



UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

REGULACIÓN DE LA VÍA INFLAMATORIA
NUCLEAR-MITOCONDRIAL POR LA
MELATONINA

JOSÉ ANTONIO GARCÍA SANTOS

TESIS DOCTORAL

Granada

2015

Editorial: Universidad de Granada. Teiss Doctorales
Autor: José Antonio García Santos
ISBN: 978-84-9125-216-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/40690>

**REGULACIÓN DE LA VÍA INFLAMATORIA NUCLEAR-
MITOCONDRIAL POR LA MELATONINA**

Memoria que presenta el licenciado en Biología

D. José Antonio García Santos

como aspirante al grado de Doctor

Fdo: **José Antonio García Santos**

Vº Bº de los Directores de la Tesis Doctoral

Fdo: Dr. Darío Acuña Castroviejo

Doctor en Medicina

Catedrático de Fisiología de la UGR

Fdo: Dra. Germaine Escames

Doctora en Farmacia

Profesora Titular de Fisiología de la
UGR

D. DARÍO ACUÑA CASTROVIEJO, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE D^o. **José Antonio García Santos**, Licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección, el trabajo titulado **“Regulación de la vía inflamatoria nuclear-mitocondrial por la melatonina”** reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 26 de Mayo de 2012

V^o B^o Director

El interesado

Darío Acuña Castroviejo

José Antonio García Santos

Dña. GERMAINE ESCAMES, Profesora Titular de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE D^o. **José Antonio García Santos**, Licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección, el trabajo titulado **“Regulación de la vía inflamatoria nuclear-mitocondrial por la melatonina”** reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 26 de Mayo de 2012

V^o B^o Director

El interesado

Germaine Escames

José Antonio García Santos

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología (Grupo de investigación “Comunicación Intercelular”, CTS-101) del Centro de Investigación Biomédica (CIBM) de la Universidad de Granada.

Durante la realización del siguiente trabajo, el Ldo. José Antonio García Santos fue financiado por las siguientes fuentes:

- Beca Estancia Doctorado Europeo, otorgada por RETICEF-Instituto Carlos III, 2013
- Beca Asistencia Congreso FEPS-SECF, otorgada por la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, 2012.
- Beca participación en el XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, otorgada por la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, 2009.
- Beca Estancia Investigadora RETICEF, otorgada por RETICEF-Instituto de Salud Carlos III, 2007.
- Contrato de Investigación “Mecanismos moleculares de la inhibición de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible la sepsis por la melatonina: interacción con RORalpha y NF-kappaB”, beca/contrato con cargo a la red 06/0013/0008 “Envejecimiento y Fragilidad”, comprendido entre marzo del 2007 y mayo del 2013.

Proyectos de investigación que han financiado este estudio:

1. Título del Proyecto: Regulación de la vía inflamatoria nuclear-mitocondrial por la melatonina y su modificación durante el envejecimiento: Evaluación experimental y clínica.

Entidad Financiadora: ISCIII

Entidades Participantes: Universidad de Granada

Referencia del Proyecto: PI08-1664 **Cantidad:** 226.028,00

Duración, Desde: 1-1-2009 **Hasta:** 31-12-2011

Investigador Principal: Acuña-Castroviejo D

Número de Investigadores Participantes: 6

2. Título del Proyecto: Uso del pez cebra como modelo experimental de PD: Evaluación de la disfunción mitocondrial y búsqueda de compuestos neuroprotectores a partir de extractos de productos naturales de origen microbiano

Entidad Financiadora: Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía (Proyecto de excelencia)

Entidades Participantes: Universidad de Granada

Referencia del Proyecto: P10-CTS-5784 **Cantidad:** 253.747,00

Duración, Desde: 1-1-2011 **Hasta:** 31-12-2014

Investigador Principal: Acuña-Castroviejo D

Número de Investigadores Participantes: 8

3. Título del Proyecto: Red temática de investigación cooperativa en envejecimiento y fragilidad (RETICEF)

Entidad Financiadora: ISCIII

Entidades Participantes:

Referencia del Proyecto: RD12/0043/0005 **Cantidad:** 44.659,22

Duración, Desde: 1-1-2013 **Hasta:** 31-12-2016

Investigador Principal: Acuña-Castroviejo D

Número de Investigadores Participantes: 45

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en revistas internacionales o están en preparación:

García JA, Volt H, Venegas C, Doerrier C, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. Disruption of the NF- κ B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor- α and blocks the septic response in mice. *FASEB*, 2015 (en prensa)

Otras publicaciones relacionadas con esta Tesis Doctoral

Madrid-Navarro CJ, Sánchez-Gálvez R, Martínez-Nicolas A, Ros Marina, García JA, Madrid JA, Rol MA. Disruption of circadian rhythms and delirium, sleep impairment and sepsis in critically ill patients. Potential therapeutic implications for increased light-dark contrast and melatonin therapy in an ICU environment (en prensa)

Doerrier C, García JA, Volt H, Díaz-Casado M, Lima-Cabello E, Ortiz F, Luna-Sánchez M, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. Identification of mitochondrial deficits and melatonin targets in liver of septic mice by high-resolution respirometry. *Life Sciences*, 2015; 158-165.

Ortiz F, Acuña-Castroviejo D, Doerrier C, Dayoub JC, López LC, Venegas C, García JA, López A, Volt H, Luna-Sánchez M, Escames G. Melatonin blunts the mitochondrial/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis. *J. Pineal Res.*, 2015; 58:34-49

Ortiz F, García JA, Acuña-Castroviejo D, Doerrier C, López A, Venegas C, Volt H, Luna-Sánchez M, López LC, Escames G. The beneficial effects of melatonin against heart mitochondrial impairment during sepsis: inhibition of iNOS and preservation of nNOS. *J. Pineal Res.*, 2014; 56(1): 71-81

Venegas C, García JA, Doerrier C, Volt H, Escames G, López LC, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Analysis of the daily changes of melatonin receptors in the rat liver. *J. Pineal Res.*, 2013; 54:313-321

Escames G, López LC, García JA, García-Corzo L, Ortiz F, Acuña-Castroviejo D. Mitochondrial DNA and Inflammatory diseases. *Hum. Genet.*, 2012; 131(2):161-73.

Venegas C, García JA, Escames G, Ortiz F, López A, Doerrier C, García-Corzo L, Acuña-Castroviejo D. Extrapineal melatonina: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J. Pineal Res.*, 2012; 52:217-227

Acuña-Castroviejo D, López LC, Escames G, López A, García JA, Reiter RJ. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem.*, 2011; 11:221-240.

Aportaciones a congresos relacionados con la presente tesis doctoral:

Comunicación oral

XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). Melatonin disrupts the NF- κ B/NLRP3 connection in sepsis through ROR α receptor. 2014. Granada (España). García JA, Volt H, Doerrier C, Guerrero-Martinez JA, López LC, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

FASEB Summer research Conferences. Melatonin receptors: Actions and Therapeutics. Decoding the anti-inflammatory action of melatonin: Sirt1/NF- κ B involvement. 2011. Snowmass, Colorado (USA). Acuña-Castroviejo D, García JA, Escames G.

Póster

Joint FEPS and Spanish Physiological Society Scientific Congress 2012. Melatonin modulation of the NF- κ B signaling pathway in sepsis. 2012. Santiago de Compostela (España). García JA, Volt H, Venegas C, Doerrier C, López LC, Luna-Sánchez M, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

AGRADECIMIENTOS

Tras unos años de esfuerzo llega a su fin la etapa de mi tesis doctoral; durante todo este tiempo ha habido buenos y no tan buenos momentos, logros y fracasos, alegrías y tristezas, pero todo ha llegado finalmente a su meta final gracias al apoyo de muchísimas personas que han marcado tanto mi camino personal como profesional. A todas ellas, agradecerles de forma conjunta por haber formado (y formar) parte de mi vida.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de Tesis Darío Acuña Castroviejo y Germaine Escames por haber confiado en mí desde el primer momento y haberme permitido formar parte de su grupo de investigación, por su contribución a este trabajo y por mostrarme día a día lo necesario que es la disciplina, perseverancia y el esfuerzo en el mundo de la investigación.

A Luis Carlos López, cuya llegada coincidió con mi despegue científico, gracias por estar siempre dispuesto a escuchar y ayudar.

A todos los miembros de mi Tribunal de tesis, por aceptar formar parte de esta gran familia.

A todos mis compañeros de laboratorio, que día tras día se han esforzado para dejar de ser sólo compañeros y convertirse en amigos. Entre ellos, no podría olvidarme del Sr. Volt, por su ayuda en los momentos clave de esta Tesis doctoral, por sus charlas, sus consejos musicales, sus noches encerrados en el animalario y, cómo no, sus viajes en el coche apatruellando la ciudad. A Carmen y Caro, miembros exiliados de la vieja guardia, gracias por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, por aguantar mis malos días, por preocuparos por mí y por mostraros tal y como sois, grandes personas, amigas, compañeras y científicas. A Elena y Marta, miembros aun presentes de la vieja guardia, por ser la sonrisa de este laboratorio y un punto de cordura con trazos de locura; Elena, gracias por evitarme tantos paseos hacia mi casa y por poner siempre buena cara a pesar de las cosas que te digo (ya sabes que todo es con cariño). A las nuevas adquisiciones: Eliana, Agustín, Jose, Ibtí, Rammy, Ana, Bea, Sergio, Ying, Manu...sangre nueva con ganas de conocer, preguntar, experimentar...sin olvidarse de salir de vez en cuando.

De igual modo debo agradecer a mis tres “madres” de laboratorio: Araceli, Ana Fernández e Iryna, gracias por todo lo que me habéis enseñado, por confiar en mí, por vuestra ayuda en todos los niveles, por vuestra preocupación cuando era necesario y vuestro abrazo sincero en los peores momentos.

A los Of What!? Javi, David, Álvaro...que decir de vosotros y de mi que no sepamos ya a estas alturas de la vida. Muchas gracias por permitir la evolución en mi persona, son tantos años que resulta difícil escribir unas palabras sin que los sentimientos afloren, sin que los recuerdos cobren vida, sin que las risas dejen sordos mis oídos, sin que las preocupaciones sean más llevaderas a vuestro lado. De todo corazón, hay muy poca gente como vosotros.

A mis niñas Eu y Mari, ya sabéis que no siempre digo lo que pienso y que os quiero un montón.

Al resto del grupo: Juanjo, Víctor, Manolo, Lluic (o Jorge, da igual), Ramón, Charly, Inma, Vero, Eva, la pequeña Blanca.... gracias por todos los buenos momentos que vivimos y por los que nos quedan...y por soportarme!!!

A la peña de fútbol sala Área 51...tantos Martes juntos...y aún no sabemos jugar al fútbol; eso sí, las barbacoas con piscina sí que es lo nuestro

Al grupo de Aikido del Dojo Bodhidharma: Ángel, Gálvez, Antonio, Rosa, Dani, Rafa, Jesús, Alex, Tere, Jorge, Gabri, Carlos, Alberto, Fran, Antonio,... todos sois excepcionales, como aikidocas, como personas, como amigos....un gran legado.

A los Nocturnos (Hijos de la Noche), gracias por esos partidos los Jueves, por el refrigerio de después y por el gran recibimiento que me habéis dado.

Y no, no me olvidado. Mi mayor agradecimiento va dirigido a mi familia, gracias a los cuales soy como soy y he conseguido todo lo que tengo. Debo considerarme una persona afortunada y muy orgullosa de tener la familia que tengo, con buenas personas, repletas de principios y de algún que otro defectillo que os hacen personas únicas en el maravilloso mundo que he creado a vuestro alrededor. A mi madre, corazón infinito, trabajadora

incansable, sincera, dispuesta a sacrificarse siempre por los demás, por mí; a mi padre, la persona más trabajadora del mundo, constante en sus labores, un luchador nato. A mi hermanita, que decir de ti, la mejor hermana que nadie puede tener, la mejor amiga, consejera, muchas gracias por enseñarme tanto y por estar ahí cuando lo necesite. A mi abuela, mi segunda madre, todo corazón que ilumina una sonrisa cuando le digo algo, por ser ejemplo de lo que hay que ser como persona. Vosotros me habéis inculcado los mejores valores, me habéis hecho pasar los mejores momentos, superar con éxito los peores y ofrecerme más de lo que cualquiera podría desear. Porque sin vosotros yo no habría conseguido nada.

A todos ellos y a todos lo que habéis formado parte de mi vida, de todo corazón,

GRACIAS

ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

AANAT: arialquilamina N-acetiltransferasa

AF: secuencia de función de activación

AFMK: N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinuramina

AMK: N1-acetil-5-metoxikinuramina

aMT: melatonina

AP-1: proteína activadora 1

ASC: proteína que contiene un dominio tipo CARD

ASMT: N-acetilserotonina O-metiltransferasa

Bcl-3: proteína 3 del linfoma de células B

BIR: repeticiones de proteínas inhibidoras de apoptosis de Baculovirus

Bmal: receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos

CaM: calmodulina

CAPS: síndromes periódicos asociados a la criopirina

CARD: dominio de reclutamiento y activación de caspasas

CBP/p300: proteína de unión a CREB/p300

CD14: grupo de diferenciación 14

CIITA: transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad clase II

Clock: gen circadiano locomotor de salida de ciclos kaput

CLP: punción y ligadura cecal

CLRs: receptores tipo lectina C

COX-2: ciclooxigenasa de tipo 2

CRE: elemento de respuesta a AMP cíclico

CREB: proteína de unión al elemento de respuesta de AMP cíclico

Cry: criptocromo

DAMPs: patrones moleculares asociados a daño

DBD: dominio de unión al DNA

DD: dominio de muerte

G6PD: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GPx: glutatión peroxidasa

GRd: glutatión reductasa

GRR: repeticiones ricas en glicina

GSH: glutatión

GSSG: glutatión oxidado

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HDAC3: histona deacetilasa de tipo 3

IFN: interferón

IκB: inhibidor kappaB

IKK: quinasa del inhibidor kappaB

IL: interleuquina

i-mtNOS: iNOS mitocondrial

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

IRAK: quinasas asociadas al receptor de la IL-1

IRF: factor regulador del interferón

IRF3: factor regulador de interferón 3

JAKs: quinasas de Janus

Kd: constante de disociación

KDa: kilodaltons

LBD: dominio de unión a ligando

LBP: proteína de unión al LPS

LOO ··: radical peróxido

LPS: lipopolisacárido

LRR: repeticiones ricas en leucina

Lys: lisina

MAO: monoamino oxidasa

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos

MD-2: proteína de diferenciación mieloide-2

MPT: poro de transición mitocondrial

mtDNA: DNA mitocondrial

MyD88: factor de diferenciación mieloide 88

NACHT: dominio de unión a nucleótidos

NAMPT: nicotinamida fosforibosil transferasa

NAS: N-acetil-serotonina

NES: secuencias de exporte nuclear

NF-κB: factor de transcripción nuclear kappaB

NLRP3: proteína 3 de la familia NLR

NLRs: receptores tipo NOD

NLS: secuencia de localización nuclear

NMN: nicotinamida mononucleótido

NMNAT: nicotinamida mononucleótido adenilil transferasa

NO•: óxido nítrico

NOD: dominio de oligomerización de unión a nucleótidos

O₂^{•-}: anión superóxido

OH : grupo hidroxilo

ONOO-: peroxinitritos

P2X7: receptor purinérgico

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

Per: período

PEST: secuencia peptídica rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

PYD: dominio pirin

Rev-ErbA α : subfamilia 1 de receptor nuclear, grupo D, miembro 1

RHD: dominio homólogo a Rel

RIG-I: ácido retinoico inducible del gen 1

RIP2: proteína 2 de interacción con el receptor

RLRs: receptores tipo RIG-I

RNS: especies reactivas de nitrógeno

ROR α : receptor huérfano relacionado con RAR tipo alfa

RORE: elemento de respuesta de ROR

ROS: especies reactivas de oxígeno

SER: elemento de respuesta a suero

Ser: serina

Sirt1: sirtuína 1

SOD: superóxido dismutasa

STAT1: traductor de señal y activador de transcripción

TAB1: proteína 1 de unión a TAK1

TAK1: proteína quinasa activada por factor de crecimiento transformante B

TAK2: proteína 2 de unión a TAK2

TIR: dominio homólogo al del receptor de IL-1

TIRAP/Mal: proteína adaptadora con dominio TIR/ adaptador semejante a MyD88

TLRs: receptores tipo *Toll*

TNF α : factor de necrosis tumoral α

TNFR: receptores del TNF

TPH: L-triptófano hidroxilasa

TRAF6: factor 6 asociado al receptor del
TNF

TRIF/TICAM-1: proteína adaptadora
que contiene el dominio TIR e induce
IFN- β /molécula adaptadora que
contiene dominio TIR

TXNIP: proteína tiorredoxina
interactiva

γ cs: gamma-glutamylcisteina sintasa

“Quien nunca ha cometido un error nunca ha probado algo nuevo”

Albert Einstein

“Lo esencial es invisible a los ojos”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMEN

La sepsis, definida como una respuesta inflamatoria sistémica del huésped frente al proceso infeccioso, y la disfunción cardiaca asociada a ella, representan la principal causa de morbilidad y mortalidad en las unidades de cuidados intensivos de países desarrollados. Ante tal situación, la búsqueda de nuevas terapias anti-inflamatorias nos obliga a conocer qué mecanismos son los responsables de que una respuesta inflamatoria controlada y beneficiosa desde el punto de vista fisiológico se transforme en una condición patológica.

Estudios previos manifiestan la importancia del factor de transcripción NF- κ B en la fisiopatología de la sepsis; en este sentido, el reconocimiento de la señal inflamatoria por sus receptores específicos inicia una cascada de señalización que finaliza en la translocación nuclear y posterior activación transcripcional de NF- κ B. En consecuencia, se induce la expresión de numerosos genes participantes en la sepsis, incluidos citoquinas y enzimas de carácter pro-inflamatorio, inmunoreceptores o moléculas de adhesión. Asimismo, esta condición inflamatoria se asocia con una profunda disfunción mitocondrial y consecuente apoptosis, lo que favorece la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), ATP y DNA mitocondrial (mtDNA) al citosol. Tras su liberación, estas señales asociadas al daño celular serán reconocidas por el inflamasoma NLPR3, un complejo multiprotéico que participa en la activación de la caspasa-1 y, en consecuencia, en la producción de las formas maduras de las citoquinas pro-inflamatorias, incluidas IL-1 β , IL-18 e IL-33. Por tanto, estos estudios ponen de manifiesto la importancia de la mitocondria a la hora de conectar las dos vías principales de la inmunidad innata, desencadenando el proceso inflamatorio severo y duradero característico de la sepsis.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado los efectos beneficiosos de la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) en la sepsis; además de sus conocidas propiedades cronobióticas, la melatonina es un potente agente antioxidante y anti-inflamatorio, efectos que destacan a nivel mitocondrial donde esta indolamina protege la función mitocondrial al aumentar su eficacia bioenergética al tiempo que reduce la producción de ROS. A pesar de conocerse el efecto inhibidor de la melatonina sobre la vía de señalización de NF- κ B, poco se sabe en la actualidad de los mecanismos implicados en este efecto anti-inflamatorio así como el control que pueda ejercer sobre el inflamasoma NLRP3. En este sentido, la interacción entre melatonina y su receptor nuclear ROR α puede ser clave en su papel terapéutico, al observarse que este receptor muestra un papel negativo sobre la vía inflamatoria dependiente de NF- κ B.

De acuerdo con este fondo teórico, nuestro trabajo se centró en establecer la cooperación entre las vías de NF- κ B y NLRP3 durante la sepsis, evaluando asimismo los mecanismos moleculares por los cuales la melatonina ejerce su potente acción anti-inflamatoria en esta patología.

Para ello, los objetivos a cumplir durante este trabajo fueron:

- 1) Evaluar la vía de activación de NF- κ B así como el estado redox celular y función mitocondrial durante la sepsis en ratones wild-type.
- 2) Determinar la activación del inflamasoma NLRP3 durante la sepsis y establecer la vía de cooperación entre ambas vías de la respuesta inmune innata.
- 3) Estudiar la activación de NF- κ B e inflamasoma NLRP3 durante la sepsis en ratones deficientes para el receptor nuclear ROR α .

4) Evaluar el papel protector y mecanismos de acción de la melatonina sobre las dos vías de la inmunidad innata tanto en ratones wild-type como en ratones deficientes para ROR α .

Los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto que la translocación nuclear y activación transcripcional de NF- κ B tiene lugar de forma temporal durante la sepsis, si bien las consecuencias en términos de mayor expresión y niveles de los diferentes marcadores pro-inflamatorios se mantienen altas durante todo el proceso séptico. La activación de NF- κ B tiene lugar de forma paralela a una grave disfunción mitocondrial, la cual induce la activación del inflamasoma NLRP3 con el mismo perfil temporal que el mostrado por NF- κ B. En consecuencia, ambas vías cooperan durante todo el proceso séptico desencadenando una respuesta inflamatoria desproporcionada frente a la infección.

Nuestros resultados muestran, asimismo, que la melatonina inhibe la activación de NF- κ B a nivel nuclear, potenciando su deacetilación en el residuo de Lisina 310 mediada por la deacetilasa sirtuina-1 (Sirt1). Además, la melatonina mejora el estado redox celular y mantiene la homeostasis mitocondrial, propiedades que permite a la indolamina inhibir la activación del inflamasoma NLRP3 y romper, en consecuencia, la cooperación entre las dos vías de señalización. Finalmente, nuestro estudio pone de manifiesto, por primera vez, que la melatonina requiere ROR α no sólo para inducir la actividad deacetilasa de la Sirt1 e inhibir la actividad transcripcional de NF- κ B, sino también para regular la expresión y actividad de los distintos sistemas antioxidantes celulares. No obstante, este receptor nuclear ROR α no participa en la inhibición del inflamasoma NLRP3 tras el tratamiento con melatonina.

En definitiva, nuestros resultados evidencian la importancia de la melatonina como fármaco capaz de bloquear la conexión entre las vías de la inmunidad innata dependientes de NF- κ B y NLRP3, lo que justificaría su uso como estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias donde tal conexión y la disfunción mitocondrial adquieren vital importancia.

SUMMARY

Sepsis, a systemic inflammatory response of the organism against an infection, as well as sepsis-related myocardial impairment is associated with high mortality and morbidity in the intensive care units worldwide. This situation urges to understand how controlled innate immunity process is turning into a harmful condition such as sepsis, as a previous step to anti-inflammatory therapeutic development.

Previous reports shows that transcription factor NF- κ B plays a critical role in the pathogenesis of sepsis; thus, recognition of pro-inflammatory signals for its specific receptors leads to nuclear translocation and transcriptional activity of NF- κ B, inducing the expression of innate mediators such as pro-inflammatory cytokines and enzymes, immunoreceptors or adhesion molecules. Inflammation also courses with mitochondrial dysfunction and apoptosis, favoring reactive oxygen species (ROS), ATP and mitochondrial DNA (mtDNA) release to the cytosol. These mitochondrial-derived signals are recognized by NLRP3 inflammasome, a cytosolic multiprotein complex that activates caspase-1. Once activated, caspase-1 processes pro-inflammatory cytokines including pro-IL-1 β , pro-IL-18 and pro-IL-33 to their mature forms. Together, these data shows a significant connection between two main pathways of the innate immunity during sepsis, leading to a disproportionate inflammatory response to microbial invasion.

Our group has demonstrated the beneficial effects of melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) in sepsis. Besides its chronobiotic properties, melatonin has been identifies as a powerful immunomodulator and free radical scavenger, especially at mitochondria level where melatonin maintains mitochondrial homeostasis boosting its bioenergetic efficacy and reducing mitochondrial ROS production. Although it is generally accepted that melatonin inhibits the NF- κ B pathway, the mechanism(s)

involved in this effect, as well as in the control of NLRP3 inflammasome, are yet unknown. Due to nuclear ROR α melatonin receptor plays a protective role during inflammation, melatonin could require ROR α to inhibit the inflammatory process.

