

TRAYECTORIA Y APORTACIONES CIENTÍFICAS MÁS RELEVANTES DEL IP.

Desde el inicio de mi carrera científica (2005) he trabajado en la interfase entre las **Neurociencias** y la **Inmunología**, con especial atención al infarto cerebral. El infarto cerebral, isquemia cerebral o ictus se produce cuando se interrumpe repentinamente la circulación sanguínea en un área del cerebro. Esto desencadena una serie de mecanismos fisiopatológicos que desembocan en la activación de la respuesta inflamatoria. Esta respuesta puede contribuir a incrementar el daño cerebral que se produce como consecuencia de la isquemia. Entender cómo el sistema inmune (y la respuesta inflamatoria) participan en la fisiopatología de la isquemia cerebral ha sido el tema principal de mi carrera como investigador. A continuación, expongo mis 10 contribuciones más destacadas, agrupadas por temática y en orden cronológico.

La expresión de receptores de inmunidad innata y el infarto cerebral.

El infarto cerebral induce la muerte de múltiples tipos celulares afectados por la isquemia. Una parte de dichas células se mueren por necrosis, lo que desencadena la activación de la respuesta inflamatoria. Parte de esta activación podría estar desencadenada por la activación de receptores de inmunidad innata, dentro de los cuales se encuentran los receptores "Toll-like" (TLR de sus siglas en inglés Toll-like Receptor). En estudios en modelos animales se había demostrado que los animales "Knock-out" para uno de los receptores Toll-like, el TLR4 tenían lesiones más pequeñas cuando eran sometidos a modelos de infarto cerebral (Circulation 2007: 115: 1599-1608). Sin embargo, se desconocía si estos mismos receptores podrían estar implicados en la fisiopatología de la isquemia cerebral en humanos. El primer artículo seleccionado es el trabajo que dio lugar a mi tesis doctoral:

1. [Brea D, Blanco M, Ramos-Cabrer P, Moldes O, Arias S, Perez-Mato M, Leira R, Sobrino T, Castillo J. Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values. J Cereb Blood Flow Metab. 2011;31\(6\):1424-31. IF: 6.2.](#)

En este trabajo demostramos que la expresión del receptor TLR4 en monocitos de pacientes con infarto cerebral se correlaciona, no sólo con la expresión de diferentes marcadores de inflamación, sino también con el pronóstico de los pacientes. Además, desarrollamos un modelo *in vitro*, que nos permitió demostrar que el suero de pacientes con ictus presentaba ligandos endógenos de los receptores TLR2 y TLR4 (que activan a dichos receptores). El bloqueo de dichos ligandos (fibronectina celular y HSP60) y/o de sus receptores (TLR2/TLR4) conseguía reducir la respuesta inflamatoria *in vitro*. Por tanto, este estudio corroboraba, en pacientes, que los receptores TLR y/o sus ligandos podrían ser dianas terapéuticas para reducir la respuesta inflamatoria tras el infarto cerebral. A pesar de no haber sido publicado en una revista de gran impacto, este artículo fue de vital importancia en mi carrera científica ya que constituye el inicio de mi interés por la Neuroinmunología. Mi participación en este trabajo fue fundamental para el diseño del mismo, la puesta en marcha de la colaboración que nos permitió disponer de las muestras humanas y de los datos clínicos correspondientes, el análisis de los marcadores inmunes y el desarrollo del modelo *in vitro*, así como la redacción del manuscrito.

El sistema inmune en la fisiopatología del infarto cerebral: la neuroprotección mediante células T reguladoras.

El interés de la asociación entre marcadores inflamatorios y el pronóstico de los pacientes con ictus iba más allá de un simple estudio de correlación. Mi objetivo era poder manipular el sistema inmune para proteger el cerebro del infarto cerebral. Por ello inicié un proyecto, como investigador postdoctoral, utilizando uno de los mecanismos endógenos de inmunosupresión, las células T reguladoras. Este trabajo, fruto de mi primera etapa postdoctoral, es el siguiente:

2. [Brea D, Agulla J, Rodriguez-Yanez M, Barral D, Ramos-Cabrer P, Campos F, Almeida A, Davalos A, Castillo J. Regulatory T cells modulate inflammation and reduce infarct volume in experimental brain ischaemia. J Cell Mol Med. 2014;18\(8\):1571-9. IF: 5.31.](#)

