estas células mediante la liberación de citocromo c mitocondrial hacia el citosol. Los linfocitos intraepiteliales participan en funciones tanto de defensa contra patógenos como en el mantenimiento de la barrera epitelial intestinal (Cheroutre, Lambolez y Mucida, 2011), por lo que una reducción de estas poblaciones podría comprometer la salud del hospedador frente a infecciones.

Estudios previos en modelos de ictus mediante craneotomía demostraron que el isoflurano reduce la circulación de leucocitos, y que en combinación con la manipulación quirúrgica, moviliza los granulocitos desde la médula ósea (Denes *et al.*, 2014). Aunque la combinación de la anestesia y el estrés quirúrgico parecen tener efectos aditivos, la exposición aguda a anestesia por sí sola produce una depresión transitoria del sistema inmune (Hansbrough *et al.*, 1985; Atallah *et al.*, 1991).

Gracias al uso de animales *sham* en paralelo con la cirugía para la inducción del ictus pudimos detectar el efecto sistémico de la anestesia sobre las poblaciones del sistema inmune intestinal, lo que resalta la importancia de los controles quirúrgicos.

## **2. Sobre los cambios en las poblaciones de células del sistema inmune intestinal**

En nuestros resultados observamos que después de la isquemia se produce una disminución de células Treg en los mLN acompañada, a nivel funcional, de un aumento del porcentaje de células CD4 y CD8 productoras de IFN $\gamma$  (respuesta proinflamatoria). Además, detectamos un aumento del número de células T $\gamma\delta$  en los IELs. Este comportamiento podría ser la respuesta para combatir la infección que se observa en los ganglios mesentéricos a consecuencia del ictus, como indican los resultados de conteo de CFUs en muestras de homogenado de mLN de animales isquémicos en comparación con los animales *sham*. Para hacer frente a la infección bacteria, se favorecería la respuesta proinflamatoria (IFN $\gamma$ ) en detrimento de la antiinflamatoria (Treg). Es importante recordar que uno de los aspectos que caracterizan al síndrome de inmunodepresión por ictus es la activación del sistema nervioso simpático, favoreciendo así una respuesta antiinflamatoria. Las investigaciones previas indican que el tratamiento con propranolol, un bloqueante de la vía  $\beta$ -adrenérgica, evita la respuesta antiinflamatoria, favoreciendo la respuesta proinflamatoria gracias a la reversión de la disminución de los niveles de IFN $\gamma$  en muestras de bazo, timo y sangre, disminuyendo de este modo la infección (Prass *et al.*, 2003). En nuestros resultados y con muestras de ganglios mesentéricos, órgano no estudiado previamente en este contexto, observamos que el tratamiento con propranolol promueve la respuesta antiinflamatoria (aumento de células Treg en muestras de ganglios mesentéricos de los animales tratados frente a los que han recibido vehículo) y disminuye la proinflamatoria (reducción de los niveles del porcentaje de células productoras de IFN $\gamma$ ), si bien no produce cambios en las células T $\gamma\delta$  de los linfocitos intraepiteliales. Se podría pensar que esta respuesta se da a consecuencia del potencial papel del propranolol controlando la infección, por lo que no sería necesario poner en marcha mecanismos proinflamatorios. Sin embargo, en el conteo de CFUs de las muestras de homogenado de mLN, no vemos diferencias entre los animales isquémicos tratados con propranolol y aquellos tratados con vehículo. Así, el papel del propranolol como agente en la inmunomodulación intestinal queda aún por esclarecer, por lo que se necesitan más experimentos que ayuden a comprender su funcionamiento.

Varias publicaciones mencionan el papel de las células T $\gamma\delta$  en la regulación de la permeabilidad bacteriana a través de la secreción de interleucina IL-17 (Lee *et al.*, 2015) además de su papel en la defensa contra patógenos (Sheridan *et al.*, 2013; Nielsen, Witherden y Havran, 2017). Detectamos 48 horas después de la isquemia un aumento de estas células entre los linfocitos intraepiteliales, cambio no acompañado de un aumento de la interleucina IL-17, y que además no es reversible por tratamiento con propranolol. Aunque no encontramos diferencias mayores en la permeabilidad intestinal a las 3 y 24 horas post-isquemia mediante detección de FITC dextrano, sí que observamos una disminución de la resistencia transepitelial que sugiere una posible alteración en las uniones interepiteliales de la pared intestinal. El aumento de las células T $\gamma\delta$  en los IELs podría tener un papel protector frente a la posible

translocación bacteriana a nivel del epitelio intestinal, con un efecto proinflamatorio local no dependiente de la vía adrenérgica. Sin embargo, no detectamos un aumento de IL-17, interleucina que estaría implicada en la respuesta inflamatoria (Lee *et al.*, 2015). No obstante, dado que el aumento de células  $\gamma\delta$  podría reflejar una posible función defensiva frente al aumento de enterobacterias sería necesario estudiar el fenotipo o el transcriptoma de estas células para poder caracterizar su función. Es importante recordar que, a pesar del tratamiento con propranolol o con LED209, las enterobacterias en muestras de heces y ciego permanecen aumentadas de forma significativa después de la isquemia. Estas bacterias muestran una gran capacidad de expansión en entornos intestinales inflamatorios (Lupp *et al.*, 2007). Además, recientemente se ha visto que pacientes con niveles elevados en estas bacterias se incluyen dentro del grupo de alto riesgo de padecer un ictus (Zeng *et al.*, 2019). Un posible experimento para confirmar el papel de las células  $\gamma\delta$  sería valorar la permeabilidad intestinal con las técnicas utilizadas en esta tesis en animales isquémicos deficientes del receptor TCR  $\gamma\delta$  (Fujihashi *et al.*, 1996), esperando que estos animales muestren niveles superiores de permeabilidad intestinal después de un ictus en comparación con los animales salvajes.

### 3. Sobre los cambios en las poblaciones bacterianas y los SCFAs

En los animales sometidos al modelo tMCAo dormido, observamos un aumento de bacterias clostridiales (*Clostridia cluster IV* y *Clostridia clúster XIVa*), además de una disminución de ácido butírico. Estos datos parecen contradecirse ya que la mayoría de las especies bacterianas productoras de ácido butírico pertenecen a estos dos clústers (Geirnaert *et al.*, 2017), por lo que sería esperable observar un aumento de ácido butírico en estos animales. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la anestesia podría estar afectando las poblaciones bacterianas ya que, en este caso, no observamos el aumento persistente de enterobacterias que detectamos de forma recurrente en las muestras de heces y ciego de animales operados bajo el modelo tMCAo despierto. En definitiva, el estudio del efecto de la anestesia en las poblaciones bacterianas debe tenerse en cuenta en las investigaciones dirigidas al estudio de la microbiota intestinal y que utilizan modelos animales sometidos a intervenciones quirúrgicas. En nuestro caso, no hemos ahondado más en este tema al no tratarse del objetivo principal de esta tesis.

Los mismos investigadores que asociaron el aumento de enterobacterias a grupos de pacientes con alto riesgo de sufrir un ictus (Zeng *et al.*, 2019) también demostraron que este mismo grupo mostraba concentraciones reducidas de ácido butírico en las heces (además de una disminución de bacterias productoras de butirato). Nosotros observamos de manera reiterada que el ictus produce un aumento de la familia *Enterobacteriaceae* que no es posible revertir mediante tratamiento con propranolol o con LED209. Estos resultados sugieren que el control de la expansión de esta familia bacteriana se regula mediante otras vías no adrenérgicas.

En relación a la producción de SCFAs después del ictus, identificamos una tendencia general de la disminución de estos ácidos grasos, sobre todo en muestras de heces. Estos resultados van en línea con las observaciones del trabajo de Sadler y colaboradores (Sadler et al., 2019), quienes demuestran que la isquemia produce una disminución de estas moléculas en muestras de plasma. Estos mismos investigadores demostraron que la suplementación con SCFAs en agua de bebida, reduce la frecuencia de células T detectadas en cerebro y en bazo de animales isquémicos. Teniendo en cuenta que la neuroinflamación detectada en cerebros isquémicos se debe en parte a la infiltración de linfocitos T circulantes, futuros tratamientos para reducir esta situación podrían basarse en la administración de SCFAs, aunque para ello es necesario aún mayor investigación.

Los tratamientos con propranolol y con LED209 no produjeron cambios específicos en la concentración de SCFAs, a excepción de las muestras de ciego de animales isquémicos tratados con LED209, donde observamos una disminución del ácido acético que habría que confirmar en otros experimentos.

Llama la atención que en el tratamiento con LED209, cuya vía de administración es oral, haya una disminución significativa de todos los SCFAs en las muestras de heces de animales isquémicos que han recibido tanto vehículo como LED en comparación a las muestras obtenidas previamente a la administración y a la cirugía ([figura 42 de resultados](#)). Aunque parece haber una tendencia, este efecto no es significativo en las muestras de heces de animales isquémicos tratados con propranolol, el cual se administró vía intraperitoneal ([figura 40A de resultados](#)). En base a estas observaciones, se podría pensar que es debido a la composición del vehículo en el cual se disuelve el compuesto. Sin embargo, de ser este el caso deberíamos haber observado algún cambio en los animales control, a los que también administramos el vehículo. Una explicación alternativa podría ser que la vía de administración podría estar actuando sobre la actividad metabólica de las bacterias, por lo que sería recomendable incluir un grupo control de la vía de administración.

#### **4. Detección de CFUs, infección y efectos de los fármacos**

Teniendo en cuenta las diferentes vías de conexión entre el cerebro y el intestino, es posible especular que, a consecuencia de la isquemia, la función del intestino puede verse alterada, incluyendo las comunidades bacterianas contenidas en su interior. Sin embargo, la información sobre la función intestinal y la posible translocación de bacterias comensales desde el intestino después del ictus es limitada. Se trata de una cuestión polémica en la que la información es variable entre los diferentes estudios realizados hasta el momento.