According with this background, the present work was focused in the study of NF- κ B and NLRP3 connection during sepsis. Moreover, we evaluated the molecular mechanism(s) involved in the anti-inflammatory actions of melatonin.

The objectives of this research were:

- 1) To evaluate NF- κ B signaling pathway, cellular redox status and mitochondrial function in wild-type mice during sepsis.
- 2) To determine NLRP3 inflammasome activation during sepsis and to study the cooperation between NF- κ B/NLRP3 signaling pathway.
- 3) To assess the activation of both signaling pathways of the innate immunity in septic ROR α mutant mice.
- 4) To evaluate the protective as well as mechanistic effects of melatonin on NF- κ B and NLRP3 signaling pathway in both strain mice.

The results of this thesis show that nuclear translocation and DNA-binding activity of NF- κ B reflect a transitional nature during sepsis, but consequences in terms of inflammatory mediators remain elevated too long. Moreover, also courses with mitochondrial dysfunction, which in turn triggers NLRP3 inflammasome activation with a similar temporal pattern occurred with NF- κ B. Thus, NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathways cooperate during sepsis to lead to a disproportionate inflammatory response to microbial invasion.

Our data also illustrate that melatonin blunts NF- κ B pathway at nuclear level increasing the sirtuin-1-dependent deacetylation at Lys310 of NF- κ B. Moreover, melatonin improves cellular redox status and preserves the mitochondrial function. Therefore, melatonin inhibits NLRP3 inflammasome, disrupting the NF- κ B/NLRP3 connection during sepsis. Importantly, our study demonstrates for the first time that melatonin requires nuclear ROR α receptor not only to activate sirtuin-1 deacetylase and, in turn, to inhibit transcriptional activity of NF- κ B but also to modulate the cellular antioxidant defenses. Melatonin, however, inhibits the NLRP3 inflammasome activity through ROR α -independent effect.

Based on our results, melatonin becomes in a class of drug able to disrupt the connection between these two pathways of the innate immunity, and it may also constitute an important therapeutic tool for inflammatory diseases.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN _____	3
1. SISTEMA INMUNE Y RESPUESTA INFLAMATORIA _____	4
1.1 REACCIÓN INFLAMATORIA _____	4
1.2 SEPSIS, INFLAMACIÓN Y SISTEMA INMUNE _____	6
1.3 RECEPTORES DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA: ENTRE EL RECONOCIMIENTO DE LO EXTRAÑO Y LAS SEÑALES ENDÓGENAS DE PELIGRO _____	8
1.4 RECEPTORES TIPO TOLL: IMPLICACIÓN DE TLR4 EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA RELACIONADA CON LA SEPSIS _____	13
TLR4: COMPONENTE CENTRAL DEL RECEPTOR LPS EN MAMÍFEROS _____	17
MECANISMOS MOLECULARES DE LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADA POR TLR4 _____	19
2. NF-κB: REGULADOR CLAVE DE LA RESPUESTA INMUNE E INFLAMATORIA _____	23
2.1 MIEMBROS Y ESTRUCTURA DE LA FAMILIA NF- κ B/REL _____	23
2.2 INHIBIDORES DE LA FAMILIA NF- κ B/REL: FAMILIA I κ B _____	26
2.3 VÍAS DE ACTIVACIÓN DE NF- κ B _____	28
2.3.1 VÍA CANÓNICA DE ACTIVACIÓN DE NF- κ B _____	28
2.4 PAPEL DE NF- κ B DURANTE LA RESPUESTA INMUNE E INFLAMATORIA EN LA SEPSIS _____	34
3. FAMILIA DE RECEPTORES NLR DE LA INMUNIDAD INNATA. PAPEL DEL INFLAMASOMA NLRP3 EN LA SEPSIS _____	39
3.1 SIGNALOSOMAS NOD _____	42
3.2 INFLAMASOMAS NLRP _____	43
3.2.1 INFLAMASOMA NLRP3: GENERALIDADES Y MECANISMOS DE ACTIVACIÓN _____	44
3.2.2 INFLAMASOMA NLRP3 DURANTE LA SEPSIS: CONEXIÓN ENTRE LAS DOS VÍAS DE LA INMUNIDAD INNATA _____	51

4. MELATONINA Y SU PAPEL TERAPÉUTICO EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA ASOCIADA A LA SEPSIS	55
4.1 SÍNTESIS DE LA MELATONINA	56
4.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MELATONINA	58
4.2.1 UNIÓN A RECEPTORES DE MEMBRANA	59
4.2.2 UNIÓN A RECEPTORES NUCLEARES	61
4.2.3 UNIÓN A PROTEÍNAS CITOSÓLICAS	66
4.2.4 ANTIOXIDANTE DE ACCIÓN DIRECTA E INDIRECTA	66
4.2.5 ACCIONES SOBRE LA FISIOLÓGÍA MITOCONDRIAL	68
4.3 PAPEL TERAPÉUTICO EN LA SEPSIS	69
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	75
III. MATERIALES Y MÉTODOS	81
1. ANIMALES, PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO Y TRATAMIENTOS	81
1.1 ANIMALES	81
1.2 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO: MODELO DE SEPSIS EXPERIMENTAL	83
1.3 PROGRAMA DE TRATAMIENTOS Y GRUPOS EXPERIMENTALES	84
2. ESTUDIOS <i>in vivo</i>	85
3. AISLAMIENTO DE LAS FRACCIONES CITOSÓLICAS Y NUCLEAR	87
4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	88
4.1 EXTRACCIÓN DE RNA	88
4.2 REACCIÓN DE REVERSO TRANSCRIPCIÓN	89
4.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR RT-PCR	90
4.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR OPEN-ARRAY	92
5. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA POR WESTERN BLOT	96
6. DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO CELULAR	99
6.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA DEPENDIENTE DE COBRE Y ZINC (Cu-Zn-SOD; SOD1)	99
6.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx) CITOSÓLICA	102

6.3 DETERMINACIÓN DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA (GRd) CITOSÓLICA	104
6.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA (CAT)	105
7. DETERMINACIÓN PARÁMETROS ANALÍTIVOS POR ELISA	107
7.1 CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD DE UNIÓN AL DNA DE NF- κ B p65	107
7.2 NIVELES INTRACELULARES DE NAD ⁺	108
8. CONSUMO DE OXÍGENO MITOCONDRIAL	109
9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY	111
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	113
III. RESULTADOS	117
1. LA MELATONINA INHIBE LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B Y NLRP3 DURANTE LA SEPSIS	118
2. LA MELATONINA NO TIENE EFECTO SOBRE LOS EVENTOS CITOSÓLICOS IMPLICADOS EN LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B	122
3. CONEXIÓN ENTRE LOS EFECTOS DE LA MELATONINA Y LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ROR α /Sirtuina-1	125
4. LA AUSENCIA DE ROR α SUPRIME LA INHIBICIÓN DE LA MELATONINA SOBRE NF- κ B	128
5. LA MELATONINA INHIBIFE LA MADURACIÓN DE IL-1 β EN AUSENCIA DE ROR α	130
6. LA DEACETILACIÓN DE NF- κ B MEDIADA POR Sirt-1 REQUIERE LA PARTICIPACIÓN DE ROR α	131
7. LA MELATONINA REQUIERE ROR α PARA MODULAR LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE	134
IV. DISCUSIÓN	141
V. CONCLUSIONS	151
VI. BIBLIOGRAFÍA	
VII. ANEXOS	181

INTRODUCCIÓN

1. SISTEMA INMUNE Y RESPUESTA INFLAMATORIA

Estamos expuestos diariamente a una gran cantidad de gérmenes, bacterias y microorganismos capaces de penetrar en nuestro organismo y causar enfermedades como resultado no sólo de la propia patogenicidad del elemento invasor sino también de la integridad y magnitud de los mecanismos de defensa del hospedador. Evolucionando bajo la enorme presión selectiva impuesta por los patógenos, el sistema inmune de los vertebrados, constituido por una red interactiva de tejidos, órganos linfoides y diferentes tipos celulares diseminados por todo el organismo, emerge como el elemento primordial de defensa al reconocer, neutralizar y eliminar todas aquellas sustancias que “le son extrañas”, al tiempo que inician y participan de los mecanismos de reparación tisular (Medzhitov and Janeway, Jr., 1997a; Parkin and Cohen, 2001).

Atendiendo a los mecanismos sensores y efectores utilizados, así como a la velocidad y especificidad de la reacción desencadenada, la respuesta inmune se ha clasificado en innata y adaptativa o adquirida. La **respuesta inmune innata**, que incluye tanto barreras (físicas, químicas y microbiológicas) como elementos del sistema inmune (macrófagos, neutrófilos, monocitos, citoquinas,...), representa la primera línea de defensa del huésped frente a la invasión. El reconocimiento de “lo extraño” se lleva a cabo mediante un número limitado de receptores que son codificados en la línea germinal bajo sus configuraciones definitivas, lo que hace de ella una respuesta inespecífica, limitada e inmediata, pero al mismo tiempo necesaria para la supervivencia (Moreno and Sanchez-Ibarrola, 2003). Por el contrario, la **respuesta inmune adaptativa o adquirida**, exclusiva de los organismos superiores, se caracteriza por desencadenar reacciones específicas frente a antígenos en las que participan un elevado número de receptores generados por reordenamiento génico y expresados sobre la superficie de los linfocitos T y B. Tal especificidad se consigue a cambio de un tiempo de

respuesta mayor que el de la innata, si bien la presencia de mecanismos de memoria permite responder de forma más rápida y potente ante un segundo encuentro con el mismo “elemento extraño” (Delves and Roitt, 2000b; Delves and Roitt, 2000a; Flajnik and Kasahara, 2010). No obstante, y a pesar de estas diferencias, ambas respuestas se integran dentro de un único sistema inmune que permite discriminar perfectamente entre lo propio y lo extraño para minimizar así el daño causado en el huésped (Medzhitov and Janeway, Jr., 1997a; Medzhitov, 2007).

1.1 LA REACCIÓN INFLAMATORIA

La inflamación se define como la respuesta local del sistema inmunológico de un organismo al daño causado en sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos o cualquier otro agresor de naturaleza física, química, biológica o mecánica (Nathan, 2002). A expensas de un enorme gasto de energía metabólica, la reacción inflamatoria tiene como objetivos eliminar las células y estructuras dañadas, matar y eliminar los agentes invasores y, bajo condiciones de daño sistémico, promover el reemplazamiento de las estructuras dañadas para así retornar a un estado de homeostasis tisular (Barton, 2008; Henson, 2005).

El análisis de este concepto nos permite establecer dos grandes valoraciones. La primera hace referencia al papel que juega el proceso inflamatorio a la hora de conectar las respuestas inmune innata y adquirida. Así, las células del sistema innato detectan y señalizan la presencia de daño, iniciándose una cascada inflamatoria que, además de contener al elemento agresor, permite la activación específica del sistema adaptativo. Por tanto, los signos clásicos de la inflamación (*tumefacción, rubor, calor y dolor*) son iniciados por el sistema innato, si bien las células del sistema adaptativo contribuyen e incrementan tales efectos ya que la inflamación surge igualmente como mecanismo efector adaptativo tras el reconocimiento del “elemento extraño” (Barton, 2008; Henson, 2005). La segunda valoración

se basa en el diferente propósito fisiológico y consecuencias patológicas que, en función del estímulo, muestra la respuesta inflamatoria (**Figura 1**) (Medzhitov, 2008). A pesar de que algunas condiciones inflamatorias crónicas, como la gota y obesidad, sólo se conocen en su configuración patológica, todo proceso inflamatorio tiene un enorme valor fisiológico siempre que se desencadene de forma controlada, rápida y destructiva, pero específica y auto-limitante en cuanto al daño que genera, lo que le permitirá resolver la infección o reparar el daño y recuperar la homeostasis sin dañar al propio organismo. Sin embargo, si la respuesta inflamatoria no se controla de forma adecuada no sólo falla en su propósito de eliminar al estímulo nocivo, sino que además va a persistir en el organismo causando en el hospedador un mayor daño que el propio estímulo que la originó inicialmente (Drayton et al., 2006; Medzhitov, 2008).

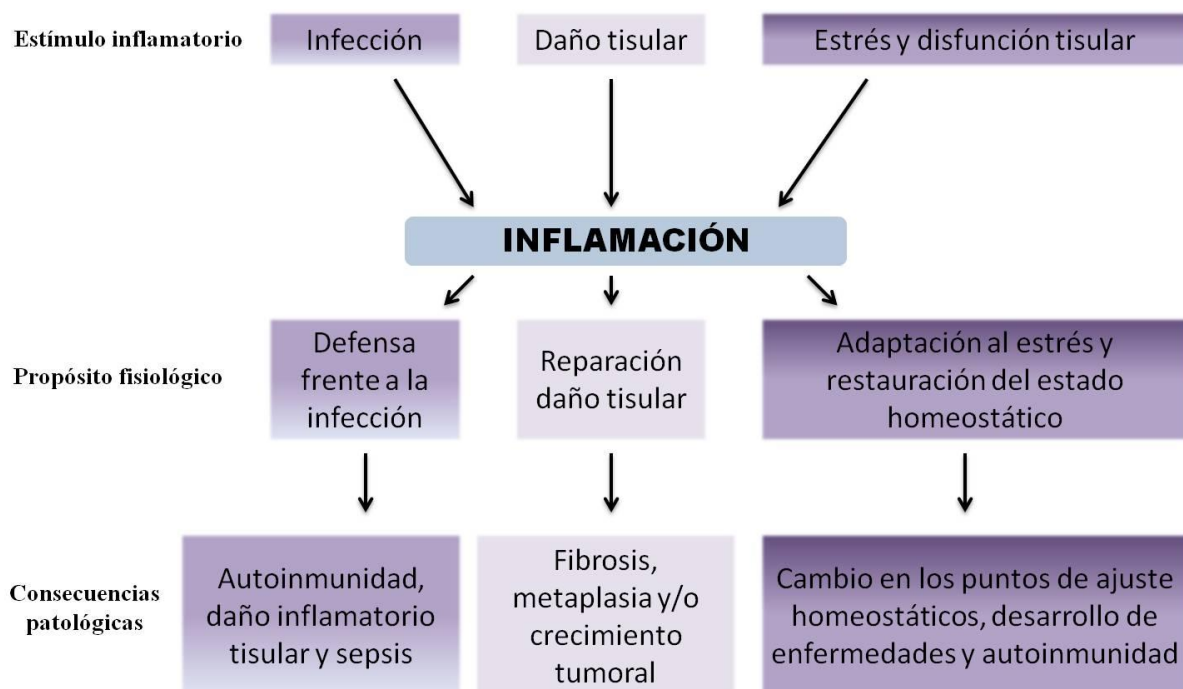


Figura 1. Causas y resultados fisiológicos y fisiopatológicos de la inflamación. En función del estímulo, la respuesta inflamatoria tiene diferentes propósitos fisiológicos y consecuencias patológicas. De los posibles estímulos, sólo la inflamación asociada a infección se acopla con una activación de la respuesta inmune (adaptado de Medzhitov, 2008).

1.2 SEPSIS, INFLAMACIÓN Y RESPUESTA INMUNE

Un ejemplo característico de un estado inflamatorio patológico y asociado a la activación de la respuesta inmune es la sepsis; este síndrome, así como sus complicaciones (sepsis severa, shock séptico y el síndrome de disfunción orgánica múltiple) representan estados progresivos de mayor severidad de la misma enfermedad en la cual una respuesta sistémica frente a la infección o frente a agresiones severas conduce a una reacción inflamatoria no regulada que afecta a órganos alejados del insulto inicial, causando eventualmente fallo multiorgánico y muerte (**Figura 2**) (Matot and Sprung, 2001).

SIRS	SEPSIS	SEPSIS SEVERA	SHOCK SÉPTICO	MODS
<ul style="list-style-type: none"> ✓Temperatura >38,3°C o <36 °C ✓Más de 90 latidos por minuto ✓Más de 20 inspiraciones por minuto o una presión arterial parcial de CO₂ <32 mmHg ✓Leucocitos > 12.000 mm³ o <4.000 mm³, o más de 10% de formas inmaduras 	SIRS junto con evidencia clínica de infección	Sepsis asociada con disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión, incluyendo acidosis láctica, oliguria o alteración aguda del estado mental	Hipotensión inducida por sepsis a pesar de un adecuado reemplazo de fluido, junto con presencia de acidosis láctica, oliguria o alteración aguda del estado mental	Presencia de función orgánica alterada en enfermos agudos en los que la homeostasis no puede ser mantenida sin intervención

Figura 2. Estados clínicos de la respuesta inflamatoria sistémica frente al proceso infeccioso (Bone et al., 1992; Levy et al., 2003). Las definiciones dadas para la sepsis y sus estados patológicos asociados deben ser susceptibles de sufrir variaciones con mayor aplicación clínica dada la naturaleza heterogénea de los pacientes sépticos. SIRS, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; MODS, síndrome de disfunción multiorgánica.

A pesar de los esfuerzos realizados para facilitar un diagnóstico preciso, de las mejoras en las Unidades de Cuidados Intensivos, y de la constante búsqueda de terapias más efectivas, la heterogeneidad etiológica mostrada por la sepsis provoca que, aún hoy en día, se asocie con una alta tasa de mortalidad, especialmente en sus fases más graves o en pacientes de mayor edad (Ulloa et al., 2009; Wheeler et al., 2009). Así, estudios epidemiológicos realizados por el *National Center for Health Statistics* y por el *Centers for Disease Control and Prevention* evidencian que la sepsis es la décima causa de muerte a nivel mundial, diagnosticándose anualmente entre 77-240 nuevos casos por cada 100.000 habitantes, lo que

supone un aumento en la incidencia anual del 1,5%. Además, detrás de estos datos se esconden costes hospitalarios que alcanzan cifras de 17 billones de dólares en Estados Unidos, y de 5,8-7,6 billones de euros en Europa (Wheeler et al., 2009). En España, el análisis de altas hospitalarias del año 2001 en la Comunidad de Madrid describe una incidencia de 14,1 episodios de sepsis grave por cada 10.000 habitantes, con una mortalidad media del 33% y un coste hospitalario que asciende a 70 millones de euros, 26 de los cuales se destinan a la atención de pacientes que no sobreviven a la patología (Inigo et al., 2006).

Todos estos datos en conjunto muestran la enorme importancia que tiene la sepsis para el sistema sanitario de cualquier país desarrollado y la necesidad de seguir avanzando en el conocimiento de la enfermedad y su progreso terapéutico, reduciendo así los tiempos y costes sanitarios. En este sentido, el principal problema a resolver es conocer en qué momento de la respuesta inmune desencadenada en el hospedador se presenta la fase hiperinflamatoria y cuándo la fase inmunosupresora o anti-inflamatoria, lo que nos permitirá elegir correctamente la intervención terapéutica óptima para obtener resultados satisfactorios (Hotchkiss et al., 2013; Ronco et al., 2003). No obstante, este enigma resulta difícil de resolver dadas las numerosas interconexiones que se establecen entre las distintas vías de la inmunidad innata, así que un mejor conocimiento de dichas vías facilitaría la comprensión de la etiología de la sepsis y la identificación de nuevas y exitosas dianas terapéuticas.

1.3 RECEPTORES DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA: ENTRE EL RECONOCIMIENTO DE LO EXTRAÑO Y LAS SEÑALES ENDÓGENAS DE PELIGRO

Como ya hemos comentado con anterioridad, los receptores participantes en la respuesta inmune innata se codifican en la línea germinal, lo que implica no sólo que cada receptor tenga una especificidad antigénica predeterminada genéticamente sino que además se generen en un número muy limitado (Medzhitov and Janeway, Jr., 1997b). Sin embargo, esta limitación numérica entra en conflicto con el elevado número de agentes infecciosos capaces de producir daño al huésped y su alta capacidad de mutación. Por ello, el sistema inmune innato reconoce estructuras antigénicas altamente conservadas en diversos microorganismos que, en su conjunto, reciben el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). A pesar de ser diferentes desde el punto de vista bioquímico, todos los PAMPs comparten una serie de características comunes: **a)** son producidos por los microorganismos pero no por las células del huésped, permitiendo diferenciar entre lo “propio y lo extraño”; **b)** se basan en estructuras invariables compartidas por múltiples patógenos, aspecto clave a la hora de detectar la presencia de infección a pesar del limitado número de receptores; y **c)** son esenciales para la supervivencia y/o patogenicidad de los microorganismos, por tanto, no susceptibles a sufrir mutaciones o pérdidas evolutivas (Akira et al., 2001; Janeway, Jr., 1989; Medzhitov, 2001). En base a esto, los receptores propios del sistema inmune innato adoptan el nombre de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés *Pattern recognition receptor*); todos los PRR presentan, desde un punto de vista estructural, un dominio específico para el reconocimiento de PAMPs y una región de interacción proteína-proteína esencial para iniciar los procesos de señalización celular (Medzhitov, 2007).

No obstante, sus diferencias funcionales permite agrupar a los PRR en:

- a) **PRR secretados** y presentes tanto en fluidos corporales como en el espacio extracelular, entre los que se incluyen receptores del complemento, proteína C-reactiva, proteína componente P amiloide sérico o la proteína relacionada con la pentraxinas PTX3. Dada su localización, estos PRR serán los encargados de unirse a la superficie celular de los microbios, activar el sistema del complemento, iniciar la opsonización de los patógenos, e incluso participar en la transferencia de PAMPs a otros receptores de la respuesta inmune innata (Lee and Kim, 2007).
- b) **PRR transmembrana**, entre los que se encuentran los receptores de tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll-like receptors*) y los receptores tipo lectina C (CLRs, del inglés *C-type Lectin receptors*), expresados ambos sobre la membrana celular o sobre lisosomas/endosomas, y gracias a los cuales se lleva a cabo el reconocimiento inmune sobre células no infectadas para desencadenar, en consecuencia, una respuesta efectora antimicrobiana (Iwasaki and Medzhitov, 2010).
- c) **PRR citosólicos**, incluidos los receptores tipo RIG-I (RLRs, del inglés *retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors*) y los receptores tipo NOD (NLRs, del inglés *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing receptors*). Ambos actúan como sensores intracelulares detectando la presencia de virus, productos microbianos, sustancias relacionadas con el estrés celular o partículas cristalinas de origen no infeccioso. De este modo, los PRR citosólicos median la respuesta inmune una vez que la célula está infectada, cooperando asimismo con los PRR transmembrana a la hora de dar continuidad a la señalización intracelular asociada a la presencia un elemento “extraño” (Martinon et al., 2009; Pichlmair and Reis e Sousa, 2007).

Un aspecto clave a considerar es que la respuesta inmune a un determinado patógeno no se limita exclusivamente a su reconocimiento por un único PRR, sino que implica cooperaciones complejas entre distintos receptores, células inmunes y mediadores. Además, un mismo patógeno presenta múltiples PAMPs que serán reconocidos por diferentes tipos de PRRs, sin olvidar que un mismo PAMP puede ser reconocido por diferentes PRR (tabla 1). Por lo tanto, la conexión que se establece entre los diferentes PRR va a mostrar tanto un efecto cuantitativo (las respuestas sinérgicas entre PRR permiten responder eficientemente a bajas condiciones del PAMP) como cualitativo (la activación de un PRR por su PAMP específico desencadena la activación de otros PRR relacionados), lo que se traduce en un aumento en la capacidad del hospedador de detectar cualquier patógeno y responder de forma eficiente (Figura 3) (Hontelez et al., 2012; Miao and Rajan, 2011; Tada et al., 2005).