Las células T reguladoras son una subpoblación de los linfocitos T, que juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune. En este trabajo demostramos que la transferencia de células T reguladoras expandidas *ex vivo*, así como la estimulación *in vivo*, de dichas células con un anticuerpo superagonista del receptor CD28, reducía la respuesta inflamatoria después del infarto cerebral, así como el volumen del infarto. El impacto de nuestro estudio era que nuestra estrategia podría permitir abrir una nueva vía terapéutica a través de la terapia celular con células T reguladoras o de la estimulación de dichas células (por ej con superagonistas como el anti-CD28). Mi labor en este trabajo, como investigador postdoctoral fue el diseño del estudio, la puesta en marcha de todo el trabajo experimental, interpretación de los resultados y la redacción del manuscrito.

El sistema inmune innato en la prevención del daño por infarto: Receptores de inmunidad innata y monocitos.

Durante mi doctorado conseguí demostrar que determinados marcadores de inmunidad innata se correlacionaban con el pronóstico de los pacientes con ictus. Entre estos marcadores se encuentran los Toll-like Receptors o TLRs. En un proyecto en colaboración con la Dra. Lidia García, estudiamos diferentes formas de modular estos receptores, y demostramos como el uso de un agonista del receptor TLR4, el lipopolisacárido (LPS), podía ser utilizado para proteger el cerebro del infarto cerebral. Esta colaboración dio lugar a dos publicaciones relevantes que presento a continuación.

3. [García-Bonilla L, Brea D, Benakis C, Lane DA, Murphy M, Moore J, Racchumi G, Jiang X, Iadecola C, Anrather J. Endogenous Protection from Ischemic Brain Injury by Preconditioned Monocytes. J Neurosci. 2018;38\(30\):6722-36. IF: 6.709.](#)

La Dra. García había encontrado que la preexposición de los ratones a una baja dosis de LPS antes de inducir la isquemia cerebral resultaba neuroprotectora en los modelos de ictus. Este fenómeno se denominó preconditionamiento con LPS. En este proyecto mi labor fue descifrar el mecanismo de protección del preconditionamiento con LPS. Demostramos que la administración de LPS inducía la polarización de un subtipo específico de monocitos en el bazo. Estos monocitos son antiinflamatorios y cuando los animales son sometidos a la isquemia cerebral participan reduciendo la respuesta inflamatoria. Además, pudimos también demostrar que la administración de monocitos pre-activados *in vitro* a ratones sometidos a isquemia cerebral resultaba también neuroprotectora, incluso cuando los monocitos eran administrados hasta 6h después de la isquemia. Al igual que en el anterior artículo (número 2) el impacto de éste es que podría abrir la posibilidad de translación a la clínica basándose en la administración de monocitos pre-activados a pacientes con infarto cerebral.

4. [García-Bonilla L, Faraco G, Moore J, Murphy M, Racchumi G, Srinivasan J, Brea D, Iadecola C, Anrather J. Spatio-temporal profile, phenotypic diversity, and fate of recruited monocytes into the post-ischemic brain. J Neuroinflammation. 2016;13\(1\):285. IF: 8.322.](#)

Como se mencionó anteriormente, tras el infarto cerebral se produce la infiltración de células inmunes. Entre ellas, en torno a día 3 tras la isquemia se produce la infiltración de monocitos. En este trabajo, demostramos que la infiltración se inicia a partir de monocitos pro-inflamatorios, caracterizados por una serie de marcadores específicos (CCR2+Ly6C^{high}) y por su función promotora de la inflamación. Estos mismos monocitos, una vez infiltrados, inician un cambio progresivo en su fenotipo, transformándose en monocitos anti-inflamatorios (CX3CR1+Ly6C^{lo}), que tienen una función importante en la resolución de la respuesta inflamatoria y, probablemente, en el inicio de la respuesta de reparación tisular. Este trabajo constituye un hito importante en el campo porque rompió con el paradigma establecido hasta el momento que consideraba que la infiltración de monocitos se producía en dos oleadas diferentes. Inicialmente, una oleada de monocitos pro-inflamatorios y, finalmente, una oleada de monocitos anti-inflamatorios. Mi labor en este trabajo fue importante en el análisis de las diferentes poblaciones de monocitos y su transdiferenciación mediante estudios de citometría de flujo.