En el trabajo de esta tesis, reportamos un aumento de la translocación bacteriana en muestras de mLN de animales isquémicos pasadas las 48 horas después del ictus. Estos datos coinciden con los reportados

por investigaciones previas (Crapser *et al.*, 2017), en los que también se apreciaron mayor número de CFUs en animales isquémicos en comparación con animales *sham* 3 días después de la isquemia. Estos resultados contrastan por los reportados por otras investigaciones, como las realizadas por Oyama y colaboradores (Oyama *et al.*, 2018) en las que, tras cultivar el homogenado de muestras de mLN 24 horas después de la inducción de una isquemia de 60 minutos, no observaron evidencias de translocación bacteriana entre los grupos *sham*, sin operar e isquémicos. Del mismo modo, tampoco se reportaron casos de translocación bacteriana en la lámina propia de muestras de intestino analizadas por hibridación *in situ* mediante sondas genéricas de detección de bacterias (Singh *et al.*, 2016).

A pesar del aumento de CFUs en mLN, no detectamos correlación entre el número de CFUs en ganglios, bazo e hígado y volumen de infarto y *neuroscore*. Un estudio del 2006 tampoco detectó correlación entre el número de CFUs en tejido pulmonar y el volumen de infarto (Schulte-Herbrüggen *et al.*, 2006). No obstante, sí que observamos que los animales que presentaban algún tipo de infección correspondían a los animales con peor estado neurológico (volumen de infarto y *neuroscore*). Los datos clínicos indican que pacientes que han sufrido un ictus severo y muestran un mayor volumen de infarto tienen también más posibilidades de sufrir una infección (Wartenberg *et al.*, 2011; Urra *et al.*, 2017). El intestino se conecta a nivel sanguíneo con el hígado mediante la vena porta, y al bazo mediante el sistema linfático, lo que supone dos vías de fácil acceso para las bacterias para alcanzar estos órganos y producir una infección. Además, observamos animales que tenían infección en mLN pero no en bazo y en hígado. Este resultado es acorde con el papel de los ganglios como barrera defensiva para contener la dispersión bacteriana a los órganos periféricos.

En relación a la vía de translocación bacteriana, no hay un consenso sobre la ruta de transporte. Sobre la vía de entrada a través de la sangre de los microorganismos del intestino, algunos estudios apoyan este proceso, ya que han detectado cultivos positivos en muestras de sangre de animales isquémicos (Prass *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2011), mientras que otros estudios experimentales no han detectado presencia bacteriana en muestras de sangre de animales isquémicos (Oyama *et al.*, 2018). Del mismo modo, en estudios clínicos no han detectado bacterias en muestras de sangre de pacientes isquémicos en la fase aguda del ictus (Gumbinger *et al.*, 2013). Esto podría deberse a que la vía de translocación se realice mediante la linfa, con opsonización por IgA. Esta inmunoglobulina es capaz de neutralizar las bacterias que han traspasado la barrera epitelial mediante su devolución al lumen intestinal o favoreciendo su eliminación a través de la presentación a células fagocíticas, como células dendríticas o neutrófilos (Cerutti y Rescigno, 2008). En futuros experimentos habría que determinar la cantidad de IgA presente en el contenido luminal de animales isquémicos y *sham*, esperando un aumento de IgA en los ratones que han sufrido el ictus. De hecho, en el trabajo de Stanley y colaboradores (Stanley *et al.*, 2016) confirmaron un aumento de células B productoras de IgA en los ganglios mesentéricos 24 horas después de la isquemia.

### 4.1 Sobre el efecto del propranolol

Los resultados muestran una ausencia de efecto del propranolol en la disminución de CFUs en los ganglios mesentéricos, lo que coincide con lo reportado por otros investigadores a las 24 horas post-reperusión (Stanley *et al.*, 2016). Estos mismos autores aseguran que el tratamiento con propranolol, realizado inmediatamente tras la reperusión (nosotros lo aplicamos justo antes de la intervención quirúrgica), a las 4 y a las 8 horas post-reperusión, mejoró los niveles de permeabilidad intestinal 24 horas después del ictus, si bien previamente (y paradójicamente) demostraron que a las 24 horas post-isquemia no hay diferencias de permeabilidad entre animales isquémicos y *sham*. Estos investigadores demostraron que el propranolol reduce la carga bacteriana en muestras procedentes de lavado bronqueoalveolar, hígado, bazo y pulmones, pero no encontraron diferencias entre los ganglios mesentéricos de ratones tratados con salino y con propranolol después del ictus. Nuestros resultados indicarían que la translocación bacteriana no es dependiente de la vía catecolaminérgica, y abren la posibilidad a la participación de otras vías implicadas en la infección, como la vía linfática.

### 4.2 Sobre el fármaco LED209

Al observar que el aumento de bacterias que veíamos en heces y en ciego eran mayoritariamente enterobacterias y que el tratamiento con propranolol no prevenía dicho aumento, consideramos una aproximación farmacológica dirigida a los receptores bacterianos. Partimos de la hipótesis de que el bloqueo de estos receptores podría impedir el crecimiento de enterobacterias tras la isquemia cerebral y prevenir la translocación bacteriana, lo cual podría constituir una alternativa a los antibióticos. De hecho, el propranolol no tiene ningún efecto sobre el receptor QseC (Rasko *et al.*, 2008). Esto nos llevó al tratamiento con el fármaco LED209. En esta tesis se ha aplicado por primera vez en el ámbito de la isquemia cerebral, el tratamiento mediante un agente no antibiótico dirigido a receptores del sistema de *quorum sensing* presente en bacterias. Un trabajo previo había demostrado que este fármaco atenuaba los efectos de la enfermedad inflamatoria intestinal en modelos *in vivo* y bloqueaba la expansión de las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (Rooks *et al.*, 2017). Para ello, administraron el fármaco diariamente mediante sonda oral a lo largo de la duración del experimento (un mínimo de 10 días hasta 28 días). En el trabajo en el que se descubrió la naturaleza bloqueadora del fármaco LED209 (Rasko *et al.*, 2008) aplicaron el fármaco en modelos de infección aguda, mediante sonda oral y 3 horas antes de la inoculación de diferentes cepas bacterianas, lo que nos inspiró a aplicar el compuesto también 3 horas antes de la realización de la isquemia, y una segunda y última dosis pasadas las 24 horas desde su inducción, para finalmente, sacrificar a los animales a las 48 horas después del ictus. Nuestros resultados indican que el tratamiento, tal como lo administramos, no impide el aumento de enterobacterias inducido por la isquemia. Tampoco observamos que el fármaco

disminuyera el número de CFUs detectadas en los cultivos de homogenados de mLN, bazo e hígado. Mientras que el trabajo de Rooks *et al* indica que la aplicación del fármaco produce una disminución de la expansión de enterobacterias en su modelo de enfermedad inflamatoria intestinal, los trabajos previos en los que se usó el fármaco demostraron la capacidad del LED209 como agente bloqueante de la expresión de los genes de virulencia de las bacterias, pero no de su expansión (Rasko *et al.*, 2008; Curtis *et al.*, 2014). La razón por la que no detectamos ningún efecto del fármaco en cuanto a su actuación sobre las enterobacterias y el número de colonias detectadas en placas podría ser que el tiempo para ver un efecto del fármaco es demasiado corto, o porque se necesita una dosis mayor, o bien sencillamente por la diferencia de modelos (el modelo de colitis utilizado por Rooks vs modelo de isquemia transitoria).

Como se ha comentado, el tratamiento con LED209 no redujo el número de CFUs detectadas en muestras de ganglios mesentéricos, bazo e hígado. Dado que el valor umbral utilizado es el resultado de la mediana de CFUs obtenidas a partir de homogenado de ganglios mesentéricos de animales *sham* y controles sin operar, para futuros experimentos se podría determinar si el valor umbral en los otros órganos estudiados (bazo e hígado) es el mismo y establecer las dicotomías en función del valor específico para cada órgano.

El receptor QseC responde al bloqueo mediante fármacos inhibidores de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, como la fentolamina, pero no a inhibidores de receptores de naturaleza  $\beta$ -adrenérgica, como el propranolol (Clarke *et al.*, 2006; Rasko *et al.*, 2008). Aunque se sabe que el fármaco LED209 no es tóxico para el hospedador en respuesta a la epinefrina y norepinefrina del mismo, cabe preguntarse qué efectos puede tener sobre el sistema adrenérgico de dicho hospedador. Hasta ahora, solo se ha estudiado su efecto en ensayos basados en células con isoformas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos humanos, en los que no se ha observado efecto del LED209, pero no se ha estudiado con receptores de naturaleza  $\alpha$ -adrenérgica (Rasko *et al.*, 2008). Dado que en nuestro modelo experimental el compuesto LED209 no ha frenado el aumento de enterobacterias de la microbiota intestinal, deducimos que lo más probable es que este aumento ni dependa de vías adrenérgicas ni se pueda prevenir bloqueando los sensores bacterianos Qsec, al menos con LED209. No obstante, el campo de los receptores sensores bacterianos avanza rápidamente y debería seguir estudiándose como estrategia potencial para el control selectivo del crecimiento de la microbiota intestinal como alternativa al uso de antibióticos.

### 5. Sobre las bacterias bioluminiscentes

Aunque la aspiración y la disfagia siguen siendo agentes clave en el desarrollo de neumonías asociadas al ictus isquémico, algunos investigadores sostienen que estas infecciones no pueden explicarse únicamente por estos factores ya que, entre otros, pacientes sanos que también muestran problemas de aspiración no desarrollan neumonías (Shim y Wong, 2018), indicando la posibilidad de otras causas que promuevan la infección pulmonar. En las investigaciones de Stanley (Stanley *et al.*, 2016) se llegó a vincular las infecciones pulmonares de los pacientes isquémicos con una translocación de bacterias comensales intestinales a los pulmones de estos pacientes. En nuestro trabajo, utilizando bacterias quimioluminiscentes, por primera vez en el ámbito del estudio cerebro-intestino en el ictus, hemos visualizado la presencia de bacterias en los pulmones en el 20% de los animales isquémicos, potencialmente atribuible a una translocación bacteriana a consecuencia de la isquemia cerebral. Nuestros resultados se aproximan a lo observado en estudios clínicos, en los que señalan que el ratio de infección pulmonar en pacientes isquémicos es del 10% (Westendorp *et al.*, 2011). La técnica que hemos utilizado (inoculación mediante sonda oral) permite especular que el resultado de la luz en los pulmones sea debido a que una parte de las bacterias hubiesen colonizado la parte alta del tubo digestivo y accedido fácilmente a los pulmones, sin necesidad de vincular el efecto a la isquemia. Sin embargo, de ser este el caso, sería esperable detectar un comportamiento similar en al menos uno de los animales *sham*, siguiendo la proporción de translocación de los animales isquémicos (animales isquémicos con luz en pulmón: 2/10; animales *sham* con luz en pulmón: 0/6). Pensamos que la presencia de luz en los pulmones podría estar relacionado con el volumen de infarto y el *neuroscore* pero dado el bajo número de animales isquémicos con luz en los pulmones, no pudimos estudiar una correlación entre la severidad de la lesión y la detección de luz fuera del intestino, por lo que sería necesario aumentar el número de animales en futuros experimentos.