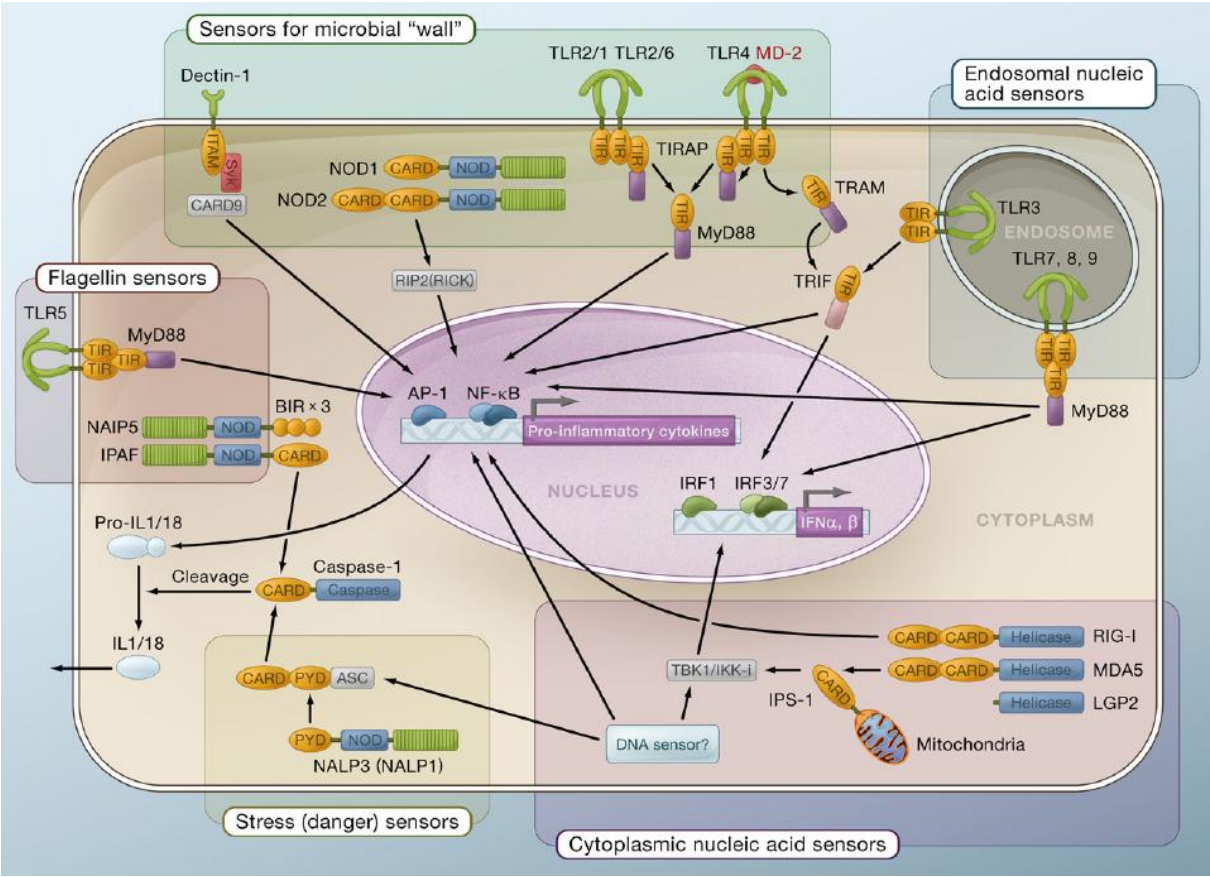


Figura 3. Comunicación entre los PRR y amplificación de la respuesta inflamatoria (Ishii et al, 2008).

	PAMPs microbianos	TLRs (membrana)	RLRs (citoplasma)	NLRs (citoplasma)	CLRs (membrana)
<i>Virus</i>	Proteínas estructurales	TLR2, TLR4	N.D.	N.D.	N.D.
	DNA	TLR9	DAI	NALP3	FcγR
	RNA	TLR3, TLR7, TLR8	RIG-I, MDA5, LGP2	NALP3	FcγR
<i>Bacteria</i>	Componentes pared celular (LPS, peptidoglicano, ácido lipoteicoico, lipoproteínas)	TLR2/1, TLR2/6, TLR4	N.D.	NOD1, NOD2, NALP1, NALP3	Colectinas
	Flagelina	TLR5	N.D.	IPAF, NAIP5	N.D.
	Perotoxinas	N.D.	N.D.	NALP3	N.D.
	DNA	TLR9	N.D.	ASC	N.D.
	RNA	N.D.	N.D.	NALP3	N.D.
	<i>Parásitos</i>	GPIs	TLR2, TLR4	N.D.	N.D.
Hemozoina malaria		TLR9	N.D.	N.D.	N.D.
Proteínas (Tc52 de <i>T.cruzi</i> , profilina)		TLR2, TLR11	N.D.	N.D.	N.D.
DNA		TLR9	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Helmintos</i>	Lípidos	TLR2	N.D.	N.D.	N.D.
	RNA	TLR3	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Hongos</i>	Componentes pared celular (GlcNAc, manano, β-glucano)	TLR2, TLR4, TLR6	N.D.	N.D.	Receptor manosa, DC-SIGN, Dectina-1 y 2, CARD9
	DNA	TLR9	N.D.	N.D.	N.D.

Tabla 1. Principales ligandos microbianos de los receptores de la respuesta inmune innata. Los receptores inmunes innatos (TLRs, RLRs, NLRs y CLRs) reconocen tanto patrones microbianos específicos como compartidos con otros receptores. N.D., no determinado; LPS, lipopolisacárido; GPIs, glicosilfosfatidilinositol; GlcNAc, N-acetilglucosamina; FcγR, receptores Fc para IgG (adaptado de Ishii y colaboradores, 2008).

No obstante, una respuesta inflamatoria desproporcionada puede causar muerte celular y daño tisular en el propio hospedador, con la consecuente liberación de componentes celulares al medio extracelular. Estos componentes o “señales de peligro” reciben de forma conjunta el nombre de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, del inglés *Damage-Associated Molecular Patterns*), e incluyen tanto proteínas celulares (HMGB1, del inglés *High-mobility group protein B1*, interleuquina-1, SAP130, del inglés *Histone deacetylase-dependent SIN3A*) como moléculas relacionadas con ácidos nucleicos (DNA, ATP o ácido úrico). A pesar de mostrar un papel importante a la hora de combatir a los patógenos, estos DAMPs pueden ser reconocidos por algunos de los PRR especificados anteriormente, lo que desencadena no sólo en una mayor respuesta inflamatoria contra el patógeno sino también un fallo importante en la regulación de las vías inflamatorias, transformándose el proceso inflamatorio en un estado crónico (El et al., 2007; Jounai et al., 2012; Matzinger, 1998). En resumen, conocer el código inflamatorio mediado por DAMPs y PAMPs, así como los mecanismos responsables de su reconocimiento y las vías de señalización activadas tras él, debe facilitar la elaboración de nuevas estrategias terapéuticas de mayor éxito clínico. Los siguientes apartados se centrarán en los aspectos estructurales, moleculares y vías de señalización asociados a los receptores TLRs y NLRs, dada la importancia que presenta ambos en un proceso inflamatorio de carácter patológico.

1.4 RECEPTORES TIPO TOLL: IMPLICACIÓN DE TLR4 EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA RELACIONADA CON LA SEPSIS

La proteína *Toll* se describió inicialmente en *Drosophila melanogaster* como un receptor transmembrana de tipo I responsable de controlar la polaridad del eje dorso-ventral durante el desarrollo embrionario (Stein et al., 1991). Sin embargo, estudios posteriores ponen de manifiesto un papel central de *Toll* en la respuesta inmune de *Drosophila* adulta frente a la infección fúngica (Lemaitre et al., 1996). En 1997, Medzhitov y cols. identificaron un homólogo del receptor *Toll* de *Drosophila* en mamíferos que, actualmente, corresponde con el receptor semejante a *Toll* 4 (TLR4, del inglés *Toll-like receptor 4*). Estos mismos autores observaron que una forma constitutivamente activa de este receptor era capaz de inducir al factor de transcripción nuclear kappaB (NF-kB, del inglés *nuclear factor-kappa B*), lo que provocaba la expresión conjunta de citoquinas de carácter pro-inflamatorio y moléculas coestimuladoras esenciales para la activación de las células T nativas (Medzhitov et al., 1997). Esta íntima asociación entre TLR y la respuesta inmune innata fue confirmada en años posteriores por Poltorak y cols. al identificar que la incapacidad de responder adecuadamente al lipopolisacárido (LPS) reside en la existencia de una mutación puntual en el gen *tlr4* (Poltorak et al., 1998).

En los últimos años, numerosas proteínas relacionadas con TLR4 y englobadas dentro de la familia TLR han sido clonadas, y su distribución en diferentes especies nos indica que el sistema de señalización dependiente de TLR está altamente conservado. Actualmente hay descritos diez y trece miembros de la familia TLR en mamíferos (10 en humanos y 13 en ratones), de los cuales TLRs 1-9 están conservados tanto en humanos como en ratones, TLR10 se ha descrito sólo en humanos (el dominio C-terminal del gen *tlr10* en ratón es sustituido por una secuencia no productiva y no relacionada) y TLR11 sólo es funcional en

ratones (el gen *tlr11* en humanos muestra un codón de parada que impide, por tanto, su producción) (Takeda and Akira, 2005). A pesar del amplio conocimiento sobre los ligandos y las vías de señalización de TLR1-9 y 11, los papeles biológicos de TLR10, 12 y 13, sus patrones de expresión, ligandos y vías de señalización permanecen aún inciertos (Beutler, 2004).

Estructuralmente, y de forma similar a la proteína *Toll*, los TLRs son receptores transmembrana de tipo I pertenecientes a la familia de receptores de la interleuquina-1 (IL-1R, del inglés *Interleuin-1 receptor*), con un peso molecular entre 90-115 kDa, y que van a constituirse en base a:

- Un dominio N-terminal extracelular, constituido por 16-28 repeticiones ricas en leucina (LRR, del inglés *Leucine-rich repeat*) esencial para la unión al ligando (Bell et al., 2003). Estos diferentes LRRs adquieren una forma solenoide a modo de herradura para facilitar tanto la dimerización del receptor TLR como el reconocimiento del ligando; no obstante, la interacción TLR-ligando no es suficiente para la activación de la vía intracelular sino que es necesarias unas series de modificaciones estructurales que permitan la interacción de los dominios intracelulares del receptor con proteínas específicas de la vía de señalización (Ishii et al., 2008)
- Un dominio transmembrana con estructura hélice-alfa
- Un dominio C-terminal intracelular (TIR, del inglés *Toll/IL-1 Receptor*) homólogo al dominio intracelular de los receptores IL-1R e IL-18R, y altamente conservado a lo largo de la evolución al ser el dominio responsable de iniciar las vías de señalización tras el reconocimiento del ligando correspondiente (West et al., 2006).

Desde un punto vista funcional, los TLRs juegan un papel clave en el reconocimiento tanto de elementos microbianos específicos, incluidos proteínas, lípidos y ácidos nucleicos

derivados de virus, bacterias, parásitos y hongos, así como de componentes celulares asociados al daño sufrido por el hospedador (Ishii et al., 2008). Por ello, los TLRs van a expresarse en todas aquellas células involucradas en la defensa del hospedador, entre las que se incluyen neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células epiteliales de la mucosa, o células B y T (Moreno and Sanchez-Ibarrola, 2003). A nivel celular y tisular, la localización subcelular de los TLRs van a depender del tipo de PAMP que reconozcan, diferenciándose entre **(Figura 4): a) receptores presentes en la membrana celular** (TLR1, 2, 4, 5 y 6), responsables de responder a todos aquellos PAMPs asociados a la superficie bacteriana con la activación de NF- κ B y producción de citoquinas pro-inflamatorias; y **b) receptores intracelulares** (TLR3, 7, 8 y 9), encargados de detectar ácidos nucleicos de virus y bacterias que inducirá la activación del factor de transcripción IRF (del inglés *Interferon Regulatory Factor*) y la consecuente expresión de genes relacionados con el interferón (IFN) de tipo I (Kumar et al., 2009; Uematsu and Akira, 2007).

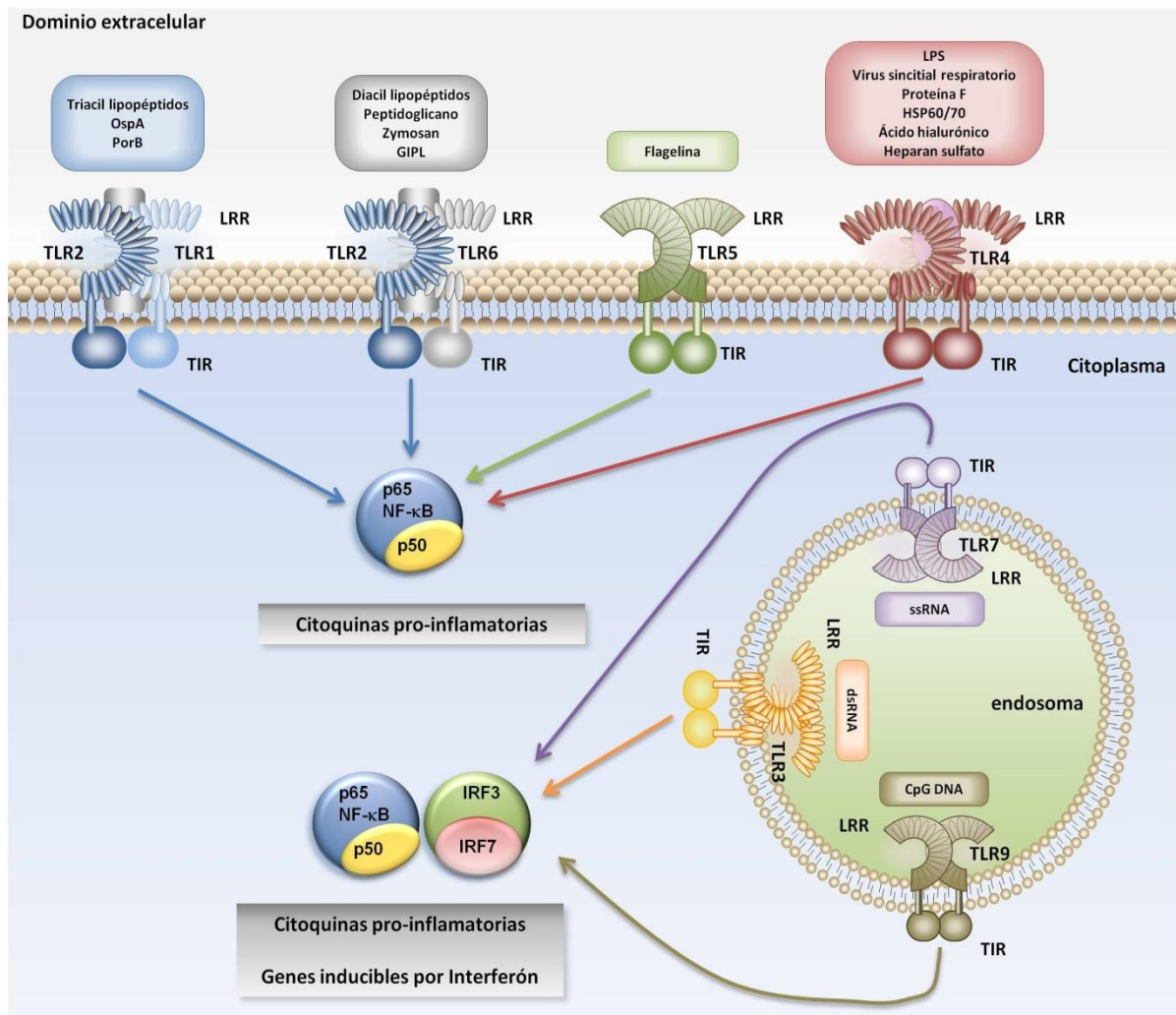


Figura 4. Localización subcelular de los distintos TLRs y sus principales ligandos. TLRs reconocen una amplia variedad de PAMPs presentes en bacterias, virus, protozoos y hongos gracias a la formación de estructuras homodiméricas (TLR3, 4, 5, 7 y 9) o heterodiméricas (TLR1/2 y TLR 2/6). *CpG DNA*, regiones de DNA ricas en citosina y guanina; *dsRNA*, virus RNA bicatenario o de doble cadena; *GIPL*, glicolípido; *HSP60/70*, proteínas de choque térmico 60/70; *IRF*, factor regulador de interferón; *LPS*, lipopolisacárido; *LRR*, repeticiones ricas en leucina; *NF-κB*, factor nuclear kappaB; *OspA*, proteína de la superficie externa; *PorB*, porina B; *ssRNA*, virus RNA monocatenario *TIR*, dominio semejante a *Toll/IL-1R*.

- **TLR4: COMPONENTE CENTRAL DEL RECEPTOR PARA LPS EN MAMÍFEROS**

Expresado en la superficie celular de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y endoteliales, TLR4 constituye, junto con CD14 (del inglés *Cluster of Differentiation 14*) y la proteína de diferenciación mieloide-2 (MD-2, del inglés *Myeloid Differentiation factor-2*), el denominado complejo receptor para el lipopolisacárido (LPS) o endotoxina bacteriana, uno de los principales iniciadores microbianos de la inflamación (**Figura 5**).

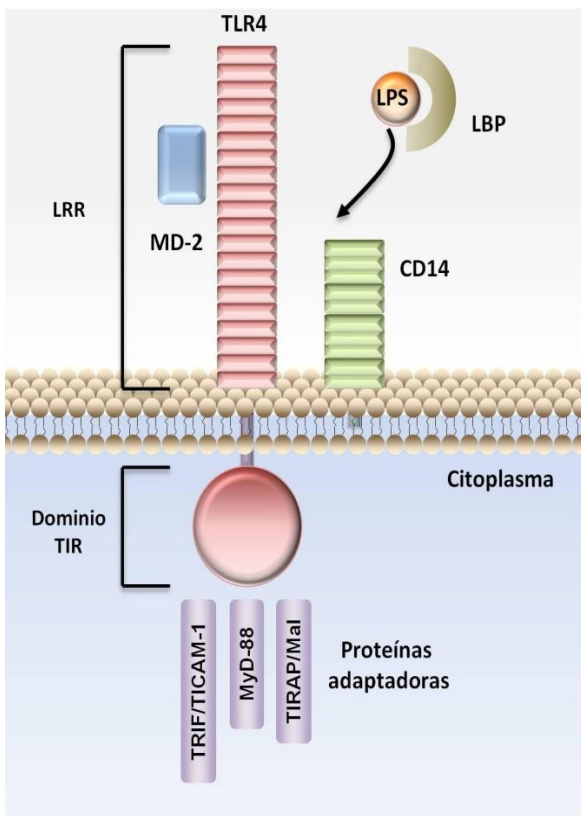


Figura 5: Ilustración esquemática del complejo receptor LPS (Fujihara et al., 2003).

Ver texto para más detalles

La naturaleza anfipática del LPS provoca la formación de agregados en ambientes acuosos, con la característica de que la difusión espontánea de monómeros de LPS para su reconocimiento por el complejo receptor ocurre a muy baja velocidad (Takayama et al., 1994).

Por ello, es necesario que, en primer lugar, el LPS adquiera una forma monomérica o "conformación endotóxica"; este proceso es catalizado y acelerado por la proteína de unión al LPS (LBP, del inglés *LPS-binding protein*), la

cual será la encargada de transferir los monómeros de LPS al antígeno de diferenciación monocítico CD14, segundo

elemento clave en el complejo receptor para el LPS (Fenton and Golenbock, 1998). CD14 consiste en una glucoproteína de 55 kDa que puede estar presente tanto de forma soluble en la sangre (sCD14) o mayoritariamente anclada al glucosil-fosfatidilinositol presente en la membrana de células de linaje mielomonocítico (mDC14); independientemente de esta localización, sus funciones se basan en discriminar entre productos bacterianos, reducir entre

100-1000 veces la concentración de LPS requerida para una correcta activación de la respuesta innata, y presentar el LPS al TLR4 (Fujihara et al., 2003). Como miembro de la familia TLR, la formación de homodímeros TLR4 va a permitir el reconocimiento del LPS presentado por CD14, y la posterior señalización intracelular al asociarse, a través de su dominio intracelular TIR, con distintas proteínas adaptadoras: MyD88 (del inglés *Myeloid differentiation primary response 88*), TIRAP/Mal (del inglés *TIR domain-containing adaptor protein/MyD88-adaptor-like*) y TRIF/TICAM-1 (del inglés *TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β /TIR domain-containing adaptor molecule*) (Takeda and Akira, 2005). No obstante, la sobreexpresión de TLR4 no cambia el fenotipo de aquellas líneas celulares insensibles al LPS, lo que implica la participación de otra proteína en este complejo receptor. En base a esto se identificó a la proteína de diferenciación mieloide MD-2 (del inglés *Myeloid Differentiation protein-2*) como un nuevo componente del complejo receptor para el LPS; esta pequeña proteína de 18 kDa se asocia al dominio extracelular de TLR4 y, si bien carece de un dominio transmembrana, presenta dos sitios susceptibles de N-glicosilación cruciales para la transducción de señales y el mantenimiento de la integridad funcional del complejo receptor. Asimismo, MD-2 regula la distribución celular de TLR4 (los fibroblastos embrionarios de ratones MD-2^{-/-} no transportan TLR4 desde el aparato de Golgi a la superficie celular, lo que impide el reconocimiento del LPS y su posterior señalización) (Nagai et al., 2002) y muestra capacidad para unirse al lípido A, responsable principal de la toxicidad biológica de la endotoxina, sin la necesidad de que participe LBP (Viriyakosol et al., 2000).

- MECANISMOS MOLECULARES DE LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADA POR TLR4

Según lo expuesto, parece claro que los distintos complejos receptores van a coordinarse para iniciar las señales intracelulares a través de los diferentes TLRs. Estas señales, basadas fundamentalmente en fosforilaciones y reclutamientos, culminarán con la síntesis de proteínas de carácter pro-inflamatorio que puedan combatir y erradicar la infección (Figura 6).

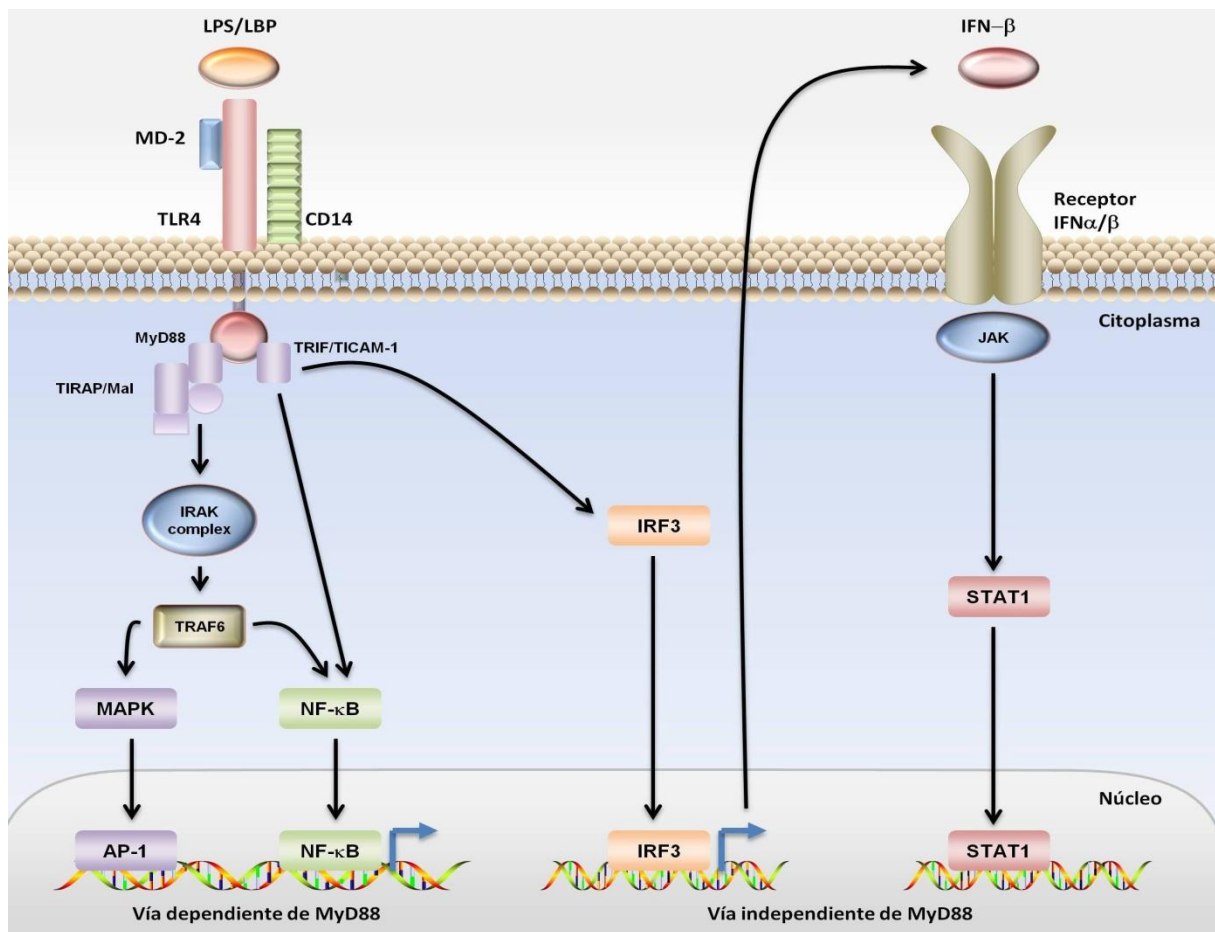


Figura 6. Activación de macrófagos mediada por la señalización de TLR dependiente e independiente de la proteína MyD88 en respuesta al LPS bacteriano. Adaptado de Fujihara y cols (Fujihara et al., 2003). Ver texto para más detalles.