El sistema inmune en la fisiopatología del infarto cerebral: el eje intestino-cerebro.

En el año 2013, cuando inicié mi segunda etapa postdoctoral se sabía que las células inmunes periféricas podían contribuir a la fisiopatología del infarto cerebral. En esos momentos se habían iniciado estudios importantes en que se describía que al menos parte del sistema inmune periférico era entrenado por su contacto con la microbiota intestinal. Por ello, decidimos investigar si podíamos influir en la fisiopatología del infarto cerebral a través de la manipulación de la microbiota intestinal (por intermediación del sistema inmune). Esta línea de trabajo dio lugar a varios artículos, que incluyen colaboraciones internacionales. Los expongo brevemente a continuación:

5. [Benakis C*, Brea D*, Caballero S, Faraco G, Moore J, Murphy M, Sita G, Racchumi G, Ling L, Pamer EG, Iadecola C, Anrather J. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal \$\gamma\delta\$ T cells. Nat Med. 2016;22\(5\):516-23.*Two first authors. IF: 53.44.](#)

En este trabajo conseguimos demostrar que la microbiota intestinal afecta al daño que se desarrolla tras la isquemia cerebral a través de la intermediación del sistema inmune intestinal y la migración de un subtipo específico de linfocitos (las células gamma delta) entre el intestino y el Sistema Nervioso Central. Siendo más específicos, a través de la utilización de antibióticos desarrollamos un modelo de disbiosis intestinal (alteración de la microbiota intestinal). La disbiosis intestinal indujo un incremento en las células T reguladoras del intestino y la reducción de otro subtipo de linfocitos, las células $\gamma\delta$ -T. A continuación, conseguimos demostrar que estas células, en el contexto del infarto cerebral, migran desde el intestino a las meninges y, desde allí, facilitan el reclutamiento de neutrófilos al cerebro infartado, contribuyendo de este modo a incrementar el daño cerebral. Este artículo tuvo un gran impacto en la comunidad científica (cuenta actualmente con 746 citas), siendo la primera vez que se demostraba la implicación de la microbiota intestinal en la isquemia cerebral. Mi labor en este trabajo fue la realización de todos los análisis inmunológicos e *in vitro*. Es por ello que soy co-autor con la Dra. Benakis que realizó los modelos de isquemia cerebral y los análisis de comportamiento.

6. [Benakis C, Poon C, Lane D, Brea D, Sita G, Moore J, Murphy M, Racchumi G, Iadecola C, Anrather J. Distinct Commensal Bacterial Signature in the Gut Is Associated With Acute and Long-Term Protection From Ischemic Stroke. Stroke. 2020;51\(6\):1844-54. IF: 10.17.](#)

En este trabajo conseguimos demostrar que podíamos proteger el cerebro del infarto cerebral a través de la alteración de la microbiota intestinal con diferentes cócteles de antibióticos. Este efecto neuroprotector se correlacionó con una subespecie particular de *Bacteroidetes* y con una ruta metabólica, en particular, la vía de compuestos aromáticos. De este modo mostramos dos posibles vías de intervención para facilitar la protección del cerebro del infarto cerebral.

7. [Sadler R, Singh V, Benakis C, Garzetti D, Brea D, Stecher B, Anrather J, Liesz A. Microbiota differences between commercial breeders impacts the post-stroke immune response. Brain Behav Immun. 2017;66:23-30. IF: 19.23.](#)

Este trabajo surgió como una colaboración internacional con el Dr. Arthur Liesz que había corroborado nuestros resultados de la asociación de la microbiota intestinal y el infarto cerebral (J Neurosci 2016; 36: 7428-7440). Demostramos que los estudios basados en terapias de inmunomodulación para el infarto cerebral deben tener en cuenta que la microbiota intestinal es diferente en función de la procedencia de los ratones analizados, ya que encontramos diferencias significativas en ratones procedentes de diferentes proveedores comerciales que condiciona el tamaño de la lesión producida por el infarto cerebral. El impacto de este trabajo es muy importante para la comunidad científica, identificando una de las variables fundamentales que pueden afectar a la reproducibilidad de los estudios de la microbiota intestinal. Mi labor en este trabajo fue fundamental para el diseño del estudio, la coordinación de los dos grupos de trabajo, así como para la realización de los estudios de análisis de las poblaciones inmunes.