### 6. Sobre la permeabilidad de la barrera intestinal

La contención física que permite la barrera intestinal es esencial para mantener la separación entre el interior intestinal y el medio externo. Según varios estudios previos, la permeabilidad de la barrera intestinal se ve comprometida como consecuencia del ictus isquémico (Stanley *et al.*, 2016; Crapser *et al.*, 2017). Sin embargo, se trata de un tema controvertido, ya que las investigaciones no coinciden en el momento post-isquemia en el que se produce dicha disrupción intestinal ni tampoco en los motivos. Tanto en el trabajo de Crapser (Crapser *et al.*, 2017) como en el trabajo de Stanley (Stanley *et al.*, 2016), la técnica utilizada para la determinación de la integridad intestinal es la administración oral de FITC dextrano de 4KDa y posterior cuantificación en plasma. El trabajo realizado por Stanley y colaboradores (Stanley *et al.*, 2016) sitúa en las 3 horas post-isquemia como el único momento en el que hay diferencias

en la extravasación de FITC dextrano entre animales isquémicos y *sham*, si bien observaron un aumento de la permeabilidad vascular en muestras de yeyuno e íleon a las 3 horas post-reperfusión. Los mismos investigadores observaron una disminución de la expresión de ZO-1 en el íleon de los animales isquémicos a las 24 horas post-isquemia, a pesar de no haber reportado diferencias de permeabilidad a este tiempo. Por el contrario, las investigaciones de Crapser y colaboradores (Crapser *et al.*, 2017) sitúan en las 24 horas post-ictus el punto en el que se produce la mayor permeabilidad intestinal, aunque solo considera animales envejecidos para el estudio con esta molécula. Teniendo en cuenta estos datos, en esta tesis estudiamos la permeabilidad intestinal de animales isquémicos, *sham* y animales control sin operar, mediante inoculación oral de FITC dextrano de 4KDa y mediante el sistema de la cámara de Ussing, siendo esta última una metodología no utilizada previamente en estudios del ámbito del ictus. Después de la administración no observamos diferencias de permeabilidad entre animales isquémicos y animales *sham* a las 3 y a las 24 horas después de la isquemia. En línea con nuestros resultados, el estudio realizado por Oyama y colaboradores (Oyama *et al.*, 2018) tampoco detectó diferencias de permeabilidad entre animales isquémicos y *sham*. En dicho trabajo se midió la permeabilidad intestinal mediante el test de manitol/lactulosa/sucralosa (el manitol es un monosacárido utilizado para el estudio del transporte transcelular; la lactulosa es un disacárido con transporte paracelular, metabolizado en el colon y utilizado para medir la permeabilidad en el intestino delgado; y la sucralosa es también un disacárido que no puede ser metabolizado y permite evaluar la permeabilidad de todo el intestino), y además estudiaron la integridad de las uniones celulares en íleon y colon mediante expresión de claudina-1 y ocludina por *western-blot*. Los investigadores no observaron diferencias de permeabilidad entre animales isquémicos y *sham* ni a las 48 horas ni a las 72 horas después del ictus pero sí confirmaron una disminución de claudina-1 en el íleon, tanto de animales *sham* como isquémicos, en comparación con los animales control, a las 24 y 72 horas post-isquemia. En nuestro caso, mediante el sistema de la cámara de Ussing tampoco detectamos cambios de permeabilidad con el uso de FITC dextrano. Sin embargo, sí detectamos una disminución del valor de la resistencia transepitelial (TER) en los animales isquémicos a 24 horas post-reperfusión en comparación con los animales controles, pero no entre animales isquémicos y *sham*. Niveles bajos de resistencia transepitelial están asociados a una alta permeabilidad (Thomson *et al.*, 2019). Estudios previos han demostrado que valores bajos de resistencia epitelial se relacionan con una disminución del número de cadenas proteicas implicadas en las uniones estrechas entre las células epiteliales (Claude, 1978) o a deficiencias en la expresión de dichas proteínas, como JAM-A (Laukoetter *et al.*, 2007). Los animales isquémicos muestran una disminución de TER que podría sugerir una desregulación de las proteínas de unión, pero solo en comparación con los controles.

Por tanto, en líneas generales, nuestros resultados demuestran que la isquemia no produce grandes cambios la permeabilidad intestinal en tiempos tempranos después de la inducción de la isquemia (3 y

24 horas post-ictus), pero sí podría inducir pequeñas alteraciones de las uniones epiteliales del intestino que pudieran permitir el acceso al exterior de algunas bacterias del interior intestinal. No hemos analizado la integridad de las uniones celulares, por lo que en futuros estudios podríamos indagar más en profundidad en este aspecto, así como ampliar el rango de horas post-ictus mediante ambas metodologías (*in vivo* y *ex vivo*), con el fin de confirmar si la permeabilidad intestinal es un factor que se ve afectado con el tiempo, o bien para descartar su relación con la isquemia cerebral.

Teniendo en cuenta que los cambios que observamos a nivel de inmunología intestinal y que la detección de bacterias bioluminiscentes en los pulmones se ha observado pasadas las 48 horas después de la isquemia, es posible que la razón por la que no detectemos cambios en la permeabilidad intestinal sea por la ventana temporal con la que hemos trabajado para este factor, a las 3 y a las 24 horas post-reperusión. En futuros experimentos se debe contemplar esta opción y estudiar los parámetros de permeabilidad a las 48 horas y así valorar esta situación con el resto de información obtenida también a este mismo tiempo.

### 7. Sobre la motilidad intestinal

Otra consecuencia que tener en cuenta a causa del impacto del ictus es la afectación a la motilidad intestinal. Se ha reportado que después del ictus una de las complicaciones intestinales más frecuentes es el estreñimiento, seguido de la disminución de la frecuencia del movimiento intestinal (Engler *et al.*, 2014). Nosotros analizamos la motilidad intestinal mediante el recorrido de avance del FITC dextrano de 4 KDa a lo largo del intestino delgado, entre animales isquémicos y *sham*, a las 3 y a las 24 horas post-reperusión, sin observar ninguna diferencia entre los animales *sham* e isquémicos, si bien sí observamos una disminución en relación a los animales control sin operar, tanto en animales isquémicos como *sham* a las 3 horas, quizá debido a un posible efecto residual de la anestesia sobre la motilidad intestinal al haber pasado pocas horas desde la inducción de la isquemia hasta el momento del sacrificio. En el trabajo de Stanley y colaboradores (Stanley *et al.*, 2016) se midieron, mediante la técnica de baño de órganos, las amplitudes de las contracciones proximales y distales del íleon, sin encontrar diferencias entre los animales isquémicos y *sham* a las 24 horas post-reperusión. Por el contrario, en el trabajo desarrollado por Singh y colaboradores (Singh *et al.*, 2016) muestran una disminución de la motilidad intestinal en el intestino delgado de animales isquémicos 24 horas después de la intervención mediante el análisis de la cantidad de FITC dextrano en diferentes tramos intestinales. Así, los resultados de motilidad intestinal después del ictus varían entre estudios. Hay que tener en cuenta que algunas de las técnicas utilizadas, como la técnica de baño de órganos, necesitan un fragmento pequeño del tejido intestinal y excluye el resto del tejido.

## 8. Sobre la corriente iónica y la afectación neurológica

Si bien no observamos diferencias en la motilidad, sí detectamos un aumento de la corriente iónica (aumento de la secreción intestinal) en animales isquémicos 3 horas después del ictus, que correlacionaba con aquellos animales con peor *neuroscore*, y que vuelve a los valores del control a las 24 horas. Por tanto, el valor de la corriente de cortocircuito a 3 horas es un parámetro que refleja la relación cerebro-intestino, puesto que a mayor daño neurológico, mayor secreción. Con los datos actuales no podemos confirmar que este resultado sea debido a la acción de neuronas secretoras intestinales. Para confirmarlo se podría plantear un experimento mediante la cámara de Ussing en el que se use tetrodotoxina, una neurotoxina que bloquea los canales de sodio, impidiendo así el potencial de acción neuronal. Añadido en el lado de la serosa, en el caso de que el incremento de la corriente en los animales isquémicos fuera el resultado de una activación neuronal, se debería esperar una reducción de los valores de corriente de cortocircuito similares a los que se observarían en los animales *sham* (quienes podrían presentar una posible reducción de la corriente por disminución del tono basal, pero que sería comparativamente menor a la esperable en los isquémicos).

## 9. Sobre el efecto de los fármacos en el volumen de la lesión

### 9.1 Sobre el efecto del propranolol, el volumen de infarto y la respuesta inmune

La aplicación de carvedilol, un agente  $\beta$ -bloqueante, antes de la inducción de la isquemia en ratas, permitió una reducción del volumen de infarto de hasta el 40% y mejoró el déficit neurológico (Savitz *et al.*, 2000). Del mismo modo, la administración del propranolol junto la administración de mifepistona (agente bloqueante del eje HPA) redujo el volumen de infarto en los animales isquémicos (Romer *et al.*, 2015). Sin embargo, en el estudio realizado por Prass y colaboradores (Prass *et al.*, 2003), si bien el propranolol disminuyó drásticamente la mortalidad después de la isquemia, no modificó el volumen de infarto. En estos dos últimos casos, la administración de la primera dosis del fármaco se realizó inmediatamente después de la cirugía. Nuestros resultados muestran que el propranolol disminuye el volumen de infarto y mejora la puntuación neurológica. En trabajos de modelos de isquemia cerebral transitoria en ratas se ha observado que la reperfusión producida tras la retirada del filamento puede producir hiperemia, asociada a una peor lesión cerebral (Onetti *et al.*, 2015). Dado el papel del propranolol como agente antihipertensivo y su administración previa al daño por ictus, es plausible pensar que está impidiendo un aumento de la presión arterial, lo que evitaría una mayor lesión por reperfusión y consecuentemente, daría un menor volumen de infarto. Teniendo en cuenta esto, no podemos descartar que el efecto del propranolol en la reversión de los cambios inmunológicos en los

mLN se deba a una menor respuesta inmune en consonancia con el volumen de infarto y no tanto a una acción directa del fármaco sobre el sistema inmune.