A) VÍA DEPENDIENTE DE MyD88: la homología existente entre el dominio TIR citosólico de TLR y el presente en IL-1R hace que ambos receptores empleen componentes comunes en la transducción de señales, entre los que incluyen MyD88, quinasas asociadas al receptor de la IL-1 (IRAK, del inglés *IL-1 receptor-associated kinases*) y el factor 6 asociado al receptor del TNF (TRAF6, del inglés *TNF receptor-activated factor 6*). Así, el reconocimiento del ligando específico induce el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88; desde el punto de vista estructural, esta proteína consta de un dominio TIR en posición C-terminal a través del cual se une con el receptor TLR, y un dominio de muerte en posición N-terminal esencial para el reclutamiento, bien de forma directa o bien con la participación de la proteína Tollip (del inglés *Toll Interacting protein*), de las formas activas de IRAKs al complejo receptor. Como consecuencia, se induce la actividad quinasa de IRAK provocando múltiples eventos de fosforilación que, en última instancia, reduce la afinidad de IRAK por MyD88 y aumenta por TRAF6 (Fujihara et al., 2003; Janssens and Beyaert, 2003). En un paso posterior, el complejo IRAK-TRAF6 se disocia del receptor y sus componentes seguirán vías totalmente diferentes; mientras IRAK es degradada por acción del proteosoma, TRAF6 se dirigirá al citosol donde activará factores de transcripción a través de dos vías principales:

1. Una primera vía que conduce a la activación de la proteína activadora 1 (AP-1, del inglés *Activator Protein-1*), el elemento de respuesta a suero (SER, del inglés *Serum Response Element*) y el elemento de respuesta a AMPc (CRE, del inglés *cAMP Responsive Element*), todos ellos factores de transcripción activados a través de las tres rutas MAP kinasas (MAPK, del inglés *Mitogen-activated Protein Kinase*) (Fujihara et al., 2003).
2. La segunda vía conduce a la activación del factor de transcripción NF- κ B, factor clave en la coordinación de la respuesta inmune innata y adquirida en la sepsis al regular la expresión génica de numerosos mediadores celulares (Zingarelli, 2005).

B) VÍA INDEPENDIENTE DE MyD88: tras el reconocimiento del LPS por el complejo receptor, el dominio TIR del TLR4 va a interactuar con la proteína adaptadora TRIF/TICAM-1 cuya principal función es activar al factor regulador de interferón 3 (IRF3, del inglés *IFN regulatory factor 3*), el cual induce la expresión de genes para el interferón beta (IFN β). Una vez sintetizado, IFN β sale al exterior de la célula donde interactúa con su receptor celular, evento que media la activación de kinasas citoplasmáticas denominadas JAKs (del inglés *Janus kinases*). Estas kinasas presentan la función de fosforilar restos de tirosina presentes tanto en el receptor del interferón como en el factor de transcripción STAT1 (del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription*). La fosforilación a este último nivel provoca la dimerización de STAT-1 y su posterior traslocación nuclear donde activará la expresión de todos aquellos genes dependientes de él, entre ellos el gen codificante para la iNOS (Fujihara et al., 2003; Yamamoto et al., 2003). Asimismo, eventos como la activación de la caspasa-1 para la maduración de la IL-18 o la maduración de células dendríticas han sido clasificados como fenómenos inducidos de forma independiente a la proteína MyD88 (Kaisho et al., 2001; Seki et al., 2001).

2. NF- κ B: REGULADOR CLAVE DE LA RESPUESTA INMUNE E INFLAMATORIA

A pesar de la enorme variedad de estímulos a los que responde el sistema inmune, la complicada tarea de comunicar la presencia de lesiones o infecciones en el organismo se lleva a cabo por un número relativamente bajo de vías de señalización que dependen, en última instancia, de un activador transcripcional común conocido como NF- κ B (del inglés *Nuclear Factor kappaB*). Este factor de transcripción fue descrito inicialmente por Sen y Baltimore en 1986 como un factor nuclear capaz de unirse a una secuencia de 11 pares de bases en el promotor de la cadena ligera kappa de las inmunoglobulinas en células B maduras (Sen and Baltimore, 2006); poco después, estos mismos autores revelaron que, en presencia de estímulos como el LPS o forbol 12-miristato 14-acetato, se induce su actividad transcripcional en otros tipos celulares (Sen and Baltimore, 1986). En la actualidad, no cabe duda que NF- κ B existe virtualmente en el citoplasma de la mayoría de tipos celulares bajo una forma inactiva dada su unión con un inhibidor específico, I κ B (del inglés *Inhibitor of kappaB*), de tal forma que su traslocación al núcleo y posterior actividad transcripcional sólo tiene lugar tras el reconocimiento de las señales apropiadas que determinen la liberación de NF- κ B de su inhibidor.

2.1 MIEMBROS Y ESTRUCTURA DE LA FAMILIA NF- κ B/Rel

En mamíferos, la familia NF- κ B/Rel de factores de transcripción consta de cinco miembros identificados como p105/p50, p100/p52, p65 (RelA), c-Rel y RelB, y codificados por los genes *NFKB1*, *NFKB2*, *RELA*, *REL* y *RELB*, respectivamente. Como rasgo común, los diferentes miembros comparten un dominio N-terminal homólogo a Rel (RHD, del inglés *Rel Homology Domain*) constituido por una secuencia de 300 aminoácidos clave en la dimerización de los diferentes miembros, unión al DNA e interacción con los inhibidores I κ B

(Figura 7). Además, este dominio contiene una secuencia de localización nuclear (NLS, del inglés *Nuclear Localization Sequence*) indispensable para permitir la traslocación de estas proteínas al núcleo donde llevan a cabo su función transcripcional (Gilmore, 1990). No obstante, las secuencias presentes en la posición C-terminal muestran claras diferencias que permiten la clasificación en la familia NF- κ B/Rel en dos subfamilias: *subfamilia de proteínas Rel* y *subfamilia de proteínas NF- κ B*. La *subfamilia Rel* incluye los miembros c-Rel, p65 (RelA) y RelB, todos ellos con un dominio C-terminal de activación de la transcripción susceptible de sufrir modificaciones post-translacionales que potencian su unión al DNA y actividad transcripcional. Por el contrario, la *subfamilia NF- κ B*, constituida por NF- κ B1 (p105/p50) y NF- κ B2 (p100/p52), presentan en su dominio C-terminal repeticiones ricas en ankirina similares a las presentes en la familia de inhibidores I κ B, lo que convierte a estos miembros en represores transcripcionales cuando no se asocian con los miembros de la *subfamilia Rel* (Hayden and Ghosh, 2008) **(Figura 7)**. A diferencia de la *subfamilia Rel*, NF- κ B1 y NF- κ B2 van a ser sintetizados como largos polipéptidos de 105 y 100 KDa, respectivamente, que serán “rotos” post-transcripcionalmente para generar las subunidades de unión al DNA p50 y p52, mediante un procesamiento que requiere el reconocimiento por parte de una proteasa específica de una secuencia de 23 aminoácidos rica en glicina (GRR, del inglés *Glycine-rich region*) en el dominio N-terminal (Betts and Nabel, 1996; Wah et al., 1997).

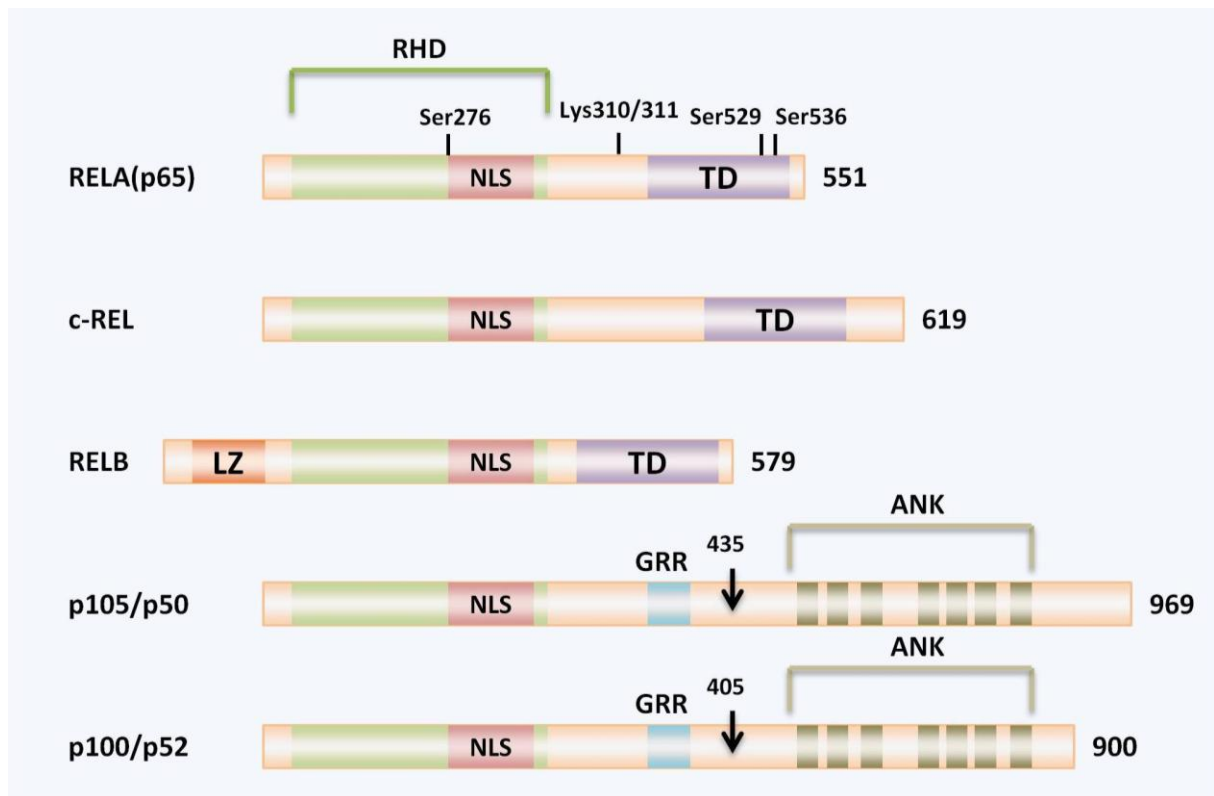


Figura 7. Miembros de la familia NF- κ B/Rel. El número de aminoácidos de cada proteína en humanos se indica a la derecha. En RELA (p65) se indica los principales residuos que sufren modificaciones post-translacionales clave para su activación transcripcional. En p105/p50 y p100/p52 se indican los sitios donde tiene lugar su procesamiento a formas activas. RHD, dominio homólogo a Rel; NLS, secuencia de localización nuclear; TD, dominio de transactivación; LZ, dominio cremallera de leucina; GRR, secuencias ricas en glicina; ANK, repeticiones ricas en ankirina.

Los diferentes miembros de la familia NF- κ B/Rel muestran la habilidad para formar homo o heterodímeros *in vivo*, con excepción de RelB que sólo forma heterodímeros *in vitro*; una vez formados, estos dímeros se unen a sitios específicos presentes en el DNA, denominados sitios *kappaB*, constituidos por 9-10 pares de bases de gran variabilidad: 5'-GGGRNWYYCC-3', donde: R es adenina o guanina, N es cualquier nucleótido, W es adenina o timina e Y es citosina o timina (Gilmore, 2006). Sin embargo, los distintos homo y heterodímeros muestran diferente habilidad a nivel transcripcional; así, por ejemplo, los heterodímeros p65/p50, que constituyen la forma mayoritaria, activan la transcripción de genes, efecto que es consecuencia de la actividad de p65 limitándose el papel de p50 a

facilitar la unión al DNA. Por el contrario, los homodímeros p50/p50 reprimen la transcripción génica tras su unión a los sitios *kappaB* (Grimm and Baeuerle, 1993; Schmitz and Baeuerle, 1991). Por tanto, esta diversidad combinatoria va a contribuir eficazmente a la regulación de diferentes conjunto de genes dependientes de NF- κ B para así ajustar la respuesta desencadenada al estímulo recibido (Gilmore, 2006).

2.2 INHIBIDORES DE NF- κ B/Rel: FAMILIA I κ B

Como ya hemos mencionado anteriormente, los dímeros de NF- κ B se mantienen en el citosol de forma inactiva dada su unión con proteínas pertenecientes a la familia I κ B. Desde un punto de vista clásico, esta familia engloba tres proteínas inhibidoras típicas, denominadas I κ B α (NF κ BIA), I κ B β (NF κ BIB) e I κ B ϵ (NF κ BIE), así como los miembros p100 y p105 de la *subfamilia de proteínas NF- κ B*. Además, dentro de esta familia de inhibidores se aprecia igualmente la existencia de dos miembros “atípicos” (Bcl-3 (BCL3) e I κ B ζ (NF κ BZ)) de naturaleza inducible y dependientes de determinadas señales. Recientemente, se ha identificado un nuevo miembro, I κ B γ , el cual se origina a partir de un transcripto alternativo del gen *NFKB1* en ratón y cuya función biológica es aún incierta (Whiteside and Israel, 1997).

A nivel estructural, los diferentes miembros de la familia I κ B se caracterizan por presentar entre 6-7 repeticiones de ankirina a través de las cuales se unen al dominio RHD de NF- κ B, enmascarando la secuencia NLS e impidiendo, por tanto, su traslocación al núcleo. El número de repeticiones de ankirina varía entre los diferentes miembros, otorgando una especificidad única a cada inhibidor a la hora de unirse al dímero NF- κ B; ; por ejemplo, I κ B α va a regular la activación del heterodímero mayoritario p50/p65, mientras que la acción reguladora de I κ B ϵ recae sobre aquellos complejos constituidos en base a RelA (p65) o c-Rel (Ghosh et al., 1998). I κ B α , el miembro I κ B mejor caracterizado, e I κ B β van a compartir una misma estructura en base a tres dominios: a) un dominio N-terminal, igualmente presente en

I κ B ϵ , en el cual residen regiones reguladoras susceptibles a eventos de fosforilación y/o ubiquitinización esenciales para su la degradación inducida por estímulo de I κ B y, por tanto, para la activación de NF- κ B; b) dominio central en base a repeticiones de ankirina; y c) dominio C-terminal PEST, una secuencia peptídica rica en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T) que juega un papel esencial para el recambio basal de la proteína (Verma et al., 1995) (Figura 8).

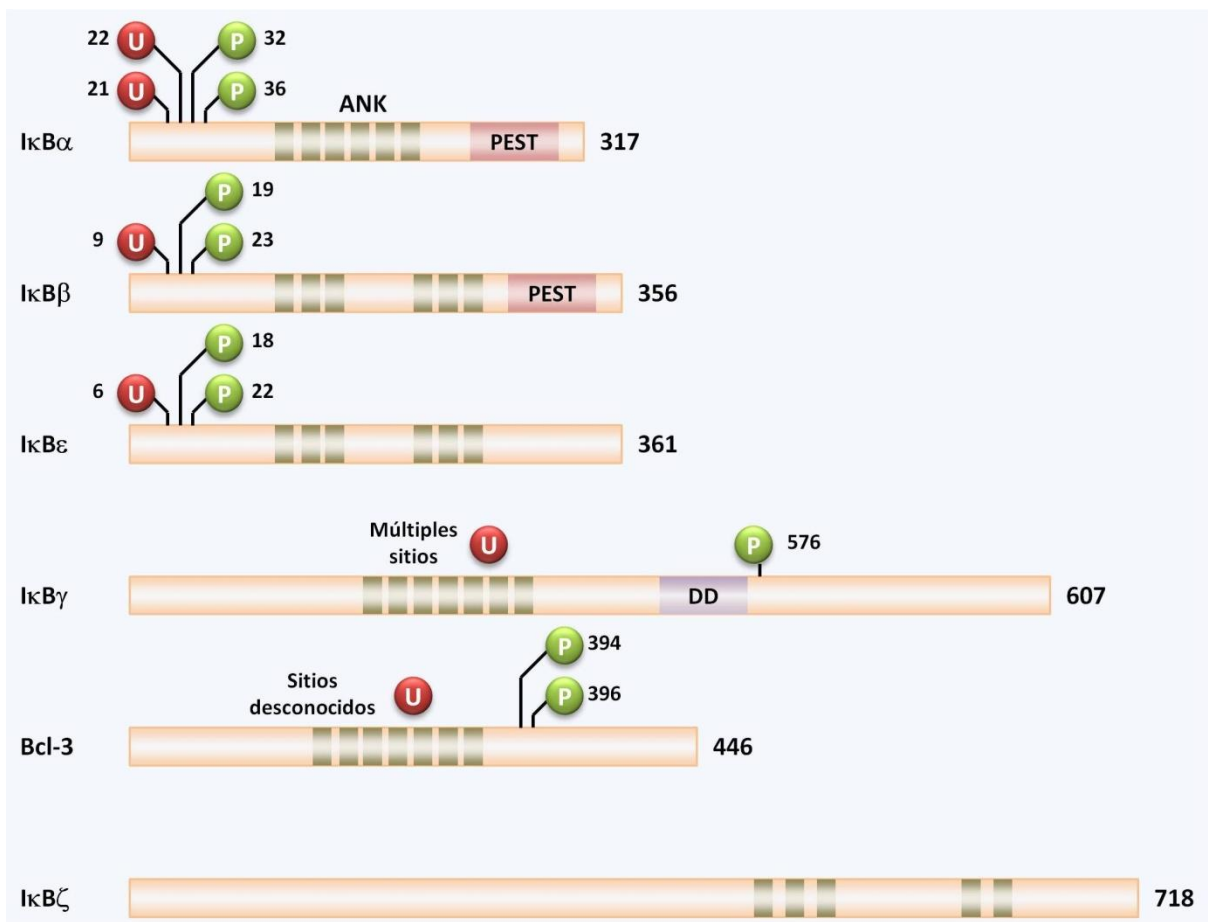


Figura 8. Miembros de la familia I κ B. El número de aminoácidos de cada proteína en humanos se indica a la derecha. Se indica los residuos que sufren modificaciones post-traduccionales (fosforilación o ubiquitinización) claves para su degradación. ANK, repeticiones ricas en ankirina; PEST, secuencia rica en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T); DD, dominio de muerte; U, ubiquitinización; P, fosforilación.

2.3 VÍAS DE ACTIVACIÓN DE NF- κ B

Los miembros de la familia NF- κ B/Rel son activados por una amplia variedad de estímulos, incluyendo citoquinas de carácter pro-inflamatorio como TNF- α o IL-1 β , mitógenos de células B o T, bacterias y sus productos bacterianos como el LPS, virus y proteínas virales, RNA de doble cadena o incluso situaciones de estrés físico o químico (Karin and Ben-Neriah, 2000). El correcto reconocimiento de estos ligandos por sus receptores específicos conlleva la activación de NF- κ B a través de dos posibles vías perfectamente identificadas:

- a) la *vía canónica*, donde la traslocación nuclear de los heterodímeros p50/p65 tiene lugar gracias a la fosforilación y posterior degradación del inhibidor I κ B α . Esta vía se activa principalmente en respuesta a productos bacterianos y señales pro-inflamatorias con un papel clave en la patogénesis de enfermedades inflamatorias, incluida la sepsis. Por ello, en el siguiente apartado profundizaremos en detalle sobre los diferentes eventos moleculares que intervienen en ella.
- b) *vía no canónica*, activada fundamentalmente por citoquinas de la familia de TNF- α , pero no por el propio TNF- α , y en la cual la fosforilación dependiente de IKK α de p100: RelB conduce al procesamiento de p100 y la consecuente generación de complejos p52: RelB (Oeckinghaus et al., 2011).

2.2.1 VÍA CANÓNICA O CLÁSICA DE ACTIVACIÓN DE NF- κ B

En un **primer paso (Figura 9)**, tras el reconocimiento del ligando por su receptor específico, tiene lugar el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88 mediante interacciones homofílicas con los dominios TIR presentes en el receptor; asimismo, esta proteína adaptadora, a través de su dominio de muerte (DD, del inglés *Death Domain*) en

posición N-terminal, recluta a su vez a las proteínas IRAK-1 e IRAK-4 (IRAKs, del inglés *IL-1 Receptor-Associated kinases*), unas quinasas específicas serina/treonina esenciales para permitir la transmisión de señales desde el receptor al carecer éste de actividad quinasa intrínseca (Janssens and Beyaert, 2003). No obstante, otra proteína adaptadora conocida como Tollip (del inglés *Toll interacting protein*) es también capaz de unirse con IRAK-1 a nivel citosólico, antes del reconocimiento de la señal, y permitir así su reclutamiento al dominio DD de MyD88, liberándose en un paso final la proteína Tollip para permitir que continúe la transmisión de la señal (Burns et al., 2000). Bien de forma directa, o bien con la participación de Tollip, MyD88 permite la interacción entre los dos miembros activos IRAK-1 e IRAK-4, situación que va a inducir la actividad quinasa de IRAK-4 la cual, con un papel importante de los residuos T342, T345 y S346, fosforilará a IRAK-1 en los residuos T209 y T387 de su dominio quinasa. En consecuencia, la actividad quinasa de IRAK-1 se verá inducida, actuando sobre ella misma para aumentar aún más su estado fosforilado (Burns et al., 2003).

Una vez hiperfosforilada, IRAK-1 pierde afinidad por MyD88 y la adquiere por el dominio TRAF C-terminal de TRAF6 (del inglés, *TNF receptor-associated factor 6*), la cual se recluta de forma transitoria al complejo receptor (Janssens and Beyaert, 2003). A continuación, el complejo IRAK-1/TRAF6 se disocia del receptor e interacciona a nivel de la membrana con un complejo preexistente constituido por TAK1 (del inglés *TGF- β -activated kinase 1*), TAB1 (del inglés *TAK1 binding protein 1*) y TAB2 (del inglés *TAK1 binding protein 2*) (**paso 2, Figura 9**) (Jiang et al., 2002; Takaesu et al., 2000). Al interactuar con el complejo IRAK-1/TRAF6, TAK1 y TAB2 se fosforilan y, junto con TRAF6 y TBA1 y TAB2 se translocan al citosol. Mientras tanto, IRAK-1 hiperfosforilada queda a nivel de la membrana donde será reconocida por ubiquitin ligasas específicas para su posterior degradación proteosómica (Zhang and Ghosh, 2002).