8. Brea D*, Poon C, Benakis C, Lubitz G, Murphy M, Iadecola C, Anrather J*. Stroke affects intestinal immune cell trafficking to the central nervous system. *Brain Behav Immun.* 2021;96:295-302. * Corresponding authors. IF: 19.23.

En este trabajo, continuación del número 5, demostramos que el infarto cerebral estimula la migración de células inmunes desde el intestino al resto del organismo, destacando la movilidad de células dendríticas desde el intestino al sistema nervioso central. Mi aportación a este estudio incluyó desde el diseño, la ejecución de los experimentos, hasta la escritura y publicación de los resultados. Por ello, soy autor de correspondencia junto con mi antiguo supervisor. El impacto fundamental de este trabajo es que se demuestra, por primera vez (junto con el artículo número 5) que la migración de células inmunes entre el intestino y el sistema nervioso central es un hecho, cuestión de vital importancia para múltiples enfermedades neurológicas.

El sistema inmune intestinal en la fisiopatología del deterioro cognitivo.

9. Faraco G, Brea D, Garcia-Bonilla L, Wang G, Racchumi G, Chang H, Buendia I, Santisteban MM, Segarra SG, Koizumi K, Sugiyama Y, Murphy M, Voss H, Anrather J, Iadecola C. Dietary salt promotes neurovascular and cognitive dysfunction through a gut-initiated TH17 response. *Nat Neurosci.* 2018;21(2):240-9. IF: 24.88.

Este trabajo se inició en base a mi experiencia anterior en el estudio del sistema inmune intestinal (Artículos del 5 al 8). El Dr. Faraco había identificado que la dieta rica en sal se asociaba con un incremento en el riesgo cerebrovascular y demencia. Sin embargo, el mecanismo de dicha asociación era completamente desconocido. Utilizando las herramientas desarrolladas en mi proyecto anterior (Nat med 2016), demostramos que la dieta rica en sal induce la expansión de un subtipo de linfocitos en el intestino, los Th17. Como consecuencia, se incrementa la concentración de interleuquina-17 (IL17) plasmática, lo que da lugar a la disfunción del endotelio de los vasos sanguíneos a nivel cerebral y, finalmente al inicio del deterioro cognitivo. Mi labor en este trabajo fue fundamental para descifrar el mecanismo por el que la dieta rica en sal, a través de alteraciones en el sistema inmune, induce deterioro cognitivo en ratones. El impacto de este trabajo fue muy importante porque demostraba, por primera vez que determinados componentes de la dieta podían favorecer el deterioro cognitivo. Este estudio fue el inicio de una línea de investigación que el Dr. Faraco culminó en 2019 (Nature 2019; 574: 686-690).

La importancia de la comunicación entre el sistema nervioso central y el sistema inmune.

10. Brea D*, Veiga-Fernandes H*. Inflammation in the gut is encoded by neurons in the brain. *Nature* 2022. doi: 10.1038/d41586-021-03802-x. * Corresponding authors. IF: 69.5.

En este artículo explicamos los hallazgos de un artículo publicado por Asya Rolls *et al.* en *Cell* 2021; 184: 5902. A mi juicio, uno de los artículos más importantes de la última década en el campo de la Neuroinmunología. En él se explica como la activación del sistema inmune a nivel del intestino desencadena la activación de un área muy concreta del cerebro, el córtex insular y como esta activación deja una impronta en determinadas neuronas. Posteriormente, cuando esta área del cerebro es activada se reproduce una respuesta inflamatoria en el intestino, similar a la que originó el “recuerdo” generado, sin necesidad de ningún estímulo inflamatorio. Considero que este artículo es un hito en mi carrera ya que, como reconocimiento a mi labor en el campo de la Neuroinmunología fui invitado a escribir este News & Views para la revista *Nature*. Mi contribución a este artículo fue la escritura del mismo al 100%, contando con algún comentario crítico por parte del segundo autor: Henrique Veiga-Fernandes y el servicio editorial de la revista.