### 9.2 Sobre el efecto del LED209

El inhibidor del receptor bacteriano QseC, el compuesto LED209 que se había utilizado previamente *in vivo* (Rooks *et al.*, 2017) no impidió el crecimiento de enterobacterias inducido por la isquemia, ni afectó al volumen de la lesión. Sería necesario realizar estudios con otras dosis y/o pautas de administración o bien otros inhibidores para concluir si las catecolaminas liberadas post-isquemia podrían afectar directamente a las poblaciones bacterianas del intestino y estas a la lesión cerebral.

## 10. Resumen/modelo

Los resultados de esta tesis ponen de manifiesto la comunicación entre el cerebro y el intestino después del ictus isquémico y la posibilidad de modular dicha comunicación. En la figura 58 se recoge a modo ilustrativo la relación de los resultados de este proyecto de investigación.

La isquemia produce un aumento de linfocitos intraepiteliales T $\delta$  al mismo tiempo que un aumento de IFN $\gamma$  y disminución de linfocitos Treg en ganglios mesentéricos a las 48 horas después de la reperusión (número 1 de la figura 58). Esta situación responde a un contexto proinflamatorio, que se refuerza con el aumento en heces y en ciego de enterobacterias (2). Este entorno proinflamatorio se ve disminuido en parte por el tratamiento con el  $\beta$ -bloqueante propranolol, que evita en ganglios mesentéricos la disminución y el aumento de células Treg e IFN $\gamma$  respectivamente, aunque no previene el aumento de linfocitos T $\delta$  (3). Tampoco evita la expansión de enterobacterias, efecto que también se mantiene después del tratamiento con LED209 (4, 5). Se plantea la posibilidad de que el aumento en linfocitos T $\delta$  se trate de una estrategia protectora frente al incremento inevitable de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. Ambos factores favorecerían el mantenimiento de la respuesta local inflamatoria.

En relación a la translocación bacteriana (6) la isquemia también favorece este proceso a ganglios mesentéricos, como sugiere el crecimiento de CFUs en placas de agar (6a). El tratamiento con propranolol no disminuye el número de CFUs entre animales tratados con el fármaco y animales tratados con vehículo (7). De igual manera, la inoculación oral de LED209 no produce diferencias significativas en el número de CFUs en muestras de ganglios, bazo e hígado de animales isquémicos tratados con este producto y animales que recibieron solo el vehículo (8). Considerando el papel  $\beta$ -bloqueante del propranolol, y la similitud del receptor QseC con receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, proponemos que la vía adrenérgica no está implicada en el proceso de translocación bacteriana, aunque también valoramos la posibilidad de replantear el procedimiento experimental del tratamiento con

LED209 u otros bloqueantes de receptores sensores de las bacterias. Aunque no correlacionamos el volumen de infarto ni el *neuroscore* con el número de CFUs contabilizadas, sí observamos que aquellos animales que presentan infección tanto en bazo como en hígado tienen un mayor volumen de infarto y peor comportamiento neurológico, lo que sugiere que un volumen de infarto grande no asegura que se produzca infección pero aumenta el riesgo, de manera que la infección en varios órganos periféricos sí se asocia a una mayor lesión cerebral.

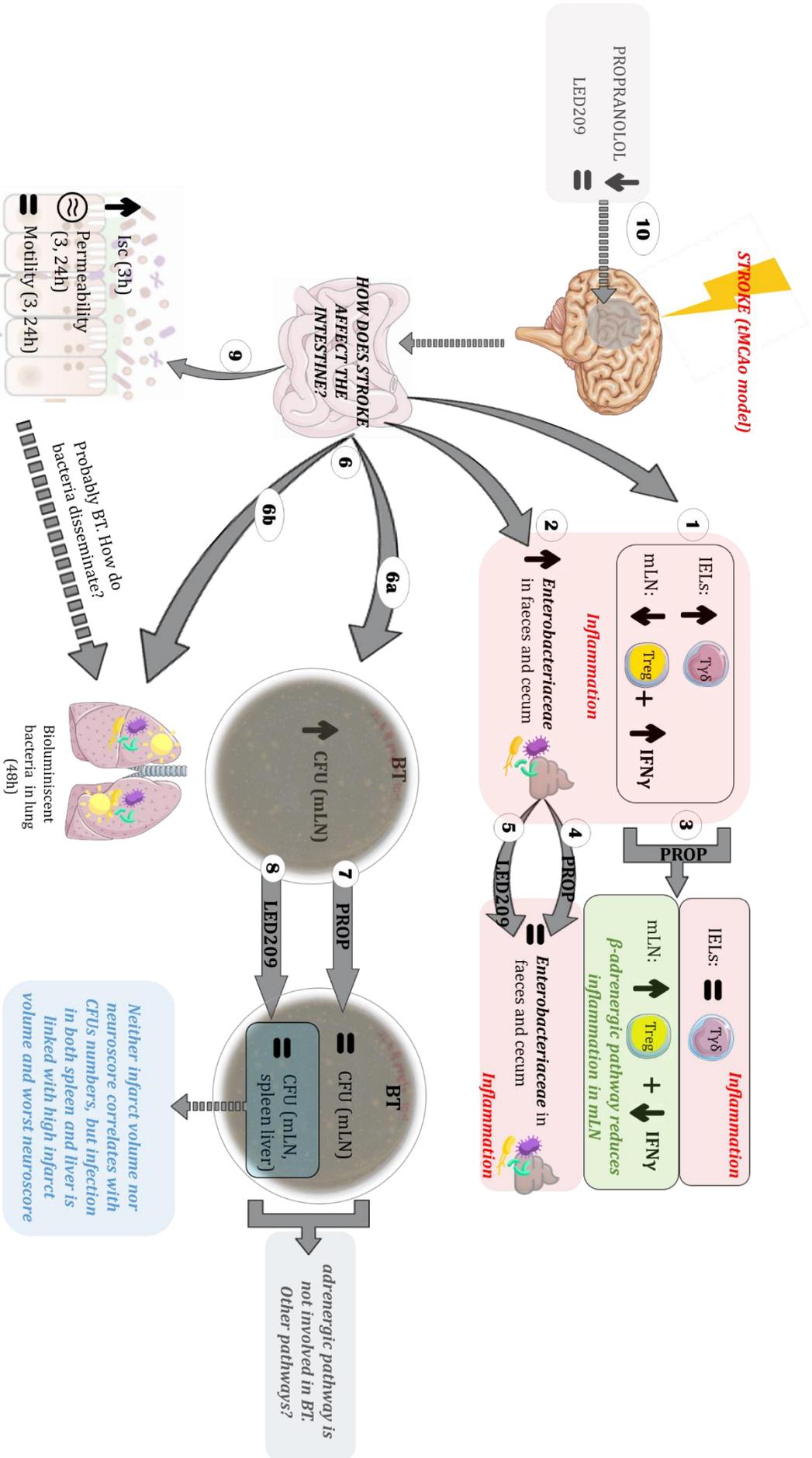
Además, la inducción de la isquemia en animales a los que se les habían administrado bacterias bioluminiscentes mediante vía oral y que habían colonizado el tracto digestivo, muestra que en al menos un 20% de los ratones isquémicos se detecta luz en los pulmones (6b), lo que indica que las bacterias después del ictus son capaces de desplazarse desde regiones intestinales hacia órganos periféricos. Sin embargo, puesto que no observamos cambios en la motilidad intestinal ni grandes diferencias en la permeabilidad intestinal (9), surgen los siguientes planteamientos: puede que la translocación vía paracelular no se produzca hasta las 48 horas después del ictus, o bien hay otras vías de translocación bacteriana que no son dependientes del transporte paracelular. A pesar de ello, la alteración de la resistencia epitelial sugiere pequeñas alteraciones en la pared epitelial que podrían facilitar una discreta translocación que explicara los demás cambios observados en esta tesis. Teniendo en cuenta el papel de los linfocitos T $\delta\gamma$  en el mantenimiento de la barrera epitelial intestinal y su aumento a las 48 horas después del ictus, cabe plantearse la posibilidad de que dicho aumento de linfocitos esté previniendo una permeabilidad mayor. En cambio, sí observamos un cambio de corriente (I<sub>sc</sub>) asociado a la isquemia, por el que los animales con peor comportamiento neurológico corresponden con los animales que muestran mayor secreción iónica.

El volumen de infarto y el comportamiento neurológico están disminuidos en los animales isquémicos que han recibido tratamiento con propranolol, como habían sugerido publicaciones previas, mientras que el tratamiento con el fármaco LED209 no interviene en la modulación de la lesión cerebral (10).

Estos resultados nos indican la necesidad de realizar más experimentos para confirmar la implicación de las células del sistema inmune intestinal tanto en la inflamación como en la protección de la integridad de la barrera intestinal así como determinar el papel de las bacterias como agente agravante de un ictus.

**Figura 58. Representación esquemática de los principales resultados de la tesis e interpretación de los mismos.** BT= *bacterial translocation* (translocación bacteriana). 1) Sistema inmune intestinal. 2) Cambios en las poblaciones bacterianas. 3) Sistema inmune intestinal después del tratamiento con propranolol (“prop” = propranolol). 4) Cambios en las poblaciones bacterianas después del tratamiento con propranolol. 5) Cambios en las poblaciones bacterianas después del tratamiento con LED209. 6) Translocación bacteriana, 6a. Crecimiento en placas de agar, 6b. Bacterias bioluminiscentes. 7) Tratamiento con propranolol para translocación bacteriana. 8) Tratamiento con LED209 para translocación bacteriana. 9) Integridad física intestinal. 10) Volumen de infarto y comportamiento neurológico después de los tratamientos. Imágenes obtenidas de *Servier Medical Art* (<http://smart.servier.com>) y *medicalart.com* y *flaticon* (vector *poop*: <http://bit.ly/33oCR0r>; vector aproximación <http://bit.ly/39OnErY>; vector bacteria: <http://bit.ly/2U6yjrr>. (Imagen del transporte paracelular del intestino: modificada de Nagpal y Yadav, 2017).