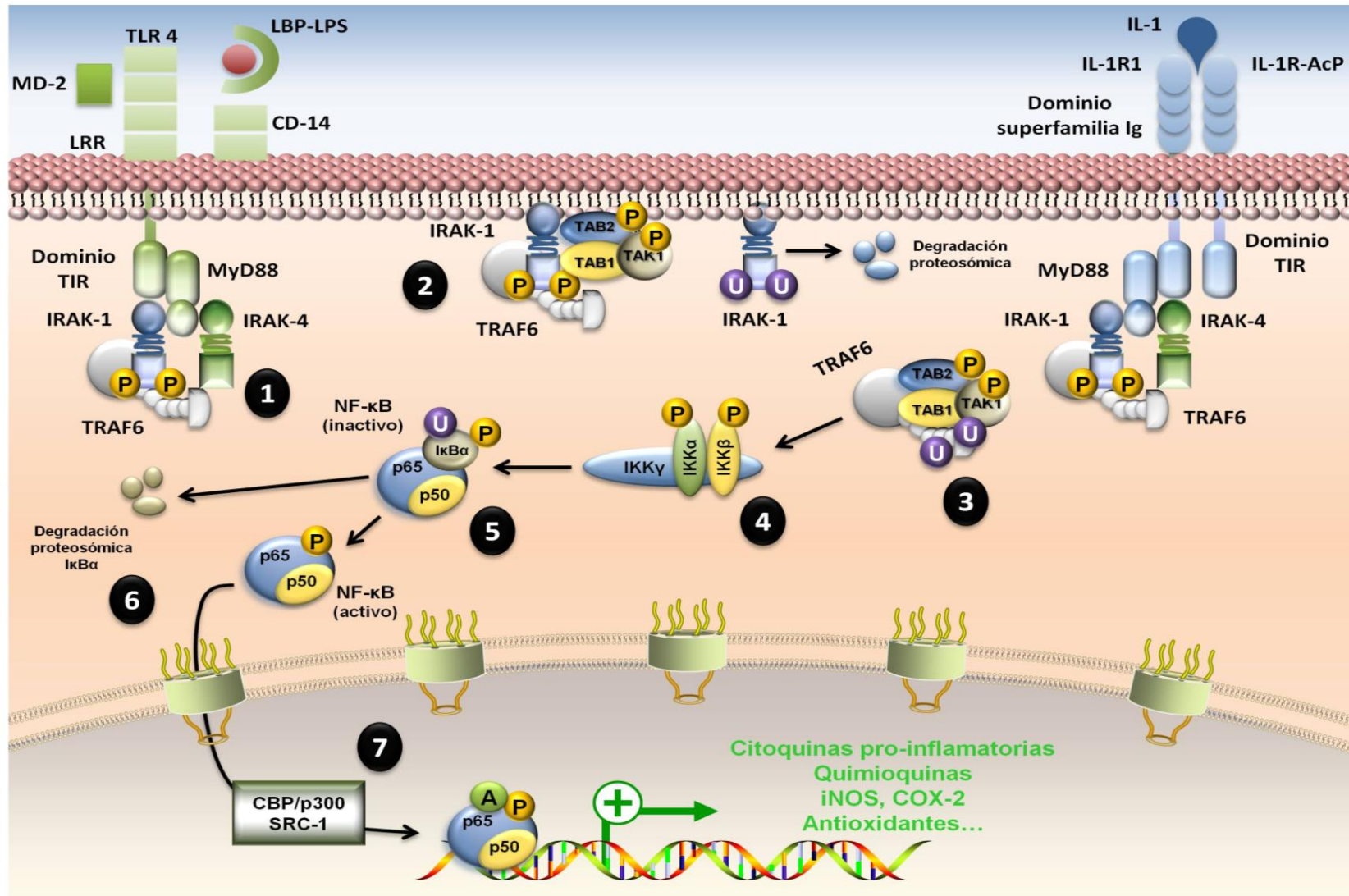


Figura 12. Vía de activación de NF- κ B canónica a partir de señales pro-inflamatorias clásicas como IL-1 β o lipopolisacárido. Ver texto para más detalles y nomenclatura de las principales moléculas implicadas. P, fosforilación; U, ubiquitinización; A, acetilación. Adaptado de Janssens y Beyaert, 2003.

Ya a nivel citosólico, el complejo TRAF6/TAK1/TAB1/TAB2 se une a las E2 ligasas Ubc13 y Uev1A, responsables en última instancia de catalizar la síntesis de una cadena de poliubiquitina asociada a K63 sobre TRAF6, induciéndose así la activación de TAK1 dependiente de TRAF6 (**paso 3, Figura 9**) (Wang et al., 2001). Tras esta activación, TAK1 va a fosforilar y activar consecuentemente al complejo de quinasas IKK (del inglés, *IκB kinase complex*), constituido en base a dos subunidades catalíticas, IKK α (85 KDa) e IKK β (87 KDa), y una subunidad reguladora, IKK γ o NEMO (48 KDa) (**paso 4, Figura 9**) (DiDonato et al., 1997). De forma más detallada, la activación del complejo IKK se produce como consecuencia de la fosforilación dependiente de TAK1 de determinados residuos de serina en IKK α (Ser177 y Ser181) e IKK β (Ser176 y Ser180), lo que induce un cambio conformacional en el complejo IKK inactivo necesario para la activación del dominio quinasa de ambas subunidades catalíticas (Delhase et al., 1999).

La activación del complejo IKK desencadenará la fosforilación del inhibidor I κ B α en los residuos de Ser32 y Ser36 (**paso 5, Figura 9**). En consecuencia, I κ B α fosforilado será inmediatamente reconocido por el sistema ubiquitin F-box/WD40E3RS^{I κ B}/B-TrCP que causa la poliubiquitinización de I κ B α en los residuos de lisina Lys21 y Lys22 (Karin and Ben-Neriah, 2000). Ambas modificaciones marcan al inhibidor para su rápida degradación por el proteosoma 26S, lo que deja expuesta la secuencia NLS de NF- κ B permitiendo, en consecuencia, su translocación al núcleo (**paso 6, Figura 9**) (Alkalay et al., 1995; Lin et al., 1995). Finalmente (**paso 7, figura 9**), NF- κ B sufre modificaciones nucleares, principalmente fosforilaciones y acetilaciones, que afectan profundamente a su habilidad para activar la transcripción de sus genes diana; en este sentido, numerosos estudios proponen que la fosforilación de p65 en su residuo Ser276 por la protein quinasa A (PKA, del inglés *protein kinase A*) aumenta su actividad transcripcional al facilitar la interacción de p65 con el

coactivador CBP/p300 (del inglés *CREB-binding protein and p300*), presentando éste una actividad histona acetiltransferasa intrínseca necesaria para abrir la estructura de la cromatina (Karin and Ben-Neriah, 2000). Más importante aún, el estado acetilado de p65 va a determinar la eficiencia de su interacción con I κ B α . Así, la acetilación de p65 en su residuo Lys310 mediada por CBP/p300 causa una débil interacción entre p65 e I κ B α , mientras que la subsecuente deacetilación por la interacción específica de p65 con histonas deacetilasas, como por ejemplo la histona deacetilasa HDAC3 (del inglés, *histone deacetylase type 3*) o la deacetilasa dependiente de NAD⁺ sirtuina-1 (Sirt1, del inglés *silent mating type information regulation 2 homolog*), hace que esta unión p65: I κ B α sea más estable, lo que permite tal complejo salir del núcleo y restaurar el *pool* citosólico p65: I κ B α (Chen et al., 2001; Yeung et al., 2004).

La actividad transcripcional de NF- κ B se caracteriza por ser una respuesta altamente específica o selectiva a fin de evitar la completa activación de los más de 150 genes dianas de NF- κ B; esta característica es dada no sólo por la existencia de una *respuesta combinatoria*, en el sentido de que los promotores de los genes contienen elementos de respuesta para más de un factor de transcripción totalmente necesarios para la transcripción efectiva de dicho gen, sino también por la propia activación selectiva de los diferentes miembros de la familia NF- κ B/Rel al mostrar éstos distintas preferencias por los sitios de unión al DNA (Kunsch et al., 1992).

Finalmente, y como se deduce de lo comentado durante este apartado, el carácter inducible de la respuesta transcripcional dependiente de NF- κ B implica la existencia de diferentes mecanismos feedback negativos puestos en marcha tras el reconocimiento de la señal. Dichos mecanismos se caracterizan, además, por presentar diferencias marcadas en su

reversibilidad y efectividad, lo que desencadena una respuesta bifásica en condiciones de estimulación crónica: una actividad transcripcional de NF- κ B completa y sin restricciones en una temprana ventana temporal seguida de una fase de menor expresión génica dado que los principales reguladores negativos son genes diana de NF- κ B (Renner and Schmitz, 2009). Tal y como hemos mencionado anteriormente, el principal mecanismo feedback negativo estudiado es el dependiente de la proteína inhibidora I κ B α , importancia que se fundamenta en: a) enmascaramiento de NLS de p65 por I κ B α , con la consiguiente localización citoplasmática del complejo inactivo NF- κ B: I κ B α , y b) rápida transcripción de I κ B α dependiente de NF- κ B al determinarse la existencia de sitios *kappaB* en el promotor del gen I κ B α . Por tanto, una vez sintetizadas las nuevas moléculas de I κ B α , éstas van a entrar nuevamente al núcleo, posiblemente gracias a las NLS presentes en p50 (Malek et al., 2001), y secuestran a NF- κ B deacetilado y no unido a histonas, transportándolo al citoplasma gracias a la existencia de secuencias de exporte nuclear (NES, del inglés *nuclear export signal*) en I κ B α (Arenzana-Seisdedos et al., 1995; Arenzana-Seisdedos et al., 1997; Chen et al., 2001; Chiao et al., 1994). No obstante, existen mecanismos reguladores adicionales que finalizan la respuesta transcripcional de NF- κ B mediante la degradación del factor de transcripción unido al DNA, si bien se desconoce si este evento es dependiente de la activación transcripcional de NF- κ B o si bien es orquestado por modificaciones post-translacionales de p65 u otros miembros pertenecientes a la familia NF- κ B/Rel (Natoli and Chiocca, 2008). En definitiva, los diferentes mecanismos feedback negativos ocurren siempre con un característico retraso temporal permitiendo, en primer lugar, la completa activación de NF- κ B por un período determinado, para posteriormente finalizar la respuesta transcripcional de una forma altamente organizada tanto a nivel espacial como temporal (Renner and Schmitz, 2009).

2.4 PAPEL DE NF- κ B DURANTE LA RESPUESTA INMUNE E INFLAMATORIA EN LA SEPSIS

Consistente con el concepto de que el shock séptico es un síndrome clínico de etiología diversa, una enorme variedad de bacterias, productos bacterianos y citoquinas pro-inflamatorias liberadas durante la sepsis muestran como diana final la activación de NF- κ B, hasta el punto que este nivel de activación se correlaciona positivamente con la severidad de la enfermedad al monitorizarse una actividad mayor en pacientes sépticos que no sobreviven en comparación con aquellos que sí lo hacen (Arnalich et al., 2000; Bohrer et al., 1997; Fan et al., 2001). Una vez activado, NF- κ B media la transcripción de numerosos genes claves en la respuesta inmune innata, entre los que se incluyen citoquinas (factor estimulante de colonias de macrófagos, granulocitos, TNF- α , IL-1 β , IL-2, 3, 12 o 18...), quimioquinas (IL-8, proteínas inflamatorias de macrófagos, CCL5,...), moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, ...), inmunoreceptores, enzimas pro-oxidantes (óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), ciclooxigenasa-2 (COX-2), lipoxigenasa) o proteínas de la fase aguda, todos ellos con un papel clave en diferentes eventos implicados en la fisiopatología de la sepsis: aparición de los signos clásicos de la inflamación, amplificación de la respuesta inflamatoria, coagulación intravascular diseminada, hipotensión sistémica, menor contractibilidad cardíaca, hiporeactividad vascular y daño endotelial microvascular. Es muy importante tener en cuenta que estas diferentes cascadas de eventos muestran una importante interconexión entre ellas, incrementando aún más el daño al organismo. Así, la activación de la coagulación promueve la producción de mediadores inflamatorios y amplifica, en consecuencia, la inflamación. Además, la hipotensión sistémica y la coagulación causa hipoperfusión tisular e hipoxia, preconditionando el desarrollo de fallo multiorgánico y la muerte final del individuo (Liu and Malik, 2006) (**Figura 10**).

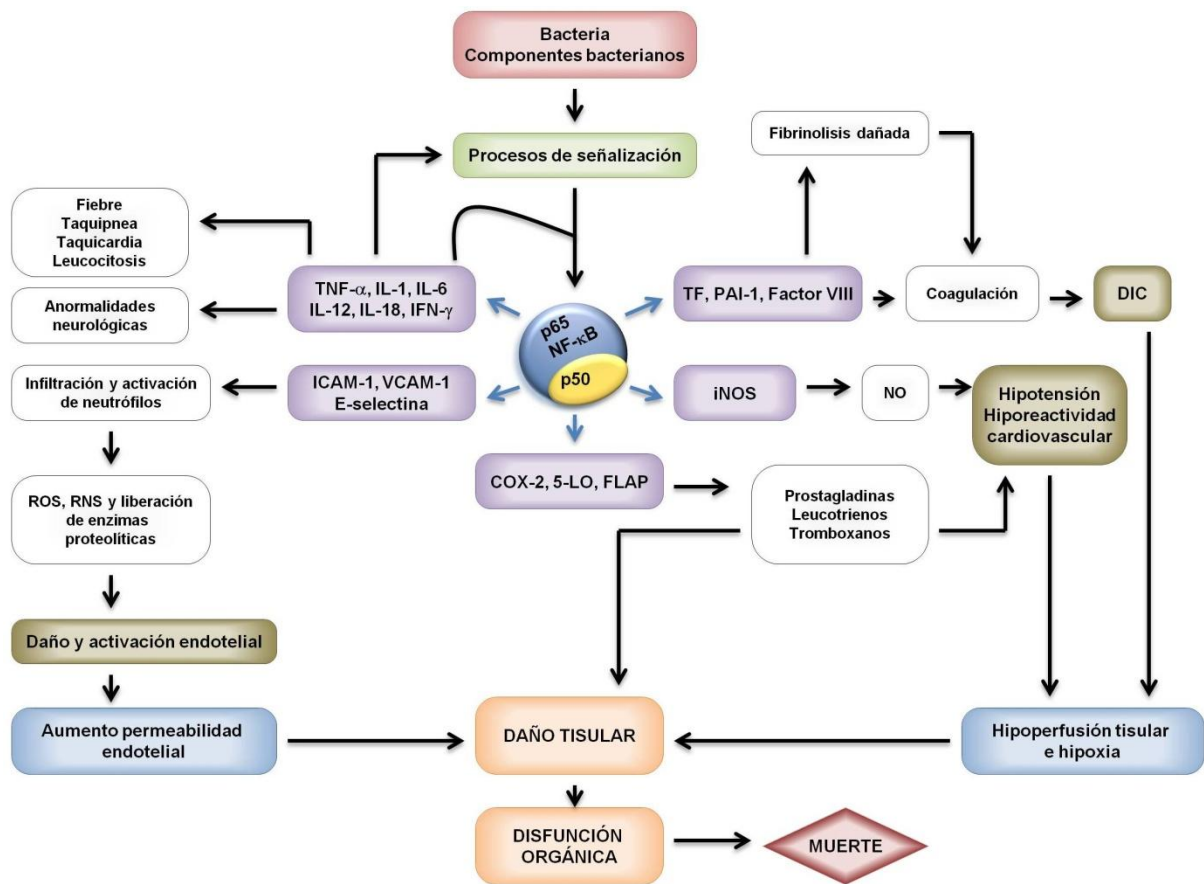


Figura 10. La activación de NF-κB juega un papel central en la fisiopatología del shock séptico. TF, factor tisular; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno-1 ; TNF-α, factor de necrosis tumoral alpha; IL, interleuquina; IFN-γ, interferón gamma; ICAM-1, molécula de adhesión intercelular 1; VCAM-1, proteína de adhesión celular vascular; COX-2, ciclooxigenasa 2; 5-LO, 5-lipooxigenasa; FLAP, proteína activadora de la 5-lipooxigenasa; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible, NO, óxido nítrico; DIC, coagulación intravascular diseminada; ROS, especies reactivas de oxígeno; RNS, especies reactivas de nitrógeno. Adaptado de Liu y Malik, 2006.

El estrés oxidativo, definido como el desbalance entre la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) y de nitrógeno (RNS, del inglés *reactive nitrogen species*) y su correcta eliminación por los sistemas antioxidantes endógenos, constituye otro importante nexo de unión entre NF-κB y la fisiopatología de la sepsis (**Figura 11**). En mamíferos, la mayoría de las ROS se forman durante la respiración celular, si bien también son producidas por los leucocitos como parte de la defensa normal del huésped contra los microorganismos invasores (Webster and Nunn, 1988). No obstante, las ROS son

importantes mensajeros intracelulares que participan activamente en la vía clásica de NF- κ B, bien como producto de su activación o bien como agente causal, demostrándose que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o hidroperóxidos orgánicos activan NF- κ B de forma temporal y dosis-dependiente (Horton, 2003; Zhou et al., 2001). Asimismo, las diferentes citoquinas pro-inflamatorias cooperan a la hora de inducir la iNOS, generándose una sobreproducción de óxido nítrico ($NO\bullet$) y RNS derivadas de él que aumentan aún más el daño celular durante el proceso séptico (Lanone et al., 2000). Esta producción descontrolada desencadena una vasodilatación excesiva y depresión miocárdica durante el shock séptico (Weitzberg, 2005), menor depuración del H_2O_2 por la catalasa (Brown, 2001) y generación de nuevas ROS/RNS como los peroxinitritos ($ONOO^-$) al reaccionar con el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Lipton et al., 1993), eventos que extienden el daño oxidativo sobre proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y que, en definitiva, afectan negativamente a la función celular.

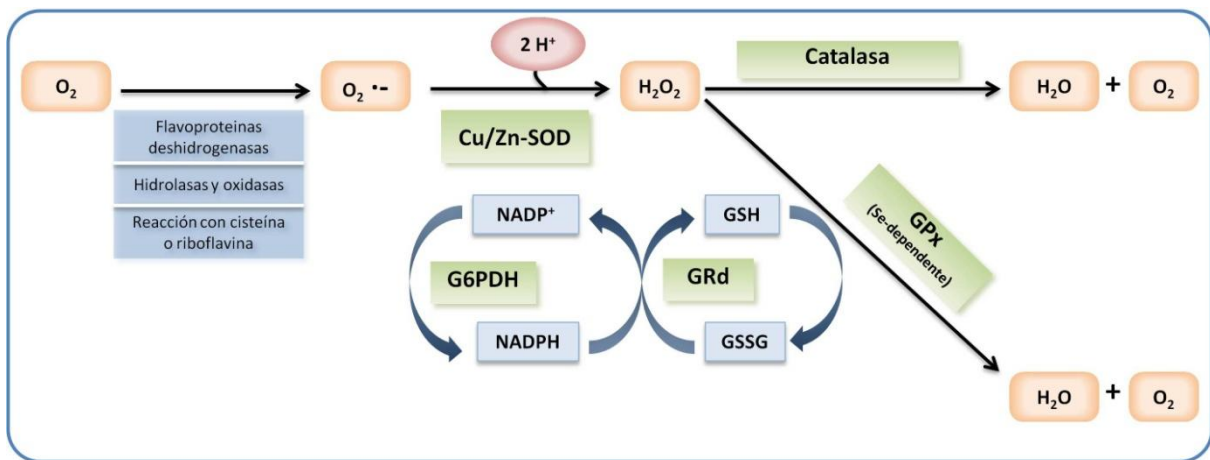


Figura 11. Sistemas antioxidantes enzimáticos. La reducción univalente del oxígeno molecular origina la formación de $O_2^{\bullet-}$, el cual será dismutado a H_2O_2 por acción de la superóxido dismutasa dependiente de Cu/Zn (Cu/Zn-SOD). Este H_2O_2 puede ser depurado a H_2O y O_2 bien por acción de la catalasa o bien por acción de la glutatión peroxidasa (GPx). Esta última utiliza GSH para tal conversión y, en consecuencia, se oxida a GSSG, siendo necesario un sistema de reciclaje que restaure los niveles de GSH. Así, la glutatión reductasa (GRd) reduce el GSSG a GSH, requiriendo para ello el poder reductor del NADPH que pasa a NAD, restableciéndose nuevamente los niveles de NADPH por acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

En la mitocondria, los elevados niveles de $\text{NO}\bullet$ producidos por la isoforma mitocondrial de la iNOS (i-mtNOS) reducen la transferencia de electrones a lo largo de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y, como consecuencia del mayor escape de electrones, tiene lugar una mayor producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y ONOO^- . Tal situación de estrés oxidativo/nitrosativo mitocondrial causa la inhibición irreversible de los cuatro complejos respiratorios y la ATP sintasa, disminuyendo la síntesis de ATP y afectando profundamente a la función mitocondrial (Escames et al., 2003a; Escames et al., 2006). Además, la situación de estrés oxidativo durante la sepsis se ve agravada por los importantes fallos que sufren los sistemas antioxidantes endógenos, si bien algunos de ellos, como las isoformas cobre/zinc y manganeso de la superóxido dismutasa (Cu/Zn SOD y MnSOD, respectivamente), están directamente regulados por NF- κ B (Das and White, 1997); así, la activación descontrolada del sistema xantina oxidasa, glutatión peroxidasa (GPx) o SOD causa un mayor aumento en la generación de ROS, debido tanto a la depleción del glutatión (GSH) como el fallo en su sistema de reciclaje y completa depuración del H_2O_2 (**Figura 11**) (Malmezat et al., 2000; Nemeth and Boda, 2001).

En definitiva, estos datos sugieren a la inhibición de NF- κ B como una diana terapéutica ideal para el tratamiento del shock séptico. Desafortunadamente, la respuesta inmune innata dependiente de NF- κ B controla procesos tan dispersos pero interconectados como la limpieza bacteriana y la respuesta inflamatoria, lo que dificulta enormemente inhibir una respuesta sin que la otra se vea afectada negativamente. Por tanto, es necesario un mejor conocimiento de todos los mecanismos moleculares que desencadenan la activación de NF- κ B con el objeto de obtener una terapia efectiva que no sólo evite los efectos deletéreos causados por su inhibición sistémica de NF- κ B, sino que al mismo tiempo permita una inhibición local para impedir un proceso inflamatorio sistémico desproporcionado (Liu and Malik, 2006).

3. FAMILIA DE RECEPTORES NLR DE LA INMUNIDAD INNATA. PAPEL DEL INFLAMASOMA NLRP3 EN LA SEPSIS

Como ya hemos mencionado, el reconocimiento de ligandos exógenos y activación de la vía clásica de NF- κ B transcurre, durante la condición inflamatoria, de forma paralela a la acumulación de señales de peligro o DAMPs en respuesta al estrés celular o daño tisular. Una vez liberados, estos DAMPs serán reconocidos, entre otros PRRs, por la familia NLRs (*nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing receptors*), receptores citosólicos que cooperan con los receptores transmembrana TLRs a la hora de activar la respuesta inmune innata y procesos de apoptosis mediante la formación de complejos de señalización, tales como inflamomas y signalomas NOD (del inglés, *nucleotide-binding oligomerization domain*) (Martinon et al., 2002). Esta familia de receptores comprende 23 miembros en humanos y 34 identificados en ratón, si bien todos estos miembros se caracterizan por compartir una estructura en base a tres dominios (**Figura 12**) (Inohara et al., 2005; Martinon et al., 2009):

a) Dominio C-terminal LRR, constituido por secuencias repetitivas ricas en leucina, las cuales se disponen formando unas estructuras en herradura α/β , y responsable, desde un punto de vista funcional, de autorregular la activación de NLRs así como de detectar el ligando específico, si bien se desconocen los mecanismos a través de los cuales se produce tal interacción.

b) Dominio central NACHT, común a todos los NLRs, el cual presenta una actividad ATPasa esencial para la oligomerización de proteínas y la consecuente formación de los complejos activos denominados como inflamomas y signalomas NOD.

c) **Dominio efector N-terminal** altamente variable entre los distintos miembros de la familia NLR, lo que permite la interacción de las proteínas NLRs con una amplia variedad de moléculas implicadas en la transducción de señales que conducen, en última instancia, a la activación de caspasas inflamatorias, en el caso de los inflamasomas, o de NF- κ B, en el caso de los signalosomas NOD. Típicamente, los dominios presentes en N-terminal suelen oscilar entre la presencia de un dominio de transactivación ácido, un dominio tipo PYD (del inglés *Pyrin domain*), un dominio de reclutamiento y activación de caspasas CARD (del inglés *Caspase activation and recruitment domain*) o un dominio tipo BIR (del inglés *baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat*).