---

## **CONCLUSIONES**

---



Considerando los resultados de esta tesis, concluimos que:

1. La intervención sham para el modelo de 45 minutos de tMCAo dormido, produce cambios en las poblaciones del sistema inmune intestinal. Esos cambios pueden evitarse al interrumpir la exposición con la anestesia y reduciendo el tiempo de contacto con la misma.
2. La anestesia prolongada con isoflurano disminuye el número de linfocitos intraepiteliales.
3. La isquemia cerebral reduce las poblaciones de células T y B y favorece el aumento de la producción de IFN $\gamma$  en los ganglios mesentéricos.
4. La isquemia cerebral aumenta la respuesta inmune intestinal mediada por los linfocitos T $\gamma\delta$  intraepiteliales.
5. La vía  $\beta$ -adrenérgica está implicada en las alteraciones inmunes de los ganglios mesentéricos, pero no actúa sobre los linfocitos intraepiteliales.
6. La isquemia cerebral induce un aumento de las enterobacterias de la microbiota intestinal que no está mediado por la vía adrenérgica.
7. La isquemia cerebral facilita la translocación bacteriana a ganglios mesentéricos.
8. Las infecciones se observan en los animales con peor estado neurológico. Parte de las infecciones puede ser el resultado de la translocación desde el intestino.
9. La isquemia cerebral afecta a la secreción iónica intestinal.
10. El propranolol puede tener efectos protectores en la isquemia cerebral.



---

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



**A**

Allaire, J. M. *et al.* (2018) «The intestinal epithelium: central coordinator of mucosal immunity», *Trends in Immunology*, 39(9), pp. 677-696. doi: 10.1016/j.it.2018.04.002.

Anastasian, Z. H. (2014) «Anaesthetic management of the patient with acute ischaemic stroke», *British Journal of Anaesthesia*, 113(S2), pp. ii9-ii16. doi: 10.1093/bja/aeu372.

Arboleya, S. *et al.* (2012) «Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates», *FEMS Microbiology Ecology*, 79(3), pp. 763-772. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01261.x.

Atallah, M. *et al.* (1991) «Immunomodulating effects of halothane in mice.», *European journal of anaesthesiology*, 8(3), pp. 239-44.

Atarashi, K. *et al.* (2011) «Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species», *Science*, 331(6015), pp. 337-341. doi: 10.1126/science.1198469.

**B**

Baban, C. K. *et al.* (2012) «Bioluminescent bacterial imaging in vivo», *Journal of Visualized Experiments*, e4318(69), pp. 1-6. doi: 10.3791/4318.

Becker, K. J. *et al.* (2011) «Autoimmune responses to the brain after stroke are associated with worse outcome», *Stroke*, 42(10), pp. 2763-2769. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.619593.

Benakis, C. *et al.* (2016) «Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal  $\gamma\delta$  T cells», *Nature Medicine*, 22(5), pp. 516-523. doi: 10.1038/nm.4068.

Benakis, C. *et al.* (2020) «The microbiome-gut-brain axis in acute and chronic brain diseases», *Current Opinion in Neurobiology*, 61, pp. 1-9. doi: 10.1016/j.conb.2019.11.009.

Bourne, R. (2010) «ImageJ», en *Fundamentals of digital imaging in medicine*. London: Springer London, pp. 185-188. doi: 10.1007/978-1-84882-087-6\_9.

Brinjikji, W. *et al.* (2017) «Anesthesia-related outcomes for endovascular stroke revascularization: A systematic review and meta-analysis», *Stroke*, 48(10), pp. 2784-2791. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017786.

Brodl, E., Winkler, A. y Macheroux, P. (2018) «Molecular mechanisms of bacterial bioluminescence», *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 16, pp. 551-564. doi: 10.1016/j.csbj.2018.11.003.

Bylund, D. B. (2015) «Propranolol», en Caplan, M. y Bradshaw, R. (eds.) *Reference Module in Biomedical*

*Sciences*. Amsterdam: ElSevier, pp. 1-8. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.09248-5.

### C

Cai, Q. *et al.* (2016) «A modification of intraluminal middle cerebral artery occlusion/reperfusion model for ischemic stroke with laser Doppler flowmetry guidance in mice», *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 12, pp. 2851-2858. doi: 10.2147/NDT.S118531.

Canazza, A. *et al.* (2014) «Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies», *Frontiers in Neurology*, 5, pp. 1-15. doi: 10.3389/fneur.2014.00019.

Capaldo, C. T. y Nusrat, A. (2015) «Claudin switching: physiological plasticity of the tight junction», *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 42, pp. 22-29. doi: 10.1016/j.semdb.2015.04.003.

Cerutti, A. y Rescigno, M. (2008) «The biology of intestinal immunoglobulin A responses», *Immunity*, 28(6), pp. 740-750. doi: 10.1016/j.immuni.2008.05.001.

Chamorro, A. *et al.* (2005) «The early systemic prophylaxis of infection after stroke study», *Stroke*, 36(7), pp. 1495-1500. doi: 10.1161/01.STR.0000170644.15504.49.

Chamorro, A. *et al.* (2007) «Catecholamines, infection, and death in acute ischemic stroke.», *Journal of the neurological sciences*, 252(1), pp. 29-35. doi: 10.1016/j.jns.2006.10.001.

Chamorro, A. *et al.* (2012) «The immunology of acute stroke», *Nature Reviews Neurology*, 8(7), pp. 401-410. doi: 10.1038/nrneurol.2012.98.

Chelakkot, C., Ghim, J. y Ryu, S. H. (2018) «Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications», *Experimental & Molecular Medicine*, 50(8), p. 103. doi: 10.1038/s12276-018-0126-x.

Cheroutre, H., Lambolez, F. y Mucida, D. (2011) «The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes», *Nature Reviews Immunology*, 11(7), pp. 445-456. doi: 10.1038/nri3007.

Clarke, L. L. (2009) «A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine», *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(6), pp. G1151-G1166. doi: 10.1152/ajpgi.90649.2008.

Clarke, M. B. *et al.* (2006) «The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27), pp. 10420-10425. doi: 10.1073/pnas.0604343103.

Claude, P. (1978) «Morphological factors influencing transepithelial permeability: A model for the

resistance of the Zonula Occludens», *The Journal of Membrane Biology*, 39(2), pp. 219-232. doi: 10.1007/BF01870332.

Crapser, J. *et al.* (2017) «Ischemic stroke induces gut permeability and enhances bacterial translocation leading to sepsis in aged mice», *Aging*, 8(5), pp. 1049-1063. doi: 10.18632/aging.100952.

Cruickshank, J. M. (2016) «The Role of Beta-Blockers in the Treatment of Hypertension», en Crusio, W. E., Radeke, H. H., y Rezaei, N. (eds.) *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, pp. 149-166. doi: 10.1007/5584\_2016\_36.

Curtis, M. M. *et al.* (2014) «QseC inhibitors as an antivirulence approach for gram-negative pathogens», *mBio*, 5(6), pp. 1-11. doi: 10.1128/mBio.02165-14.

## **D**

Dalile, B. *et al.* (2019) «The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication», *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(8), pp. 461-478. doi: 10.1038/s41575-019-0157-3.

Denes, A. *et al.* (2011) «Experimental stroke-induced changes in the bone marrow reveal complex regulation of leukocyte responses», *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(4), pp. 1036-1050. doi: 10.1038/jcbfm.2010.198.

Denes, A. *et al.* (2014) «Surgical manipulation compromises leukocyte mobilization responses and inflammation after experimental cerebral ischemia in mice», *Frontiers in Neuroscience*, 7, pp. 1-9. doi: 10.3389/fnins.2014.00271.

Dokladny, K., Zuhl, M. N. y Moseley, P. L. (2016) «Intestinal epithelial barrier function and tight junction proteins with heat and exercise», *Journal of Applied Physiology*, 120(6), pp. 692-701. doi: 10.1152/jappphysiol.00536.2015.

Dziedzic, T. *et al.* (2007) «Beta-blockers reduce the risk of early death in ischemic stroke», *Journal of the Neurological Sciences*, 252(1), pp. 53-56. doi: 10.1016/j.jns.2006.10.007.

## **E**

Engel, O. *et al.* (2011) «Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model», *Journal of Visualized Experiments*, e2423(47), pp. 1-5. doi: 10.3791/2423.

Engel, O. *et al.* (2015) «Cholinergic pathway suppresses pulmonary innate immunity facilitating pneumonia after stroke», *Stroke*, 46(11), pp. 3232-3240. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.008989.

Engler, T. M. N. de M. *et al.* (2014) «Stroke: bowel dysfunction in patients admitted for rehabilitation»,

*The Open Nursing Journal*, 8(1), pp. 43-47. doi: 10.2174/1874434601408010043.

### **F**

Fay, N. S., Larson, E. C. y Jameson, J. M. (2016) «Chronic inflammation and  $\gamma\delta$  T cells», *Frontiers in Immunology*, 7(210), pp. 1-6. doi: 10.3389/fimmu.2016.00210.

Field, M. (2003) «Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea», *Journal of Clinical Investigation*, 111(7), pp. 931-943. doi: 10.1172/JCI200318326.

Fujihashi, K. *et al.* (1996) «gamma/delta T cell-deficient mice have impaired mucosal immunoglobulin A responses.», *The Journal of Experimental Medicine*, 183(4), pp. 1929-1935. doi: 10.1084/jem.183.4.1929.

Furness, J. B. (2012) «The enteric nervous system and neurogastroenterology», *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(5), pp. 286-294. doi: 10.1038/nrgastro.2012.32.

Furusawa, Y. *et al.* (2013) «Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells», *Nature*, 504(7480), pp. 446-450. doi: 10.1038/nature12721.

### **G**

Garcia, J. H. (1984) «Experimental ischemic stroke: a review.», *Stroke*, 15(1), pp. 5-14. doi: 10.1161/01.STR.15.1.5.

Geirnaert, A. *et al.* (2017) «Butyrate-producing bacteria supplemented in vitro to Crohn's disease patient microbiota increased butyrate production and enhanced intestinal epithelial barrier integrity», *Scientific Reports*, 7(1), p. 11450. doi: 10.1038/s41598-017-11734-8.

Gelderblom, M. *et al.* (2012) «Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke», *Blood*, 120(18), pp. 3793-3802. doi: 10.1182/blood-2012-02-412726.

González, L. *et al.* (2003) «Tight junction proteins», *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 81(1), pp. 1-44. doi: 10.1016/S0079-6107(02)00037-8.

Gumbinger, C. *et al.* (2013) «Early blood-based microbiological testing is ineffective in severe stroke patients», *Journal of the Neurological Sciences*, 325(1-2), pp. 46-50. doi: 10.1016/j.jns.2012.11.014.

### **H**

Hansbrough, J. F. *et al.* (1985) «Alterations in Splenic Lymphocyte Subpopulations and Increased Mortality from Sepsis Following Anesthesia in Mice», *Anesthesiology*, 63(3), pp. 267-273. doi:

10.1097/00000542-198509000-00005.

Henao-Mejia, J. *et al.* (2013) «The intestinal microbiota in chronic liver disease», en Alt, F. (ed.) *Advances in Immunology*. 1.<sup>a</sup> ed. Elsevier Inc., pp. 73-97. doi: 10.1016/B978-0-12-410524-9.00003-7.

Hoffmann, U. *et al.* (2016) «Anesthesia in experimental stroke research», *Translational Stroke Research*, 7(5), pp. 358-367. doi: 10.1007/s12975-016-0491-5.

Houlden, A. *et al.* (2016) «Brain injury induces specific changes in the caecal microbiota of mice via altered autonomic activity and mucoprotein production», *Brain, Behavior, and Immunity*, 57, pp. 10-20. doi: 10.1016/j.bbi.2016.04.003.

## I

Johnson, W. *et al.* (2016) «Stroke: A global response is needed», *Bulletin of the World Health Organization*, 94(9), pp. 634A-635A. doi: 10.2471/BLT.16.181636.

## K

Kabelitz, D. (2007) «Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes», *Current Opinion in Immunology*, 19(1), pp. 39-45. doi: 10.1016/j.coi.2006.11.007.

Kalra, L. *et al.* (2015) «Prophylactic antibiotics after acute stroke for reducing pneumonia in patients with dysphagia (STROKE-INF): A prospective, cluster-randomised, open-label, masked endpoint, controlled clinical trial», *The Lancet*, 386(10006), pp. 1835-1844. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00126-9.

Katan, M. y Luft, A. (2018) «Global burden of stroke», *Seminars in Neurology*, 38(02), pp. 208-211. doi: 10.1055/s-0038-1649503.

Kelly, D. *et al.* (2004) «Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- $\gamma$  and RelA», *Nature Immunology*, 5(1), pp. 104-112. doi: 10.1038/ni1018.

Kheradpezhoh, E. *et al.* (2008) «A new method of brain staining with triphenyltetrazolium chloride to determine the infarct size in rats», *Journal of Applied Animal Research*, 33(2), pp. 149-152. doi: 10.1080/09712119.2008.9706917.

Kiela, P. R. y Ghishan, F. K. (2016) «Physiology of intestinal absorption and secretion», *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(2), pp. 145-159. doi: 10.1016/j.bpg.2016.02.007.

Kirsch, J. R., Traystman, R. J. y Hurn, P. D. (1996) «Anesthetics and cerebroprotection», *International Anesthesiology Clinics*, 34(4), pp. 73-94. doi: 10.1097/00004311-199603440-00007.

Kleinschnitz, C., Fluri, F. y Schuhmann, M. (2015) «Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research», *Drug Design, Development and Therapy*, 9, pp. 3445-3454. doi: 10.2147/DDDT.S56071.

Koerner, I. P. y Brambrink, A. M. (2006) «Brain protection by anesthetic agents», *Current Opinion in Anaesthesiology*, 19(5), pp. 481-486. doi: 10.1097/01.aco.0000245271.84539.4c.

Konjar, Š. *et al.* (2017) «Intestinal barrier interactions with specialized CD8 T cells», *Frontiers in Immunology*, 8(1281), pp. 1-15. doi: 10.3389/fimmu.2017.01281.

Kumar, A., Aakriti y Gupta, V. (2016) «A review on animal models of stroke: An update», *Brain Research Bulletin*, 122, pp. 35-44. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.02.016.

### **L**

Lane, E. R., Zisman, T. y Suskind, D. (2017) «The microbiota in inflammatory bowel disease: current and therapeutic insights», *Journal of Inflammation Research*, 10, pp. 63-73. doi: 10.2147/JIR.S116088.

Langhorne, P. *et al.* (2000) «Medical complications after stroke», *Stroke*, 31(6), pp. 1223-1229. doi: 10.1161/01.STR.31.6.1223.

Laowattana, S. y Oppenheimer, S. M. (2007) «Protective effects of beta-blockers in cerebrovascular disease», *Neurology*, 68(7), pp. 509-514. doi: 10.1212/01.wnl.0000253186.23949.fd.

Laukoetter, M. G. *et al.* (2007) «JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo», *The Journal of Experimental Medicine*, 204(13), pp. 3067-3076. doi: 10.1084/jem.20071416.

Lee, J. S. *et al.* (2015) «Interleukin-23-independent IL-17 production regulates intestinal epithelial permeability», *Immunity*, 43(4), pp. 727-738. doi: 10.1016/j.immuni.2015.09.003.

Longa, E. Z. *et al.* (1989) «Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats», *Stroke*, 20, pp. 84-91. doi: 10.1161/01.STR.20.1.84.

Lupp, C. *et al.* (2007) «Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae», *Cell Host & Microbe*, 2(2), pp. 119-129. doi: 10.1016/j.chom.2007.06.010.

Lyte, M., Vulchanova, L. y Brown, D. R. (2011) «Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa-bacteria interactions», *Cell and Tissue Research*, 343(1), pp. 23-32. doi: 10.1007/s00441-010-1050-0.

**M**

Van der Maaten, L. y Hinton, G. (2008) «Visualizing data using t-SNE», *Journal of Machine Learning Research*, 9, pp. 2579-2605.

Maier, I. L. *et al.* (2015) «Effect of beta-blocker therapy on the risk of infections and death after acute stroke – a historical cohort study», *PLOS ONE*, 10(2), p. e0116836. doi: 10.1371/journal.pone.0116836.

Mair, F. *et al.* (2016) «The end of gating? An introduction to automated analysis of high dimensional cytometry data», *European Journal of Immunology*, 46(1), pp. 34-43. doi: 10.1002/eji.201545774.

Marchiando, A. M. *et al.* (2010) «Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo», *The Journal of Cell Biology*, 189(1), pp. 111-126. doi: 10.1083/jcb.200902153.

Martínez-Sánchez, P., Fuentes, B. y Ruiz Ares, G. (2015) «Ictus isquémico, infarto cerebral y ataque isquémico transitorio», *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(71), pp. 4230-4241. doi: 10.1016/S0304-5412(15)30002-0.

McCulloch, L., Smith, C. J. y McColl, B. W. (2017) «Erratum: corrigendum: adrenergic-mediated loss of splenic marginal zone B cells contributes to infection susceptibility after stroke», *Nature Communications*, 8(1), p. 16151. doi: 10.1038/ncomms16151.

Miller, M. B. y Bassler, B. L. (2001) «Quorum sensing in bacteria», *Annual Review of Microbiology*, 55(1), pp. 165-199. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.165.

Miró-Mur, F. *et al.* (2016) «Antigen presentation after stroke», *Neurotherapeutics*, 13(4), pp. 719-728. doi: 10.1007/s13311-016-0469-8.

Mowat, A. M. y Agace, W. W. (2014) «Regional specialization within the intestinal immune system», *Nature Reviews Immunology*, 14(10), pp. 667-685. doi: 10.1038/nri3738.

Myers, M. G. *et al.* (1981) «Plasma norepinephrine in stroke.», *Stroke*, 12(2), pp. 200-204. doi: 10.1161/01.STR.12.2.200.

**N**

Nagel, M. A. y Gilden, D. (2014) «Neurological Complications of VZV Reactivation», *Current Opinion of Neurology*, 27(3), pp. 356-360. doi: 10.1097/WCO.000000000000092.Neurological.

Nagpal, R. y Yadav, H. (2017) «Bacterial translocation from the gut to the distant organs: an overview», *Annals of Nutrition and Metabolism*, 71(1), pp. 11-16. doi: 10.1159/000479918.

Napolitano, L. M. *et al.* (1996) «The impact of femur fracture with associated soft tissue injury on immune function and intestinal permeability», *Shock*, 5(3), pp. 202-207. doi: 10.1097/00024382-199603000-00006.

Nielsen, M. M., Witherden, D. A. y Havran, W. L. (2017) « $\gamma\delta$  T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues», *Nature Reviews Immunology*, 17(12), pp. 733-745. doi: 10.1038/nri.2017.101.

### **Q**

Obrenovich, M. (2018) «Leaky Gut, Leaky Brain?», *Microorganisms*, 6(4), p. 107. doi: 10.3390/microorganisms6040107.

Onetti, Y. *et al.* (2015) «Middle cerebral artery remodeling following transient brain ischemia is linked to early postischemic hyperemia: a target of uric acid treatment», *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 308(8), pp. H862-H874. doi: 10.1152/ajpheart.00001.2015.

Otxoa-de-Amezaga, A. *et al.* (2019) «Microglial cell loss after ischemic stroke favors brain neutrophil accumulation», *Acta Neuropathologica*, 137(2), pp. 321-341. doi: 10.1007/s00401-018-1954-4.

Oyama, N. *et al.* (2018) «Exploratory investigation of intestinal function and bacterial translocation after focal cerebral ischemia in the mouse», *Frontiers in Neurology*, 9(937), pp. 1-10. doi: 10.3389/fneur.2018.00937.

### **P**

Palm, F., Urbanek, C. y Grau, A. (2009) «Infection, its treatment and the risk for stroke», *Current Vascular Pharmacology*, 7(2), pp. 146-152. doi: 10.2174/157016109787455707.

Park, S.-G. *et al.* (2010) «T regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing  $\gamma\delta$  T cells», *Immunity*, 33(5), pp. 791-803. doi: 10.1016/j.immuni.2010.10.014.

Paterson, D. L. (2012) «Infections due to other members of the Enterobacteriaceae, including management of multidrug-resistant strains», en *Goldman's Cecil Medicine*. 24th ed. Elsevier, pp. 1874-1877. doi: 10.1016/B978-1-4377-1604-7.00313-4.