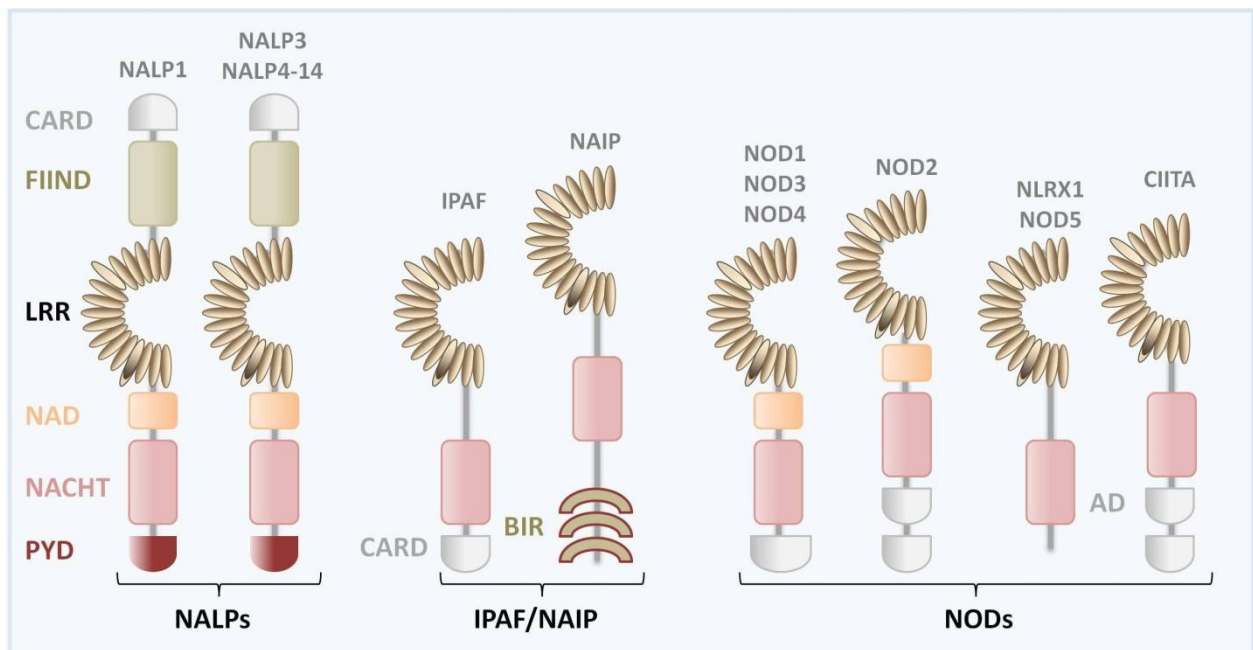


Figura 12. Organización estructural de los receptores NLRs. AD, dominio de activación; BIR, repeticiones de proteínas de inhibidores de apoptosis de baculovirus; CARD, dominio de activación y reclutamiento de caspasas; CIITA, activador de la transcripción de MHC de clase II; LRR, repeticiones ricas en leucina; NAD, dominio asociado a NACHT; NALP; proteína NLR que contiene dominio PYD; NAIP, proteína NLR inhibidora de la apoptosis; NALP, proteína comprendida por dominios NACHT, LRR y PYD; NOD, dominio de oligomerización y unión de nucleótidos; PYD, dominio pirina

Precisamente, la presencia de un dominio u otro en posición N-terminal permite la clasificación de los NLRs en cuatro grandes categorías: **1) NLRA**, donde A indica la presencia de un dominio de transactivación ácido, y cuyo único miembro es CIITA (del inglés *class II, major histocompatibility complex, transactivator*); **2) NLRB**, caracterizada por incluir al miembro NAIP con la presencia de un dominio BIR N-terminal, lo que le confiere capacidad para inhibir los procesos apoptóticos; **3) NLRC**, categoría constituida por NOD1, NOD2, NLRC3, NLRC4 y NLRC5, todos ellos con un dominio tipo CARD en posición N-terminal; y **4) NLRP**, en la cual se van a incluir la mayoría de los NLRs (NLRP1-14) y que comparten, como rasgo común, la presencia de un dominio PYD N-terminal (Ting et al., 2008).

No obstante, en base a sus relaciones filogenéticas, los receptores NLRs se clasifican en tres grandes subfamilias (**Figura 12**). La primera de éstas, la denominada **subfamilia NALPs o NLRPs**, incluye hasta 14 proteínas identificadas en humanos (NLRP1-NLRP14), algunas de las cuales, como es el caso de NLRP1, NLRP2 y NLRP3, actúan como elementos centrales en la formación de los inflamasomas, largos complejos multiproteicos que, tras la asociación de proteínas adaptadoras, inducen la activación de la caspasa-1 (Tschopp et al., 2003). A nivel estructural, esta subfamilia se caracteriza por presentar un dominio tipo PYD en posición N-terminal, manteniendo los dominios clásicos NACHT y LRR; sin embargo, la región LRR va a organizarse en el genoma de una forma modular donde cada exón no sólo codifica para un LRR particular sino igualmente para la mitad de los dos LRR adyacentes. De esta forma, la estructura tridimensional de la región LRR se mantiene invariable y, en consecuencia, se maximiza la variedad en la detección de ligando (Martinon and Tschopp, 2007). La segunda **subfamilia**, denominada **IPAF**, incluye sólo a dos miembros: IPAF o NRC4, con un dominio CARD N-terminal, y NAIP, en el cual el dominio N-terminal se constituye en base a tres dominios BIR. A pesar de esta notable diferencia estructural, ambos

miembros comparten con la subfamilia NLRP la habilidad para formar complejos multiproteicos o inflamasomas (Martinon et al., 2009). Finalmente, la **subfamilia NOD** engloba tanto a receptores NLR con un dominio CARD en posición N-terminal (NOD1-4), receptores con un dominio de transactivación ácido (CIITA) o receptores cuyo dominio N-terminal no ha sido aún definido (NOD5/NLRX1) (Martinon and Tschopp, 2005; Proell et al., 2008). Esta variabilidad estructural implica que cada miembro muestre distintas funciones; así, NOD1 y NOD2 inducen la activación de NF- κ B, mientras que CIITA regula la expresión transcripcional del complejo mayor de histocompatibilidad de clase 2. De forma similar a lo que ocurre con su estructura, la función de NOD5/NLRX1 es controvertida, si bien su reclutamiento en la membrana mitocondrial externa implica acciones sobre esta organela, como la regulación negativa de la vía antiviral mitocondrial o la producción de ROS (Moore et al., 2008; Tattoli et al., 2008).

3.1 SIGNALOSOMAS NOD

NOD1 y NOD2 son receptores citosólicos especializados en detectar la presencia de peptidoglucanos bacterianos liberados tras la fagocitosis de la bacteria, si bien las estructuras que detectan son diferentes; así, NOD2 detecta muramil dipéptido, constituyente de la pared celular de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, mientras que NOD1 reconoce de forma exclusiva el ácido meso-diaminopimélico característico de bacterias Gram-negativas (Girardin and Philpott, 2004). Una vez activados, NOD1 y NOD2 inician una respuesta pro-inflamatoria a través del reclutamiento de la proteína RIP2 (del inglés *receptor interactin protein 2*) mediado por interacciones homofílicas de tipo CARD. La oligomerización de RIP2 ubiquitinizada en K63 al signalosoma NOD permite la unión directa a IKK γ , siendo esta kinasa marcada para su degradación por el proteosoma; como consecuencia, se activan las subunidades catalíticas IKK α e IKK β que actuarán a nivel del inhibidor I κ B α , induciendo su

degradación proteosómica y la consecuente translocación de NF- κ B al núcleo (Tattoli et al., 2007). A través de esta vía de señalización, NOD1 y NOD2 adquieren una importancia vital en la respuesta inmune innata en células epiteliales al controlar la infección por la vía gastrointestinal (Tattoli et al., 2007); asimismo, las mutaciones en NOD2 se asocian con enfermedades autoinmunes o autoinflamatorias como la enfermedad de Crohn, síndrome de Blau, asma o eczema atópico (Tattoli et al., 2007).

3.1 INFLAMASOMAS NLRP

Tres miembros de la familia NLR, concretamente los receptores NLRP1, NLRP3 (denominado igualmente como criopirina, CIAS1 o NALP3) y NLRC4, junto con la proteína inducible por interferón AIM-2 (del inglés *absent in melanoma 2*), tienen la capacidad para formar inflamasomas, término acuñado para describir un complejo multiprotéico de alto peso molecular que regula la activación de las caspasas inflamatorias y, en consecuencia, la maduración de sus respectivos sustratos (Agostini et al., 2004; Martinon et al., 2002). En mamíferos, estas caspasas inflamatorias incluyen la caspasa-1 y caspasa-12, presentes tanto en humanos como en ratón, la caspasa-11, exclusiva de ratón, y las caspasas 4 y 5, relacionadas con la caspasa-1 humana; todas estas caspasas, desde un punto de vista estructural, se caracterizan por presentar un dominio CARD seguido de un dominio donde está presente el centro catalítico que le confiere actividad proteasa. De forma similar a las caspasas iniciadoras y ejecutoras partícipes de los procesos de muerte apoptótica, las caspasas inflamatorias se producen como proenzimas inactivas catalíticamente que, una vez detectada la señal, se integran y dimerizan en el inflamasoma, lo que desencadena su activación mediada por procesamiento proteolítico a fin de conducir al procesamiento y secreción de las formas maduras de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-18 e IL-33 (Martinon et al., 2009). No obstante, la caspasa-1 muestra otras dianas moleculares donde ejercer su función proteolítica, participando de forma activa en una gran variedad de

procesos como la regulación de la glicolisis, la secreción de proteínas no convencionales carentes de secuencia líder o procesos de piroptosis, un tipo de muerte celular programada asociada con la respuesta antimicrobiana durante el proceso inflamatorio y que, de forma independiente a la participación de caspasas pro-apoptóticas efectoras e iniciadoras clásicas (caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-9), provoca la ruptura de la membrana plasmática con la consecuente liberación de PAMPs/DAMPs que extienden el daño inflamatorio (Fink and Cookson, 2005; Keller et al., 2008; Shao et al., 2007).

En base a todo lo comentado con anterioridad, la activación del inflamasoma, con la consecuente producción de citoquinas IL-1 β , IL-18 e IL-33, requiere dos señales esenciales: la primera de estas señales, definida como señal *priming* o señal preestimuladora, se asocia a una mayor transcripción y traducción de las citoquinas pro-inflamatorias pro-IL-1 β , pro-IL-18 y pro-IL-33 así como del propio receptor NLR que participará en la formación del inflamasoma; mientras tanto, la segunda señal, producida por un amplio número de estímulos diversos, dispara el ensamblaje de los diferentes componentes del inflamasoma, la activación de la caspasa-1 y la consecuente secreción de las formas maduras de las citoquinas anteriormente mencionadas (Escames et al., 2012).

3.2.1 INFLAMASOMA NLRP3: GENERALIDADES Y MECANISMOS DE ACTIVACIÓN

De los diversos tipos de inflamasoma, el mejor caracterizado y estudiado hasta el momento es el constituido por el receptor NLRP3; su importancia radica en que cualquier tipo de mutación sufrida por el gen *nlrp3* desencadena una activación desproporcionada del inflamasoma, con la consecuente liberación excesiva de citoquinas pro-inflamatorias, principalmente IL-1 β , y la aparición de diversas enfermedades autoinflamatorias (síndrome autoinflamatorio familiar inducido por el frío, síndrome de Muckle-Wells, enfermedad

inflamatoria sistémica de inicio neonatal,...); todas estas enfermedades, englobadas bajo el concepto de síndromes periódicos asociados a la criopirina (CAPS, del inglés *cryopyrin-associated periodic syndromes*), se caracterizan por presentar episodios recurrentes de fiebre e inflamación sistémica de tejidos (Kubota and Koike, 2010; Neven et al., 2008).

Desde un punto de vista estructural, el inflamasoma NLRP3 se constituye en base al miembro NLRP3 de la familia NLR, la proteína adaptadora ASC (del inglés *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*) y la cisteín-proteasa caspasa-1 (Agostini et al., 2004). En un estado inactivo, NLRP3 se expresa constitutivamente en el citosol dada la interacción interna que se establece entre los dominios NACHT-NAD y LRR del receptor. Sin embargo, en presencia de las señales activadoras adecuadas, la proteína NLRP3 sufre importantes modificaciones conformacionales que exponen el dominio central NACHT-NAD, evento necesario para permitir la oligomerización del receptor a través de estos dominios y la posterior interacción y reclutamiento de la proteína adaptadora ASC mediada por interacciones homofílicas de tipo PYD. Además de este dominio PYD, ASC presenta un dominio tipo CARD en posición C-terminal a través del cual recluta al complejo receptor a la pro-caspasa-1 mediante interacciones homofílicas tipo CARD. Como consecuencia de estas modificaciones conformacionales e interacciones, se induce la autoactivación de la actividad proteasa de la caspasa-1 y el subsecuente procesamiento de las citoquinas pro-inflamatorias pro-IL1 β y pro-IL-18 a sus formas activas IL-1 β e IL-18, respectivamente (Dunne, 2011).

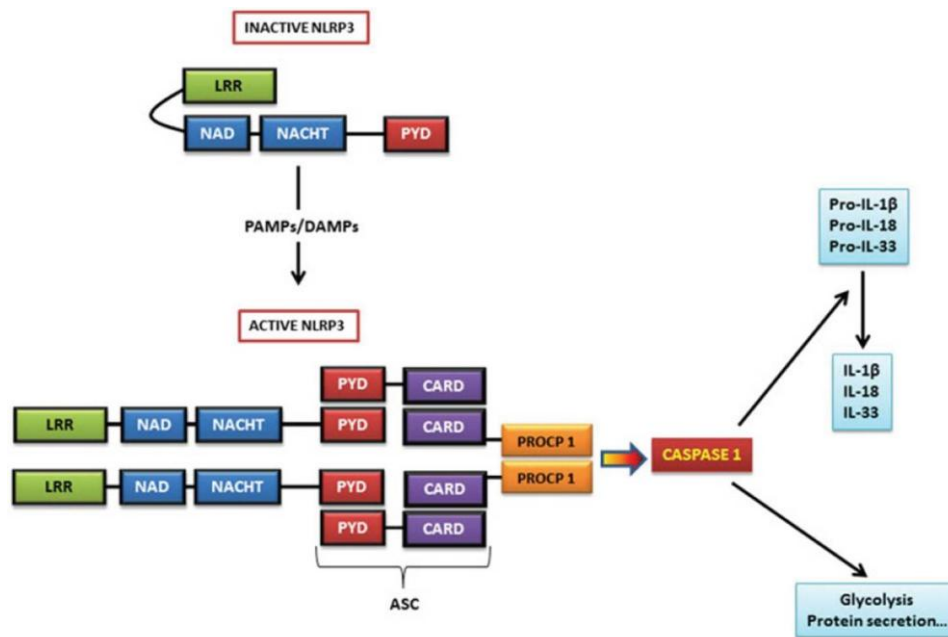


Figura 13. Representación esquemática del ensamblaje y activación de los componentes del inflamasoma NLRP3. En su forma inactiva NLRP3 se expresa constitutivamente en el citoplasma. El reconocimiento de una serie de PAMPs/DAMPs induce cambios conformacionales en NLRP3, reclutando ASC y pro-caspasa-1 al inflamasoma. En consecuencia, se activa la caspasa-1 y la maduración de citoquinas pro-inflamatorias (pro-IL-1β, pro-IL-18 y pro-IL-33) a sus formas activas (IL-1β, IL-18 e IL-33) (Escames et al., 2012)

Hoy en día, se aprecia que la activación del inflamasoma NLRP3 tiene lugar en respuesta a una amplia variedad de estímulos entre los que se incluyen productos bacterianos (muramil dipéptido, LPS o RNA bacteriano), toxinas bacterianas (nigericina, listeriolisina O, gramicidina), bacterias patógenas Gram-negativas y Gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, entre otras), virus y productos virales (virus influenza, adenovirus, RNA viral), patógenos fúngicos (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae*) o señales relacionadas con la existencia de daño en el organismo (cristales de sílica o de colesterol, hidróxido de aluminio, urato monosódico, placa β-amiloide, ATP extracelular, DNA citoplasmático o ROS) (Bauernfeind et al., 2011; Petrilli et al., 2007a). Debido a esta gran diversidad de estímulos, así como a su disparidad estructural, es poco probable que el receptor NLRP3 interactúe

directamente con todos y cada uno de ellos, siendo la opción más factible que, de acuerdo con la teoría del daño propuesta por Matzinger, NLRP3 detecte cambios en el medio celular desencadenados por un número limitado de vías comunes a todos los ligandos (Matzinger, 2002). En este sentido, se han propuesto diversos mecanismos que desencadenan la activación del inflamasoma NLRP3, si bien ninguno de ellos por sí sólo puede explicar la enorme variedad de estímulos mencionada con anterioridad (Figura 14).

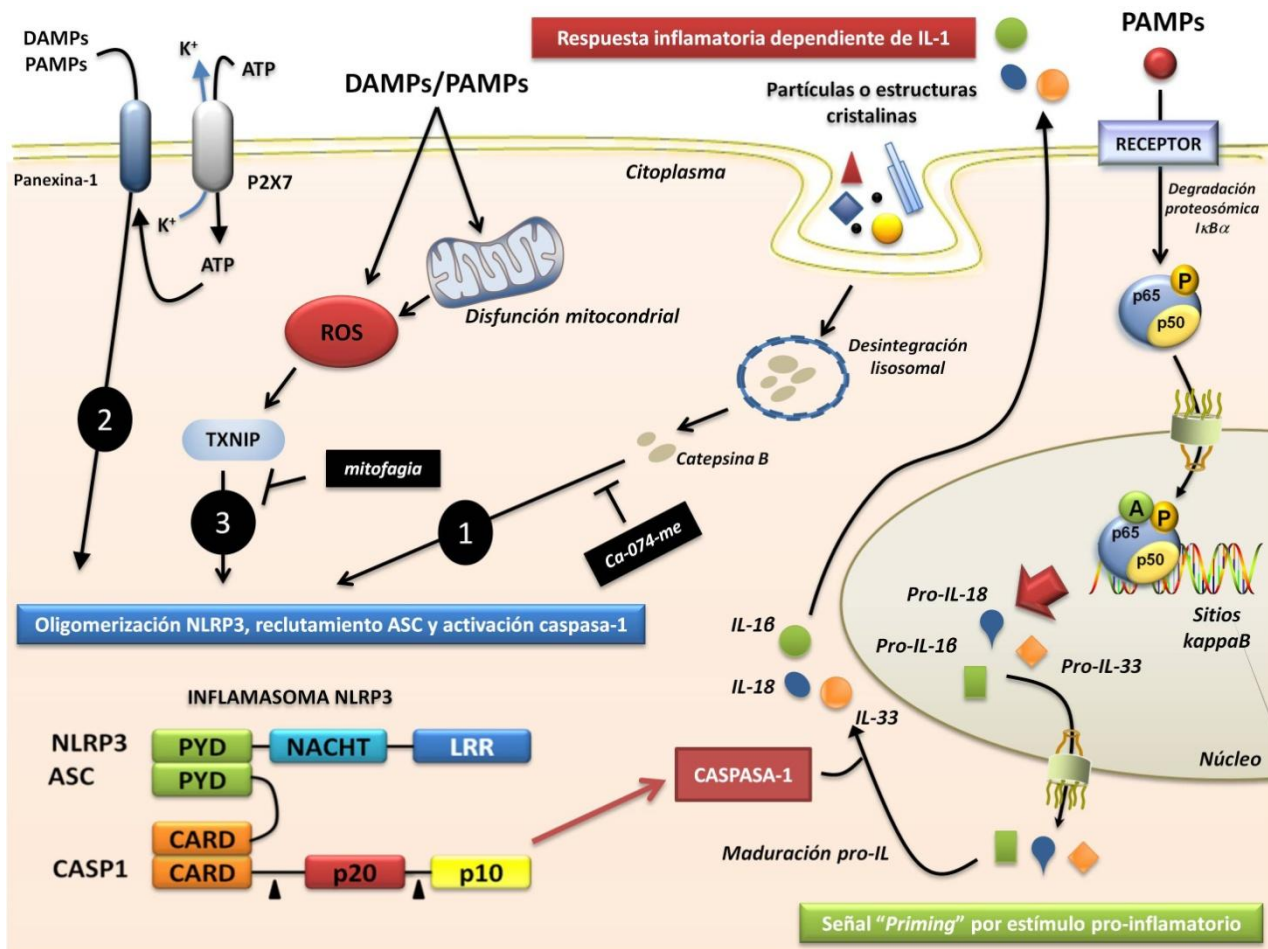


Figura 14. Modelos implicados en la activación del inflamasoma NLRP3. La liberación de IL-1 β , IL-18 e IL-33 requiere dos señales; la señal *priming* dependiente del reconocimiento de PAMPs/DAMPs mediado por TLR responsable de la formación de los precursores inactivos pro-IL-1 β , pro-IL-18 y pro-IL-33. La segunda señal implica la activación del inflamasoma mediada por la salida de potasio, generación de ROS y liberación del contenido lisosomal. Tras activarse, NLRP3 induce la maduración de los precursores inactivos a sus formas maduras, IL-1 β , IL-18 e IL-33.

Uno de los modelos iniciales sugiere que la activación del inflamasoma se produce en respuesta a la rápida salida de potasio ocasionada por todos y cada uno de los anteriores ligandos (Lamkanfi et al., 2009; Lightfield et al., 2008); este modelo es avalado no sólo por el hecho de que cantidades subfisiológicas de potasio inducen la activación espontánea del inflamasoma, lo que nos sugiere que éste puede detectar pequeños descensos en los niveles intracelulares de potasio (Petrilli et al., 2007b), sino también por la profunda inhibición del inflamasoma NLRP3 que se observa en respuesta al incremento en las concentraciones de potasio a nivel extracelular (Dostert et al., 2008a). Tal eflujo de potasio se produce a través de poros formados en la membrana por acción de determinadas toxinas bacterianas que alteran la integridad celular, o bien a través de receptores purinérgicos P2X7 en respuesta a ATP extracelular (Mariathasan et al., 2006). La presencia de ATP en esta localización está asociada a daño celular y necrosis, si bien puede asociarse igualmente a la acción de estímulos mecánicos sobre determinados tipos celulares, principalmente células endoteliales y epiteliales o a la liberación de ATP por parte de organelas secretoras que almacenan grandes cantidades en su interior (Martinon et al., 2009). Una vez en el exterior, el ATP induce la activación del receptor P2X7, un canal iónico regulado por ATP y que actúa conjuntamente con los hemicanales de panexina-1, los cuales tienen la habilidad para actuar a modo de canales específicos para la liberación de ATP. En consecuencia, no sólo se produce la formación de un poro a nivel de la membrana celular que facilita, en última instancia, la entrada citoplasmática de ligandos de NLRP3, sino que la liberación de ATP mediada por la panexina-1 amplifica la activación del inflamasoma dependiente del receptor P2X7 (Martinon et al., 2009).