Perez-Lopez, A. *et al.* (2016) «Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria», *Nature Reviews Immunology*, 16(3), pp. 135-148. doi: 10.1038/nri.2015.17.

Peterson, L. W. y Artis, D. (2014) «Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis», *Nature Reviews Immunology*, 14(3), pp. 141-153. doi: 10.1038/nri3608.

Poulsen, S. B., Fenton, R. A. y Rieg, T. (2015) «Sodium-glucose cotransport», *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 24(5), pp. 463-469. doi: 10.1097/MNH.0000000000000152.

Prass, K. *et al.* (2003) «Stroke-induced Immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation», *The Journal of Experimental Medicine*, 198(5), pp. 725-736. doi: 10.1084/jem.20021098.

Pu, J., Cao, L. y McCaig, C. D. (2015) «Physiological extracellular electrical signals guide and orient the polarity of gut epithelial cells», *Tissue Barriers*, 3(3), pp. 1-7. doi: 10.1080/21688370.2015.1037417.

## **R**

Rasko *et al.* (2008) «Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development», *Science*, 321(5892), pp. 1078-1080. doi: 10.1126/science.1160354.

Rescigno, M. *et al.* (2001) «Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria.», *Nature immunology*, 2(4), pp. 361-367. doi: 10.1038/86373.

Riedel, C. U. *et al.* (2007) «Construction of p16Slux, a novel vector for improved bioluminescent labeling of gram-negative bacteria», *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), pp. 7092-7095. doi: 10.1128/AEM.01394-07.

Romer, C. *et al.* (2015) «Blocking stroke-induced immunodeficiency increases CNS antigen-specific autoreactivity but does not worsen functional outcome after experimental stroke», *Journal of Neuroscience*, 35(20), pp. 7777-7794. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1532-14.2015.

Rooks, M. G. *et al.* (2017) «QseC inhibition as an antivirulence approach for colitis-associated bacteria», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(1), pp. 142-147. doi: 10.1073/pnas.1612836114.

Rousselet, E., Kriz, J. y Seidah, N. G. (2012) «Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining», *Journal of Visualized Experiments*, 49(69), pp. 635-639. doi: 10.3791/4038.

Ruhnau, J. *et al.* (2014) «Stroke alters respiratory burst in neutrophils and monocytes», *Stroke*, 45(3), pp. 794-800. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.003342.

## **S**

Sadler, R. *et al.* (2019) «Short-chain fatty acids improve post-stroke recovery via immunological mechanisms», *The Journal of Neuroscience*, pp. 1359-19. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1359-19.2019.

- Salas-Perdomo, A. *et al.* (2018) «T cells prevent hemorrhagic transformation in ischemic stroke by P-selectin binding», *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(8), pp. 1761-1771. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311284.
- Salazar, N. *et al.* (2011) «Safety and intestinal microbiota modulation by the exopolysaccharide-producing strains *Bifidobacterium animalis* IPLA R1 and *Bifidobacterium longum* IPLA E44 orally administered to Wistar rats», *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), pp. 342-351. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.016.
- Savitz, S. I. *et al.* (2000) «The novel  $\beta$ -blocker, carvedilol, provides neuroprotection in transient focal stroke», *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 20(8), pp. 1197-1204. doi: 10.1097/00004647-200008000-00005.
- Scanzano, A. y Cosentino, M. (2015) «Adrenergic regulation of innate immunity: a review», *Frontiers in Pharmacology*, 6(171). doi: 10.3389/fphar.2015.00171.
- Scharl, M. *et al.* (2009) «AMP-activated protein kinase mediates the interferon- $\gamma$ -induced decrease in intestinal epithelial barrier function», *Journal of Biological Chemistry*, 284(41), pp. 27952-27963. doi: 10.1074/jbc.M109.046292.
- Schulte-Herbrüggen, O. *et al.* (2006) «Mouse strains differ in their susceptibility to poststroke infections», *Neuroimmunomodulation*, 13(1), pp. 13-18. doi: 10.1159/000092109.
- Shahjouei, S. *et al.* (2016) «Middle cerebral artery occlusion model of stroke in rodents: a step-by-step approach.», *Journal of vascular and interventional neurology*, 8(5), pp. 1-8.
- Sheridan, B. S. *et al.* (2013) « $\gamma\delta$  T cells exhibit multifunctional and protective memory in intestinal tissues», *Immunity*, 39(1), pp. 184-195. doi: 10.1016/j.immuni.2013.06.015.
- Sheridan, B. S. y Lefrançois, L. (2012) «Isolation of mouse lymphocytes from small intestine tissues», *Current Protocols in Immunology*, 3(SUPPL.99), pp. 1-11. doi: 10.1002/0471142735.im0319s99.
- Shichita, T. *et al.* (2009) «Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing  $\gamma\delta$ T cells in the delayed phase of ischemic brain injury», *Nature Medicine*, 15(8), pp. 946-950. doi: 10.1038/nm.1999.
- Shim, R. y Wong, C. H. Y. (2018) «Complex interplay of multiple biological systems that contribute to post-stroke infections», *Brain, Behavior, and Immunity*, 70, pp. 10-20. doi: 10.1016/j.bbi.2018.03.019.
- De Simoni, M. G. *et al.* (2003) «Neuroprotection by complement (C1) inhibitor in mouse transient brain ischemia», *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(2), pp. 232-239. doi: 10.1097/01.WCB.0000046146.31247.A1.

Singh, V. *et al.* (2016) «Microbiota dysbiosis controls the neuroinflammatory response after stroke», *Journal of Neuroscience*, 36(28), pp. 7428-7440. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1114-16.2016.

Singh, V. *et al.* (2018) «The gut microbiome primes a cerebroprotective immune response after stroke», *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 38(8), pp. 1293-1298. doi: 10.1177/0271678X18780130.

Siracusa, F. *et al.* (2019) «Dietary habits and intestinal immunity: from food intake to CD4+ TH Cells», *Frontiers in Immunology*, 9(93177), pp. 1-10. doi: 10.3389/fimmu.2018.03177.

Smith, H. K. *et al.* (2015) «Critical differences between two classical surgical approaches for middle cerebral artery occlusion-induced stroke in mice», *Journal of Neuroscience Methods*, 249, pp. 99-105. doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.04.008.

Sommer, C. J. (2017) «Ischemic stroke: experimental models and reality», *Acta neuropathologica*, 133(2), pp. 245-261. doi: 10.1007/s00401-017-1667-0.

Spychala, M. S. *et al.* (2018) «Age-related changes in the gut microbiota influence systemic inflammation and stroke outcome», *Annals of Neurology*, 84(1), pp. 23-36. doi: 10.1002/ana.25250.

Stanley, D. *et al.* (2016) «Translocation and dissemination of commensal bacteria in post-stroke infection», *Nature Medicine*, 22(11), pp. 1277-1284. doi: 10.1038/nm.4194.

Suzuki, T. (2013) «Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions», *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(4), pp. 631-659. doi: 10.1007/s00018-012-1070-x.

Sykora, M. *et al.* (2015) «Beta-blockers, pneumonia, and outcome after ischemic stroke: evidence from virtual international stroke trials archive», *Stroke*, 46(5), pp. 1269-1274. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.008260.

## **T**

Tagliabue, A. y Rappuoli, R. (2018) «Changing priorities in vaccinology: antibiotic resistance moving to the top», *Frontiers in Immunology*, 9(1068), pp. 1-9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01068.

Tait Wojno, E. D. y Beamer, C. A. (2018) «Isolation and identification of innate lymphoid cells (ILCs) for immunotoxicity testing», en *Methods in Molecular Biology*, 1803, pp. 353-370. doi: 10.1007/978-1-4939-8549-4\_21.

Tenny, K. M. y Keenaghan, M. (2020) *Ohm's Law, StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28722905> (Accedido: 12 de noviembre de 2019).

Thomson, A. *et al.* (2019) «The Ussing chamber system for measuring intestinal permeability in health

and disease», *BMC Gastroenterology*, 19(1), p. 98. doi: 10.1186/s12876-019-1002-4.

Thursby, E. y Juge, N. (2017) «Introduction to the human gut microbiota», *Biochemical Journal*, 474(11), pp. 1823-1836. doi: 10.1042/BCJ20160510.

Tiwari, S. *et al.* (2017) «Two-component signal transduction systems of pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy: an overview», *Frontiers in Microbiology*, 8(1878), pp. 1-7. doi: 10.3389/fmicb.2017.01878.

Torregrosa, G. *et al.* (2007) «Fisiopatología básica: de la oclusión arterial a la muerte neuronal», en Montaner, J. (ed.) *Fisiopatología de la isquemia cerebral*. Barcelona: ICG Marge. SL., pp. 13-31.

Truelsen, T., Begg, S. y Mathers, C. (2000) *The global burden of cerebrovascular disease, Global Burden of Disease*. Disponible en: [https://www.who.int/healthinfo/statistics/bod\\_cerebrovasculardiseasestroke.pdf](https://www.who.int/healthinfo/statistics/bod_cerebrovasculardiseasestroke.pdf) (Accedido: 20 de septiembre de 2019).

### **U**

Urrea, X. *et al.* (2009) «Harms and benefits of lymphocyte subpopulations in patients with acute stroke», *Neuroscience*, 158(3), pp. 1174-1183. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.014.

Urrea, X. *et al.* (2017) «Neuroanatomical correlates of stroke-associated infection and stroke-induced immunodepression», *Brain, Behavior, and Immunity*, 60, pp. 142-150. doi: 10.1016/j.bbi.2016.10.004.

### **V**

Vega, T. *et al.* (2009) «Stroke in Spain: epidemiologic incidence and patterns; a health sentinel network study», *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 18(1), pp. 11-16. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2008.06.010.

Vermeij, J.-D. *et al.* (2018) «Post-stroke infections and preventive antibiotics in stroke: update of clinical evidence», *International Journal of Stroke*, 13(9), pp. 913-920. doi: 10.1177/1747493018798557.

Vogelgesang, A., Becker, K. J. y Dressel, A. (2014) «Immunological consequences of ischemic stroke», *Acta Neurologica Scandinavica*, 129(1), pp. 1-12. doi: 10.1111/ane.12165.

### **W**

Wartenberg, K. E. *et al.* (2011) «Infection after acute ischemic stroke: risk factors, biomarkers, and outcome», *Stroke Research and Treatment*, 2011(1), pp. 1-8. doi: 10.4061/2011/830614.

Weigel, W. A. y Demuth, D. R. (2016) «QseBC, a two-component bacterial adrenergic receptor and global regulator of virulence in Enterobacteriaceae and Pasteurellaceae», *Molecular Oral Microbiology*, 31(5), pp. 379-397. doi: 10.1111/omi.12138.

Westendorp, W. F. *et al.* (2011) «Post-stroke infection: a systematic review and meta-analysis», *BMC Neurology*, 11(1), p. 110. doi: 10.1186/1471-2377-11-110.

Westendorp, W. F. *et al.* (2015) «The Preventive Antibiotics in Stroke Study (PASS): A pragmatic randomised open-label masked endpoint clinical trial», *The Lancet*, 385(9977), pp. 1519-1526. doi: 10.1016/S0140-6736(14)62456-9.

Westendorp, W. F. *et al.* (2016) «Pre-stroke use of beta-blockers does not lower post-stroke infection rate: an exploratory analysis of the preventive antibiotics in stroke study», *Cerebrovascular Diseases*, 42(5-6), pp. 506-511. doi: 10.1159/000450926.

Westerhout, J., Wortelboer, H. y Verhoeckx, Kitty (2015) «Ussing Chamber», en Verhoeckx, K, Cotter, P., y López-Expósito, I. (eds.) *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. Springer, pp. 293-304. doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4>.

Winek, K. *et al.* (2016) «Depletion of cultivatable gut microbiota by broad-spectrum antibiotic pretreatment worsens outcome after murine stroke», *Stroke*, 47(5), pp. 1354-1363. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.011800.

Wong, C. H. Y. *et al.* (2011) «Functional innervation of hepatic iNKT cells is immunosuppressive following stroke», *Science*, 334(6052), pp. 101-105. doi: 10.1126/science.1210301.

Woting, A. y Blaut, M. (2018) «Small intestinal permeability and gut-transit time determined with low and high molecular weight fluorescein isothiocyanate-dextran in C3H mice», *Nutrients*, 10(6), pp. 4-10. doi: 10.3390/nu10060685.

## **Y**

Yeung, M. M. W. (2000) «Characterisation of mucosal lymphoid aggregates in ulcerative colitis: immune cell phenotype and TcR-gamma delta expression», *Gut*, 47(2), pp. 215-227. doi: 10.1136/gut.47.2.215.

## **Z**

Zeng, X. *et al.* (2019) «Higher risk of stroke is correlated with increased opportunistic pathogen load and reduced levels of butyrate-producing bacteria in the gut», *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(4), pp. 1-12. doi: 10.3389/fcimb.2019.00004.



---

**ANEXOS I (REACTIVOS) y II (ANTICUERPOS)**

---



Metodología	Reactivo	Casa comercial; referencia del producto
<u>Citometría de flujo</u>	RPMI 1640	Gibco; Ref.: 32404-014
	FBS	Gibco; Ref.: 10500064
	Estreptomycina/Penicilina	Gibco; Ref.: 15140122
	Gentamicina	Gibco; Ref.: 15750060
	HBSS sin Ca <sup>2+</sup> ni Mg <sup>2+</sup> , 10X	Gibco; Ref.: 14185052
	Hepes	Sigma; H3375
	Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma; Ref.: S6014-500G
	DTT	Sigma; Ref.: D9779-5G
	HBSS sin Ca <sup>2+</sup> ni Mg <sup>2+</sup> , 1X	Gibco; Ref.: 14175053
	percoll©	Ge Healthcare; Ref.: 17-0891-01
	PBS 1x	Gibco; Ref.: 10010023
	EDTA	Sigma; E1644
	Azida (NaN <sub>3</sub> )	Sigma; Ref.: 8223350100
	L-glutamina	Sigma; Ref.: G-8540-25G
	Colagenasa IV	Sigma; C5138-500MG
	Cloruro cálcico (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma; 449709-10G
	Cloruro magnésico (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma; M1028-10X1ML
<i>Los reactivos de citometría continúan en la siguiente página</i>		

**ANEXO I: REACTIVOS**

<b>Metodología</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Casa comercial; referencia del producto</b>
<u>Citometría de flujo</u>	Solución de fijación para Treg: <i>FoxP3 Transcription Factor Fixation</i>	eBiosciences; Ref.: 00552100
	Solución de fijación para citocinas: <i>Cytofix Fixation</i>	BD; Ref.: 554722
	Solución de permeabilización para Treg: <i>FoxP3 Transcription Factor Permeabilization</i>	Bioscience; Ref.:0083356
	Solución de permeabilización para citocinas: <i>Cytofix Permeabilization</i>	BD; Ref.: 554723
<u>Permeabilidad intestinal <i>in vivo</i></u>	FITC- Dextrano 4 KDa	Sigma-Aldrich; Ref.: 46944
<u>Cámara de Ussing</u>	Cloruro potásico (KCl)	PanReac; Ref.: 131494.1211
	Fosfato monosódico dihidratado (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	PanReac; Ref.: 122018.1210
	Cloruro de calcio dihidratado (CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	Sharlau; Ref.: CA01931000
	Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O)	Sharlau; Ref.: MA0084
	Cloruro sódico (NaCl)	PanReac; Ref.: 121659.1211
	Bicarbonato de sodio	PanReac; Ref.: 131638.1211
	Glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	Merck; Ref.: 1.08342.1000
	Manitol (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> )	Sigma-aldrich; Ref.: M4125-100G
	FITC- Dextrano 4 KDa	TDB; Ref.: 677 SEK

<b>Metodología</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Casa comercial; referencia del producto</b>
<u>Crecimiento de bacterias en placas</u>	Brain Heart Infusion (BHI)	ThermoFisher; Ref.: CM1135B
	Agar	Sigma-Aldrich; Ref.: A 5306, 250g
<u>Detección de SCFAs</u>	Metanol	Sigma-Aldrich; Ref.: 1.06009
	Ácido fórmico	Sigma-Aldrich; Ref.: 33015-M
	Ácido 2-etilbutírico	Sigma-Aldrich; Ref.: 109959-100ML
<u>Administración de propranolol</u>	propranolol	Sigma-Aldrich; Ref.: P0884-5G
<u>Administración de LED 209</u>	LED 209 (N-fenil-4-benzenosulfamida)	MedChemExpress; Ref.: HY-19748
	Bicarbonato de sodio	Sigma; Ref.: S6014-500G
	polietilenglicol (PEG)	Fluka; Ref.: 81268
	DMSO	Sigma; Ref.: D2650-5x 5ml
	Tween-80	Sigma; Ref.: P1754
<u>Bacterias bioluminiscentes</u>	Ampicilina	Sigma; Ref.: ROAMP
	Metronidazol	Sigma; Ref.: M1547-5G
	Neomicina	Sigma; Ref.: N6386-5G
	Vancomicina	Sigma; Ref.: SBR00001-10ML
<u>Tinción del infarto cerebral</u>	2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC)	Sigma; Ref.: T8877-100G

**ANEXO II: ANTICUERPOS**

<b>Marcaje</b>	<b>Anticuerpo y fluoróforo</b>	<b>Casa comercial; referencia</b>
<u>Anticuerpos utilizados para el marcaje de leucocitos</u>	CD16/CD32 BD FcBlock	BD Pharmingen; Ref.: 553142
	Aqua live/dead cell fixable	Molecular probes; Ref.: L34957
	<i>Beads fluorescentes</i>	Beckman Coulter; Ref.: 7547053
	CD45R-V540	BD Biosciences; Ref.: RA3-6B2
	CD8-BV605	Biolegend; Ref.: 53-6.7
	CD103-BV711	BD Biosciences; Ref.: M290
	CD45-BV780	BD Horizon; Ref.: 30-F11
	CD69 AF488	Biolegend; Ref.: H1.2F3
	NK1.1-PerCP/Cy5	Tonbo-Biosciences; Ref.: PK136
	IL10R-PE	Biolegend; Ref.: 1B1.3a
	$\gamma\delta$ TCR-PE/Cy7	eBiosciences; Ref.: GL3
	CD3 AF647	BD Pharmingen; Ref.: 17A2
	CD4 AF700	Biolegend; Ref.: GK1.5
	CD11b-APC/Cy7	BD Pharmingen; Ref.: M1-70
<u>Anticuerpos utilizados para el marcaje de células Treg</u>	Aqua live/dead cell fixable	Molecular probes; Ref.: L34957
	<i>Beads fluorescentes</i>	Beckman Coulter; Ref.: 7547053
	CD3-V450	Tonbo Biosciences; Ref.: 75-0032-U100
	CD8-BV605	Biolegend; Ref.: 100744
<i>Los anticuerpos para el marcaje de Treg continúan en la siguiente página</i>		

Marcaje	Anticuerpo y fluoróforo	Casa comercial; referencia
<u>Anticuerpos utilizados para el marcaje de células Treg</u>	CD45-BV780	eBioSciences; Ref.: 47-0451-82
	CD4-FITC	ABDserotec; Ref.: MCA4635F
	CD152-PE	Biolegend; Ref.: 106306
	FoxP3-PE/Cy7	eBioSciences; Ref.: 25-5773
	CD25-APC	Biolegend; Ref.: 102012
<u>Anticuerpos utilizados para la detección de citocinas intracelulares</u>	Aqua live/dead cell fixable	Molecular probes; Ref.: L34957
	<i>Beads fluorescentes</i>	Beckman Coulter; Ref.: 7547053
	CD3-V450	Tonbo Biosciences; Ref.: 75-0032-U100
	CD8-BV605	Biolegend; Ref.: 100744
	CD45-BV780	eBioSciences; Ref.: 47-0451-82
	IL4-AF488	eBioSciences; Ref.: 53-7041-82
	IFN $\gamma$ -PerCP/Cy5.5	eBioSciences; Ref.: 45-7311-82 (100 $\mu$ g)
	IL17F-PE/Cy7	eBioSciences; Ref.: 12-7471-82 (100 $\mu$ g)
	IL17A-APC	eBioSciences; Ref.: 17-7177-81 (50 $\mu$ g)
	CD4-AF700	Biolegend; Ref.: 100430
	CD11b-APC/Cy7	BD pharmingen; Ref.: 557657