Otro mecanismo propuesto para la activación del inflamasoma NLRP3 se basa en la desestabilización del lisosoma tras la fagocitosis de partículas o estructuras cristalinas, entre las que se incluyen partículas de sílica, cristales de urato monosódico o partículas beta-

amiloide; como consecuencia de esta desintegración lisosomal, su contenido se libera al citoplasma, evento que es percibido como una señal de daño endógeno por el sistema inmune (Dostert et al., 2008b; Hornung et al., 2008). En este modelo, la liberación al citosol de la catepsina B, una enzima proteolítica responsable de catalizar la hidrólisis de proteínas a polipéptidos, va a mostrar un papel clave en la producción de IL-1 β en respuesta a una amplia variedad de mediadores dependientes de procesos de fagocitosis, hecho que se evidencia por la supresión que ejerce el inhibidor de la actividad biológica de la catepsina B Ca-074-me sobre la activación del inflamasoma (Halle et al., 2008; Hornung et al., 2008). Sin embargo, macrófagos deficientes en catepsina B no muestran defectos significativos en la secreción de IL-1 β en comparación con los ratones *wild-type* en respuesta a aluminio y cristales de urato monosódico (Dostert et al., 2009), lo que sugiere la necesidad de realizar más estudios que aclaren el papel de la catepsina B en la activación del inflamasoma NLRP3.

Recientemente se ha observado que todos los activadores del inflamasoma NLRP3 inducen la producción de ROS, de forma que el uso de antioxidantes podrían inhibir de forma efectiva la activación del inflamasoma (Cruz et al., 2007; Escames et al., 2012). En este modelo de activación, la proteína tiorredoxina interactiva (TXNIP, del inglés *thioredoxin-interactive protein*) va a mostrar un papel esencial a la hora de asociar la producción de ROS con la activación del inflamasoma (Zhou et al., 2011). Así, en condiciones basales, TXNIP se encuentra asociada a la tiorredoxina oxidoreductasa, complejo que se disocia cuando aumentan los niveles de ROS intracelulares. Esta disociación muestra un doble efecto: mientras que la tiorredoxina libre puede desarrollar su función como depurador de ROS, TXNIP se asocia a NLRP3 de una forma ROS dependiente, induciendo en última instancia su activación. A pesar de que este efecto causativo de las ROS se conoce desde hace tiempo, no ha sido hasta hace relativamente poco cuando se ha demostrado la importancia de la mitocondria en la modulación de la inmunidad innata a través de la activación directa del

inflammasoma NLRP3. En este sentido, Zhou y colaboradores observaron que la producción de ROS asociada a la disfunción mitocondrial activa directamente al inflammasoma NLRP3 (Zhou et al., 2011), mientras que Nakahira y colaboradores demostraron que los procesos de mitofagia, encaminados a prevenir la acumulación de mitocondrias disfuncionales, constituyen importantes mecanismos inhibidores del inflammasoma NLRP3 (Nakahira et al., 2011). Asimismo, la asociación entre NLRP3 y mitocondria es sostenida por:

1. Localización subcelular de la organela durante los procesos inflamatorios; así, mientras que las proteínas NLRP3 y ASC inactivas se asocian con el retículo endoplasmático, la activación del inflammasoma induce su distribución perinuclear de forma conjunta con la mitocondria (Zhou et al., 2011).
2. La producción de ROS por la mitocondria inducen la apertura del poro de transición mitocondrial (MTP, del inglés *mitochondrial permeability transition pore*), con la consecuente liberación de DNA mitocondrial (mtDNA) detectado como una señal de daño y que, en definitiva, induce la activación del inflammasoma NLRP3 y la secreción de IL-1 β e IL-18 (Nakahira et al., 2011; Zhou et al., 2011). Interesantemente, la magnitud de activación de la caspasa-1 se relaciona de forma directa con la cantidad de mtDNA en el citosol, lo que sugiere su papel como coactivador de la caspasa-1.

3.2.1 INFLAMASOMA NLRP3 DURANTE LA SEPSIS: CONEXIÓN ENTRE LAS DOS VÍAS DE LA INMUNIDAD INNATA

La presencia de las dos señales necesarias para la activación del inflammasoma, es decir, la señal *priming* o preestimuladora y la señal específica del receptor NLR, se pone en evidencia de forma notable durante el proceso inflamatorio asociado a la sepsis (**Figura 15**).

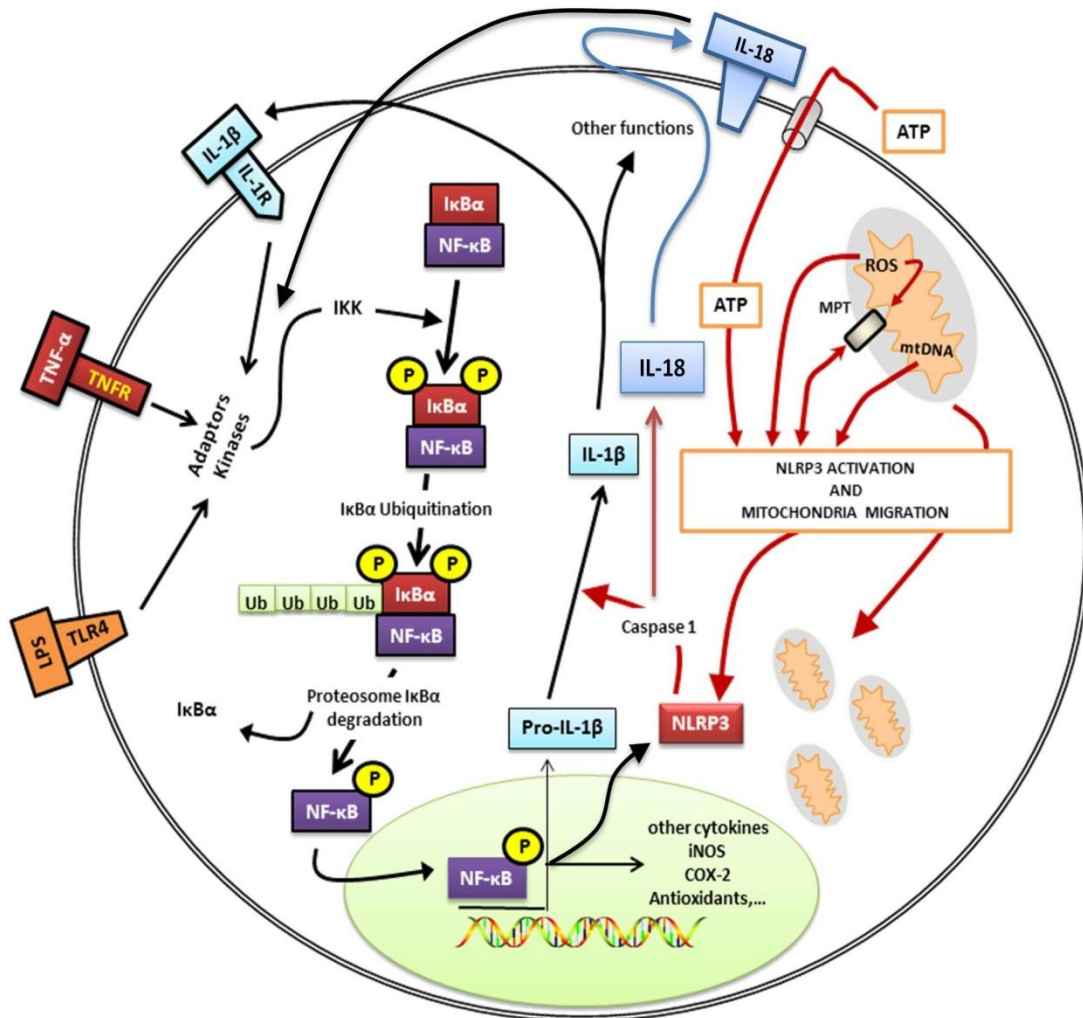


Figura 15. Cooperación entre NF-κB e inflammasoma NLRP3 en la respuesta inmune innata durante la sepsis. Ver texto para más detalles (Escames et al., 2012)

Como ya hemos comentado con anterioridad, la estimulación de los receptores TLR4 o receptores para el TNF (TNFR, del inglés *TNF receptors*) inducen la activación clásica de la vía dependiente de NF-κB; tras la liberación de su inhibidor, NF-κB se transloca al núcleo y

regula la expresión de numerosos genes relacionados con las respuestas inmune e inflamatoria puestas en marcha durante la sepsis, entre los que se incluyen tanto citoquinas de carácter pro-inflamatorio como pro-IL-1 β , pro-IL-18 y TNF- α así como enzimas pro-oxidantes como la iNOS y COX-2 (Zingarelli, 2005). Una vez activada, IL-1 β junto con TNF- α muestran la habilidad para inducir la vía de NF- κ B, creándose de esta forma un ciclo vicioso por el cual se incrementa la severidad y duración de la respuesta inflamatoria a pesar de la puesta en marcha de numerosos mecanismos inhibidores que tratan de ponerle freno.

De forma paralela, la condición inflamatoria se asocia con un estado celular hiperoxidativo dada la sobreproducción de ROS que escapa del control mediado por los diversos sistemas antioxidantes; esta sobreproducción de ROS no sólo es una consecuencia directa de la activación de los neutrófilos durante la respuesta inflamatoria (Janssen-Heininger et al., 2000), sino también del daño en la función mitocondrial asociado a la sepsis (Suliman et al., 2003; Suliman et al., 2005). Nuestro grupo de investigación ha demostrado ampliamente la disfunción mitocondrial durante la sepsis así como su relación directa con la mortalidad asociada con esta patología (Escames et al., 2003a; Escames et al., 2007a; Lopez et al., 2006b; Lopez et al., 2006a); en este sentido, junto con la generación de ROS debido al daño en los complejos respiratorios, la sepsis induce la actividad y expresión de la i-mtNOS, incrementando en consecuencia los niveles de NO a nivel mitocondrial que dañan, de forma irreversible, macromoléculas presentes en esta organela, incluido el mtDNA (Brown, 2001; Escames et al., 2003a; Escames et al., 2007a; Lopez et al., 2006b; Lopez et al., 2006a). En definitiva, todos estos eventos van a desencadenar un fallo profundo e irreversible en la cadena respiratoria y capacidad de fosforilación oxidativa que induce, consecuentemente, una grave depleción energética y muerte celular (Callahan and Supinski, 2005). Finalmente, la sepsis altera la estructura mitocondrial en diferentes tejidos, cambios estructurales como la hinchazón, interrupción de la de las crestas mitocondriales o elongación que reflejan la

apertura del poro MPT causado por la producción excesiva de ROS/RNS. En consecuencia, la liberación de ROS y mtDNA al citoplasma induce la activación del inflamasoma NLRP3, responsable no sólo de producir IL-1 β madura, con capacidad para activar y potenciar la vía de NF-kB, sino también facilitar la apertura del poro MPT, potenciando así su propia activación, y permitir la distribución perinuclear de las mitocondrias característica de numerosas patologías de carácter inflamatorio (Escames et al., 2012).

En definitiva, la cooperación que se establece entre las vías de NF-kB y NLRP3 durante la respuesta inflamatoria asociada a la sepsis puede ser uno de los principales motivos por los cuales las terapias anti-inflamatorias clásicas fallan a la hora de hacer frente a esta patología, ya que dichas terapias suelen dirigirse mayoritariamente a la inhibición de la vía dependiente de NF-kB. Por tanto, una terapia anti-inflamatoria efectiva debería incluir estrategias no sólo encaminadas a la inhibición de las vías NF-kB y NLRP3 de la inmunidad innata, sino prevenir igualmente la disfunción mitocondrial y producción de ROS/RNS asociados a todo proceso inflamatorio.

4. MELATONINA Y SU PAPEL TERAPÉUTICO EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA ASOCIADA A LA SEPSIS

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina (aMT) es una indolamina descrita inicialmente por McCord y Allen (McCord CO and Allen EP, 1917), y aislada por primera

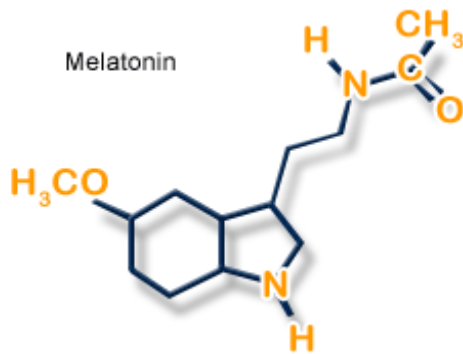


Figura 16: Estructura química de la melatonina

vez a partir de extractos de glándula pineal de vaca por Lerner en el año 1958 (Lerner AB et al., 1958). En 1959 se identificó la estructura química de esta indolamina, y se propuso el nombre de melatonina (Lerner AB et al., 1959). Desde un punto de vista químico, esta indolamina es un cristal orgánico, de color blanco, con un peso molecular de 232,38 Da,

cuyo punto de fusión se encuentra entre 116-118° C, poco soluble en agua y muy soluble en etanol (Szmuskowicz AW and Heinzelman RV, 1960).

La melatonina está muy conservada a lo largo de la evolución ya que se encuentra desde organismos muy primitivos como cianobacterias, algas unicelulares, y parásitos como *Trypanosoma cruzi*, hasta organismos actuales (Paredes et al., 2009; Hardeland, 2008; Hardeland and Poeggeler, 2003; Macias et al., 1999). Asimismo, esta indolamina se distribuye ubicuamente a través de todo el organismo, ya que su naturaleza anfipática le permite atravesar todas las barreras celulares. En base a ambas características, se cree que su aparición podría ser consecuencia de una adaptación de los organismos para utilizar el oxígeno, dada la habilidad mostrada por la melatonina a la hora de neutralizar el efecto dañino que ejerce este gas sobre las diferentes estructuras celulares mediante la producción de radicales libres.

Aunque en un principio se encuadró a la melatonina exclusivamente como un elemento regulador en la fisiología circadiana y reproducción, estudios posteriores permitieron relacionarla con aspectos de la fisiología intracelular independientes de su acción hormonal. Así, se demostró que la melatonina es un potente depurador de radicales libres (Tan et al., 1999), identificándose y caracterizándose receptores nucleares para la melatonina en órganos periféricos (Acuña-Castroviejo et al., 1994) y células del sistema nervioso central (Becker-André et al., 1994; Carlberg et al., 1994) . Asimismo, se demostró la capacidad de la melatonina para unirse a proteínas citosólicas como la proteína quinasa C (PKC) (Benítez-King et al., 1996), la calmodulina (CaM) (León et al., 2000) y la calreticulina (Macías et al., 2003), permitiendo esta interacción modular las acciones intracelulares del calcio. Por último, diversos trabajos han demostrado el importante papel que la melatonina tiene en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial (Acuña-Castroviejo et al., 2001; Acuña-Castroviejo et al., 2011; Leon et al., 2004; Leon et al., 2005; Martín et al., 2000)

4.1 SÍNTESIS DE LA MELATONINA

En mamíferos, el primer lugar donde se descubrió la síntesis de melatonina fue en la glándula pineal, conectada con el núcleo supraquiasmático, la cual poseía todos los enzimas necesarios para su síntesis a partir de la serotonina, y su actividad bioquímica se veía afectada por los ciclos luz-oscuridad (Arendt, 1995). Por tanto, la síntesis de melatonina a nivel de la glándula pineal funciona como un mensaje codificado de la duración de la oscuridad responsable, en definitiva, de las concentraciones picomolar/nanomolar de la indolamina en plasma (Erren et al., 2003; Reiter, 1991).

A nivel pineal, la melatonina se sintetiza a partir del triptófano, aminoácido captado del torrente circulatorio por parte del pinealocito a través de un mecanismo de transporte activo bajo control adrenérgico (Alonso R, 1999). Este triptófano se transforma, en primer

lugar, en 5-hidroxitriptamina o serotonina al sufrir un proceso de hidroxilación y posterior descarboxilación mediados por la L-triptófano hidroxilasa (TPH) y la 5- hidroxitriptófano descarboxilasa, respectivamente. Una vez sintetizada, la serotonina puede sufrir una desaminación por acción de la monoamino oxidasa (MAO) o una acetilación por acción de la arilquilamina N-acetiltransferasa (AANAT), originándose en consecuencia la N-acetil-5-hidroxitriptamina o N-acetil-serotonina (NAS). Finalmente, la NAS sufre una metilación mediada por la N-acetilserotonina O-metiltransferasa (ASMT) produciendo la molécula de melatonina (**Figura 17**). Si bien inicialmente se identificó a la AANAT como la enzima limitante de todo este proceso, al exhibir el mismo ritmo circadiano que la melatonina e inhibirse igualmente su actividad con la luz, estudios recientes demuestran que la síntesis de melatonina no se ve afectada tanto por una notable disminución o incremento mantenido en la actividad de la AANAT, lo que pone de manifiesto que la enzima limitante de la biosíntesis de esta hormona podría ser la ASMT (Liu and Borjigin, 2005).

Además de esta síntesis pineal, se ha comprobado recientemente que la capacidad de síntesis de melatonina se extiende a la mayor parte, sino todos, los órganos y tejidos del organismo, entre los que se incluyen retina, riñón, piel, glándula harderiana, hígado, timo, tiroides, páncreas, cerebelo, mucosa del intestino, epitelio respiratorio, ovarios, placenta, endometrio, hígado, cerebro, corazón, así como células no endocrinas tales como eosinófilos, plaquetas, células endoteliales y células natural killer (Kvetnoy et al., 2002; Acuña-Castroviejo et al., 2014). Asimismo, los niveles de melatonina pueden variar en el interior de los orgánulos subcelulares, describiéndose que la concentración de esta indolamina en núcleo y mitocondria pueden ser significativamente mayores que en plasma (Venegas et al., 2012). A diferencia de la melatonina pineal, la cual se libera rápidamente al sistema vascular para acceder a todos los tejidos, compartimentos celulares y fluidos, la melatonina extrapineal o producida en los tejidos permanece en el interior celular y no sale a la

circulación, lo que sugiere que su acción biológica debe ser diferente a la de origen pineal (Venegas et al., 2012; Acuña-Castroviejo et al., 2014)

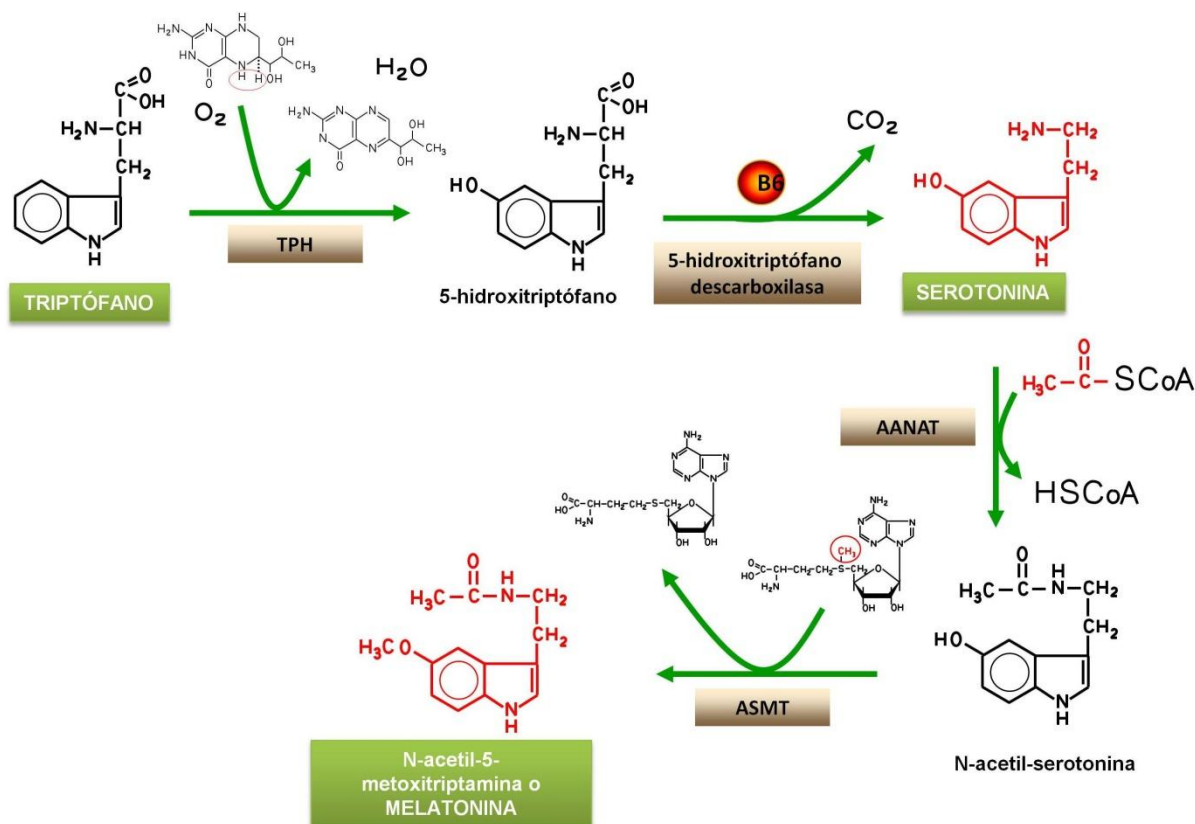


Figura 17. Síntesis de la melatonina a partir del triptófano en la glándula pineal. TPH, L-triptófano hidroxilasa; AANAT, arilquilamina N-acetiltransferasa; ASMT, N-acetilserotonina O-metiltransferasa

4.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MELATONINA

La naturaleza altamente lipofílica de la melatonina, gracias a la cual es capaz de atravesar membranas celulares, así como el descubrimiento en los últimos años de diferentes dianas celulares, sugiere que sus acciones fisiológicas van a estar mediadas por una variedad de mecanismos de acción, entre los que se incluyen: 1) unión a receptores de membrana; 2) unión a receptores nucleares; 3) interacción con proteínas citosólicas; 4) antioxidante de acción directa e indirecta; e 5) interacción con la mitocondrial (**Figura 18**) (Acuña-Castroviejo et al., 2007).

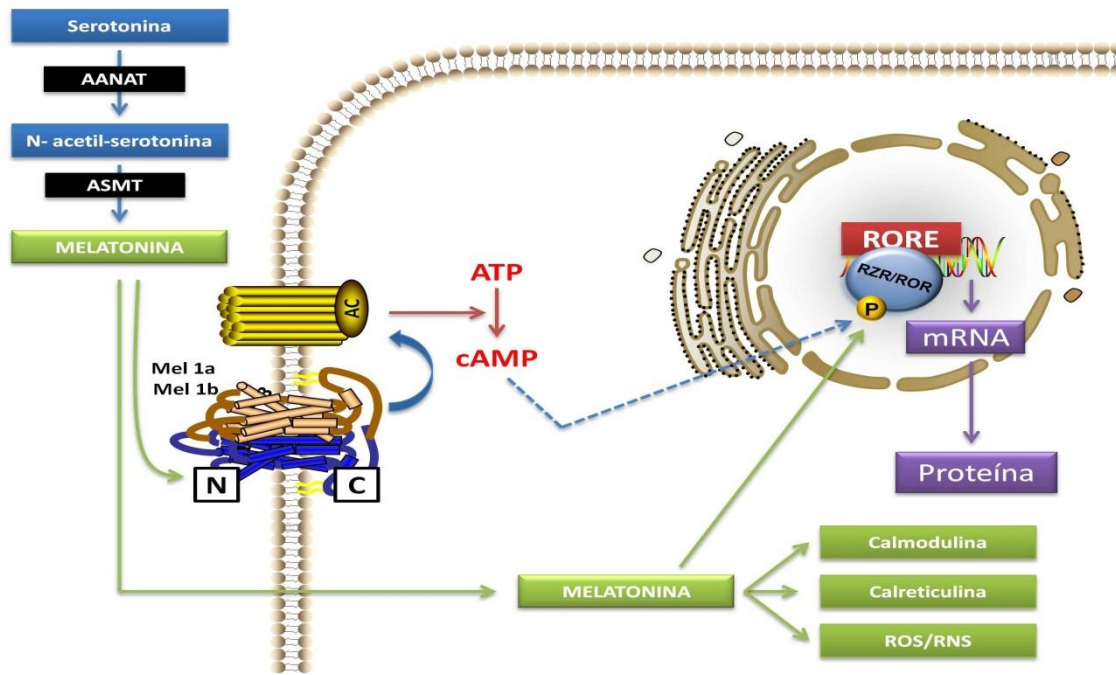


Figura 18. Mecanismos de acción de la melatonina. La melatonina puede actuar a través de la interacción con receptores de membrana y nucleares, mostrando en algunos casos un efecto cooperativo. Además, la melatonina ejerce funciones no mediadas por receptor al interactuar directamente con algunas proteínas citosólicas como el complejo calcio-calmodulina y calreticulina. Por último, puede depurar directa o indirectamente ROS/RNS.

4.2.1 UNIÓN A RECEPTORES DE MEMBRANA

A nivel de la membrana han sido identificados y caracterizados dos receptores acoplados a proteínas G, denominados como MT1 (Mel 1a) y MT2 (Mel 1b); a pesar de compartir un grado de homología del 60% en su secuencia de aminoácidos, las diferencias entre ambos receptores son notables (Reppert et al., 1995):

- Si bien ambos definidos como receptores de alta afinidad para la melatonina, el receptor MT2 presenta una menor afinidad ($K_d = 160$ pmoles/L) para el radioligando ^{125}I -melatonina en comparación con la mostrada por MT1 ($K_d = 20\text{-}40$ pmoles/L)

(Ebisawa et al., 1994; Dubocovich and Takahashi, 1987; Krause and Dubocovich, 1991; Reppert et al., 1994).

- Se expresan por separado o conjuntamente en varios tejidos del cuerpo, pero la distribución de MT2 parece estar más limitada al cerebro. No obstante, la expresión de estos receptores depende de varios factores, como la especie, el tejido, la luz ambiental, el estado endocrino y el estado del desarrollo en que se encuentre el individuo (Vanecek, 1998).
- El reconocimiento de la melatonina por cada uno de estos receptores causa distintos efectos: mientras que MT1 está asociado a proteínas G que median la inactivación de la adenilato ciclasa y activación de la fosfolipasa C β , MT2 adicionalmente inhibe la vía de la guanilato ciclasa soluble (von et al., 2002).

Recientemente, esta familia de receptores de membrana ha sido ampliada con el descubrimiento del receptor MT3 en hámster pero no en humanos (Nosjean et al., 2001), caracterizándose posteriormente como una quinona reductasa 2, con un papel clave en la protección contra el estrés oxidativo al evitar las reacciones de transferencia de electrones entre las quinonas (Nosjean et al., 2000); a pesar del poco conocimiento que se tiene hoy en día de su funcionamiento, ha sido identificado en una gran variedad de órganos incluidos hígado, riñón, cerebro, corazón, pulmón, intestino, músculo, tejido adiposo pardo y ojo, aunque en este último caso sólo se disponen de evidencias farmacológicas (Pintor et al., 2003).

Finalmente, debemos tener en cuenta que los mecanismos que regulan la expresión los receptores de membrana son muy complejos, por lo que no es sorprendente que las respuestas mediadas por la melatonina sean dependientes de la fase del ritmo

circadiano, duración de la exposición, presencia de melatonina endógena y sensibilidad funcional del receptor. Asimismo, es importante conocer donde se localizan estos receptores y qué funciones ejerce la melatonina a través de ellos, ya que nos permitirá la posibilidad de establecer terapias contra diversas patologías en las que se encuentran implicados.

4.2.2 UNIÓN A RECEPTORES NUCLEARES

El primer indicio de una posible interacción de la melatonina con el material nuclear se obtuvo al encontrarse una elevada concentración de la hormona asociada a la cromatina (Withyachumnarnkul et al., 1986). Posteriormente Menéndez-Peláez y cols (1993) demostraron la presencia de melatonina en el núcleo y, mediante el uso de ¹²⁵I-iodomelatonina, Acuña-Castroviejo y cols demostraron su unión específica a la fracción proteica del núcleo de hígado de rata (Acuña-Castroviejo et al., 1993; Acuña-Castroviejo et al., 1994), lo que sugería la existencia de receptores nucleares para la melatonina.

En 1994 Becker-Andre y cols (Becker-Andre et al., 1994) demostraron una acción genómica de la melatonina a través de los receptores nucleares ROR α , una subfamilia de receptores nucleares o factores de transcripción dependientes de ligando que proporcionan a los organismos la capacidad para controlar la expresión génica en respuesta a un amplio rango de factores ambientales, fisiológicos y de desarrollo. No obstante, y a pesar de las numerosas publicaciones que avalan este punto de vista, existe cierta controversia actual sobre si los factores de transcripción ROR son verdaderos receptores nucleares de melatonina (Carrillo-Vico et al., 2005; Lardone et al., 2011).

La familia de receptores ROR/RZR (del inglés *retinoid-related orphan receptor/retinoid Z receptor*) se divide en tres subtipos, ROR α (Becker-Andre et al., 1993; Giguere et al., 1994;

Giguere et al., 1995), ROR β (Andre et al., 1998a; Carlberg et al., 1994) and ROR γ (He et al., 1998; Hirose et al., 1994), localizados en los cromosomas 15q22.2, 9q21.13 y 1q21.3 respectivamente (Jetten, 2009). Cada gen posee varias isoformas debido a diferentes variantes de splicing, que se diferencian solo en su extremo amino terminal (Andre et al., 1998a; Giguere et al., 1994; Hamilton et al., 1996). En humanos se han encontrado 4 isoformas de ROR α (ROR α 1-4), mientras que en ratón solo se han descrito las isoformas 1 y 4. De las dos isoformas que genera ROR β , en humanos sólo se expresa la 1 (Andre et al., 1998a) y en ambas especies se expresan las dos isoformas generadas por ROR γ (Hirose et al., 1994; He et al., 1998; Medvedev et al., 1996). Cada una de estas isoformas muestran una expresión específica de tejido y están implicadas en la regulación de diferentes procesos fisiológicos. ROR α se expresa en prácticamente en todos los tejidos periféricos, como en tejido adiposo, piel, testículos, cartílago e hígado (Smirnov, 2001), ROR β en cerebro y retina (Andre et al., 1998b) y ROR γ en tejido adiposo, musculo esquelético, hígado, riñón y sistema inmune (Smirnov, 2001; Hirose et al., 1994; He et al., 1998).

Independientemente de esta expresión específica en función del tejido, los diferentes miembros de esta subfamilia van a presentar una estructura modular constituida en base a 5-6 dominios aminoacídicos diferenciados, dos de los cuales están altamente conservados desde el punto de vista funcional en todos los miembros de la familia: el dominio de unión al DNA (DBD, del inglés *DNA-binding domain*) y el dominio de unión a ligando (LBD, del inglés *ligand binding domain*) (Evans, 1988; Giguere, 1999; Moras and Gronemeyer, 1998; Jetten et al., 2001) (**Figura 19**). El dominio **DBD** está constituido por dos dedos de zinc que permiten la unión específica de monómeros de ROR al DNA, reconocimiento y unión que tiene lugar gracias a la existencia de un elemento de respuesta de ROR (RORE), el cual es una secuencia consenso (AGGTCA) precedida de una secuencia de 6 pares de bases rica en AT (Andre et

al., 1998b; Carlberg et al., 1994; Giguere et al., 1994; Jetten et al., 2001). El dominio **LBD**, mucho menos conservado que el anteriormente descrito, se sitúa en el extremo C-terminal y presenta una secuencia de función de activación (AF-2) responsable de la actividad transcripcional del receptor nuclear una vez que se ha unido a su ligando (Smirnov, 2001; Jetten, 2009). Entre ambos dominios se encuentra la denominada **región bisagra** encargada de dar flexibilidad a la proteína. Asimismo, en la región N-terminal de la proteína, se localiza la **región A/B**, dominio no conservado entre los diferentes miembros de la superfamilia de los receptores nucleares y cuya principal función es la de conferir capacidad transcripcional a la proteína de forma independiente a su unión al ligando gracias a la existencia de una secuencia de función de activación AF-1 (Smirnov, 2001; Jetten, 2009).

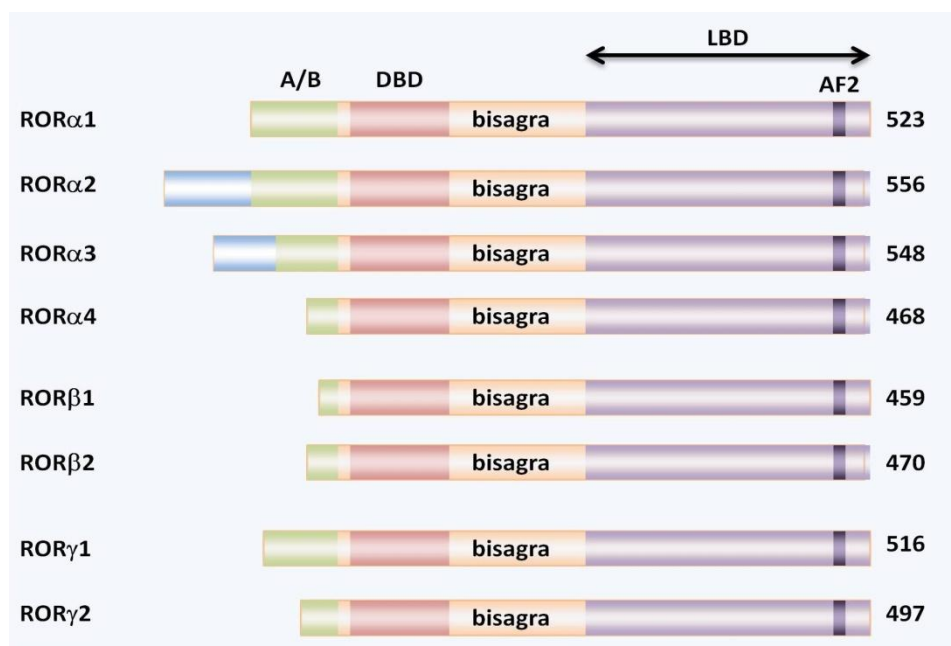


Figura 19. Estructura modular de los miembros de la subfamilia ROR/RZR. DBD, dominio de unión al DNA; LBD, dominio de unión al ligando; AF2, secuencia de función de activación 2. Los números indicados a la derecha representan el número total de aminoácidos de cada miembro.

Una vez unido al DNA a través de su elemento de respuesta, ROR va a mediar la regulación de numerosos procesos biológicos, entre los que se incluyen el desarrollo embrionario, los ritmos circadianos, procesos de diferenciación y proliferación celular,

repuesta del sistema inmune y metabolismo celular. En estas funciones, y especialmente en la regulación del ritmo circadiano, la competencia que establece ROR con Rev-ErbA α , también denominado NR1D1 (del inglés *Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1*), por la unión a RORE va a presentar un papel clave (Giguere et al., 1995; Burris, 2008); en este sentido, la unión de ROR a RORE induce la expresión de los activadores heterodiméricos *bmal1* (o *arntl*, del inglés *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like*) y *clock* (del inglés *circadian locomotor output cycles kaput*), los cuales permiten la expresión de *per* (del inglés *period*) y *cry* (del inglés *cryptochrome*). Los heterodímeros constituidos por estos dos últimos genes interaccionan con Bmal1 y clock, regulando de forma negativa su actividad transcripcional. Asimismo, Bmal1 y clock son capaces de activar a Rev-ErbA α , reprimiendo en consecuencia la transcripción de todos aquellos genes sometidos al control de ROR (Akashi and Takumi, 2005; Albrecht, 2002; Gachon et al., 2004; Nakajima et al., 2004). Recientemente, la deacetilasa dependiente de NAD⁺ sirtuina 1 (Sirt1, del inglés *silent mating type information regulation 2 homolog 1*) ha adquirido gran importancia en la regulación del ritmo circadiano en cooperación con ROR (Feige and Auwerx, 2008). La actividad deacetilasa de la Sirt1 conlleva el consumo de NAD⁺, produciéndose en consecuencia la formación de nicotinamida que será reciclada a través de dos reacciones enzimáticas catalizadas por la enzima limitante nicotinamida fosforibosil transferasa (NAMPT, del inglés *nicotinamide phosphoribosyltransferase*) y la nicotinamida mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT, del inglés *nicotinamide mononucleotide adenyltransferase*), con la formación del intermediario nicotinamida mononucleótido (NMN, del inglés *nicotinamide mononucleotide*). Además, la Sirt1 muestra la habilidad de regular su propia actividad dado que induce la expresión de *nampt* gracias a su interacción con Clock y Bmal1, hecho que implica que la enzima NAMPT va a estar sometida a un importante control circadiano (Feige and Auwerx, 2008; Galli et al., 2011). Diversos estudios proponen, igualmente, que la Sirt1 puede degradar a la proteína Per

y facilitar así la expresión de *bmal1* y *clock*, función que extiende más allá de la expresión circadiana de *nampt* la interacción entre *Sirt1* y el ritmo circadiano.

Finalmente, es necesario destacar la participación de $ROR\alpha$ en la regulación de la respuesta inmune; en este sentido, Steinhilber y cols. observaron que la actividad transcripcional de $ROR\alpha$ se relaciona con la inhibición de la enzima 5-lipooxigenasa, la cual participa en el proceso de biosíntesis de leucotrienos proinflamatorios en los linfocitos B humanos (Steinhilber et al., 1995). Asimismo, Delerive y cols. demostraron el papel de $ROR\alpha1$ como regulador negativo de la respuesta inflamatoria al causar una profunda inhibición de la expresión de mediadores pro-inflamatorios como IL-6, IL-8 y COX-2, efecto inhibitorio que se debe a la presencia de elementos de respuesta a $ROR\alpha$ en el promotor del gen *ikba*, lo que le permite interferir negativamente en las vías de señalización dependientes de NF- κ B (Delerive et al., 2001). Posteriormente, Stapleton y cols. confirmaron estas propiedades al observar que los ratones mutantes naturales para $ROR\alpha$ presentaban un mayor grado de reacción inflamatoria inducida por LPS, en términos de niveles de neutrófilos y expresión de mediadores pro-inflamatorios, en comparación con los ratones wild-type, si bien este hecho no estaba relacionado con una represión o falta de inducción de la expresión de *ikba* en los ratones mutantes (Stapleton et al., 2005). Además, estas propiedades anti-inflamatorias de $ROR\alpha$ nos pueden sugerir otra vía de conexión entre el factor de transcripción y la deacetilasa *Sirt1* ya que ésta es capaz de deacetilar residuos de lisina en posición 310 de NF- κ B, reprimiendo así su actividad transcripcional (Yeung et al., 2004).

4.2.3 UNIÓN A PROTEÍNAS CITOSÓLICAS

La melatonina puede interactuar con proteínas citosólicas como: a) la calmodulina, modulando la actividad de la enzima fosfodiesterasa (Benitez-King and Anton-Tay, 1993), CaM quinasa II (Benitez-King et al., 1996) o de la óxido nítrico sintasa neural (nNOS) (Hardeland, 1997; Bettahi et al., 1996; Leon et al., 2000); b) calreticulina (Macias et al., 2003); c) tubulina (Cardinali and Freire, 1975); y d) proteína quinasa C (PKC) (Benitez-King et al., 1996). La interacción de la melatonina con estas proteínas la confiere la habilidad para participar en el metabolismo del calcio así como en la modulación de la estructura del citoesqueleto (Benitez-King and Anton-Tay, 1993; Benitez-King, 2006).

4.2.4 ANTIOXIDANTE DE ACCIÓN DIRECTA E INDIRECTA

La melatonina, así como algunos de sus metabolitos como la N1-acetil-5-metoxikinuramina (AMK) y la N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinuramina (AFMK), van a ser capaces de depurar directamente ROS/RNS (Acuña-Castroviejo et al., 2001; Leon et al., 2004; Reiter et al., 2003a). Al ser una molécula rica en electrones, la indolamina puede ceder uno de ellos al grupo hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) (Tan et al., 2000a), originando un radical indolil; éste, a su vez, puede volver a depurar otro $\text{OH}\cdot$; transformándose, en consecuencia, en 3-hidroxi-melatonina cíclica, o bien depurar un radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y originar el metabolito activo AFMK (Hardeland et al., 1993; Poeggeler et al., 1994). Independientemente de la ruta seleccionada, tanto la 3-hidroxi-melatonina cíclica como el AFMK muestran una alta capacidad antioxidante, aumentando por tanto el valor de la melatonina como potente depurador de radicales libres (Acuña-Castroviejo et al., 2001; Reiter et al., 2003b).

Asimismo, la melatonina es capaz de reaccionar con otros radicales de oxígeno, como el oxígeno singlete (Cagnoli et al., 1995), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Tan et al., 2000a) y el $\text{O}_2^{\cdot-}$, si bien este último hecho aún está por confirmar, especialmente *in vivo*, ya que la

reacción por la cual la melatonina ejercería esta acción no es conocida (Acuna-Castroviejo et al., 2007; Leon et al., 2004; Reiter et al., 2003b). Por otro lado, la melatonina también puede depurar radicales de nitrógeno como los peroxinitritos (ONNO⁻) (Zhang et al., 1999) o radicales peróxido (LOO[·]), interfiriendo así en la propagación de la peroxidación lipídica. No obstante, este hecho podría deberse más a la acción depuradora que ejerce sobre todas aquellas especies reactivas que puedan provocar peroxidación lipídica más que a la depuración en sí de LOO[·].

Junto con esta capacidad intrínseca para depurar radicales libres, la melatonina posee la habilidad para estimular la actividad y expresión de otros sistemas antioxidantes, estableciendo así una forma de acción indirecta para reducir el estrés oxidativo (Antolin et al., 2002; Mayo et al., 2002). En primer lugar, la melatonina estimula el ciclo del glutati6n (GSH), aumentando la actividad de la glutati6n peroxidasa (GPx) y reductasa (GRd) (Escames et al., 2006; Escames et al., 2007a; Mart6n et al., 2000; Ortiz et al., 2014), regulando así el balance glutati6n oxidado (GSSG)/glutati6n reducido (GSH). Adem6s, la melatonina aumenta la producci6n de GSH estimulando la γ -glutamylcisteina sintasa, enzima limitante en la ruta de bios6ntesis de este compuesto (Urata et al., 1999), y la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), la cual genera el NADPH requerido por la GRd (Pierrefiche y Laborit, 1995). En el mismo sentido, se ha descrito el efecto de la melatonina sobre otras enzimas antioxidantes como la super6xido dismutasa (SOD) y catalasa (Acuna-Castroviejo et al., 2007; Leon et al., 2004; Reiter et al., 2003b).

En definitiva, ya sea por acci6n directa y/o indirecta, la melatonina es un potente antioxidante con importantes propiedades para regular el estado redox celular, especialmente a nivel de la mitocondria al ser 6sta la principal fuente de ROS/RNS, y proteger, en consecuencia, macromol6culas como el DNA, l6pidos y prote6nas del da6o

oxidativo. Asimismo, y dadas las características del grupo N-acetil presente en la melatonina, ésta va a aumentar la eficacia de otros antioxidantes naturales, mostrando una acción sinérgica con las vitaminas C y E (Reiter et al., 2003b).

4.2.5 ACCIONES SOBRE LA FISIOLÓGÍA MITOCONDRIAL

Debido a su carácter lipofílico e hidrofílico, la melatonina puede atravesar las membranas celulares y subcelulares con cierta facilidad, concentrándose en los distintos compartimentos, incluida la mitocondria, a unas altas concentraciones (Venegas et al., 2012). Ya que, como hemos mencionado, la mitocondria es la principal fuente de ROS en las células eucariotas, parece razonable pensar que la acumulación de melatonina a este nivel se debe a la mera protección frente a los radicales libres; no obstante, la influencia de la melatonina en la homeostasis de la mitocondria no se limita a su poder antioxidante dentro de ella, sino que también interactúa directamente con la cadena de transporte electrónico, incrementando la actividad de los complejos respiratorios tanto en mitocondrias sanas (López et al., 2009) como especialmente en mitocondrias previamente dañadas (Doerrier et al., 2015; Escames et al., 2003b; Escames et al., 2006; Escames et al., 2007b; Martín et al., 2000; Ortiz et al., 2014). Teniendo en cuenta el alto potencial redox que posee la melatonina (0,94 V) (Tan et al., 2000b), podríamos pensar que esta indolamina no sólo estimula la actividad de los complejos, sino que también podría ser capaz de donar electrones por sí misma aumentando el flujo electrónico.

Asimismo, la melatonina muestra otros múltiples efectos sobre la fisiología mitocondrial, entre los que podemos destacar el aumento de la biogénesis mitocondrial tras su administración crónica (Decker and Quay, 1982), estabilización de la membrana mitocondrial interna (García et al., 1999), aumento en la producción de ATP (López et al., 2006a), prevención de los procesos de apoptosis al modular la homeostasis del calcio y el

potencial de membrana mitocondrial (Sourdeval et al., 2006) e inhibir el poro de transición mitocondrial (Andrabi et al., 2004). Estas acciones, y de forma conjunta a las propiedades antioxidantes de la melatonina, hace que muestre una gran importancia desde el punto de vista terapéutico en todas aquellas patologías donde la función mitocondrial se vea agravada de tal forma que atente contra la supervivencia de la célula.

4.3 PAPEL TERAPÉUTICO DE LA MELATONINA EN LA SEPSIS

Según la fisiopatología de la sepsis, llevando al enfermo a una situación grave de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial severa, así como las propiedades y acciones de la melatonina mencionadas con anterioridad, parece obvio que la administración farmacológica de la indolamina podría tener efectos beneficiosos en el estado séptico. Asimismo, la relación entre sepsis y melatonina se afianza no sólo al observarse una profunda alteración en la secreción circadiana de melatonina en los pacientes con sepsis severa (Mundigler et al., 2002; Verceles et al., 2012), sino también por la clara correlación negativa que se establece entre la severidad de la patología y los niveles séricos de la melatonina registrados a las 02:00 am, momento donde tiene lugar su producción fisiológica máxima (Perras et al., 2006). En ambos casos, la desincronización del ritmo circadiano de la melatonina es una consecuencia directa de la respuesta inflamatoria asociada a la sepsis al dañar ésta tanto la síntesis del precursor para la síntesis de la melatonina como la expresión de las principales enzimas implicadas en su ruta biosintética (da et al., 2012; Tsai et al., 2001).

Crespo y colbs. muestran que la administración de melatonina a ratas con sepsis inducida por lipopolisacárido (LPS) reduce la expresión de la iNOS de una forma dosis-dependiente, recuperando al animal del fallo multiorgánico (Crespo et al., 1999). En este mismo modelo experimental, Wu y colbs. demostraron que la administración de melatonina prevenía igualmente el fallo circulatorio, reducía la infiltración de neutrófilos

polimorfonucleares asociada al proceso inflamatorio y mejoraba la supervivencia (Andrabi et al., 2004; Wu et al., 2001). Estos efectos beneficiosos de la melatonina se asociaron a su acción sobre la expresión de la iNOS y a una menor producción de anión superóxido. Poco después, Di Villa Bianca y colbs. muestran que la melatonina previene el daño endotelial y vascular en ratas con sepsis inducida por LPS, efecto que se relacionó con las propiedades antioxidantes de la indolamina así como, nuevamente, con su capacidad para inhibir la expresión de la iNOS (d'Emmanuele, V et al., 2004).

A nivel mitocondrial, Escames y colbs. detectan que la melatonina reduce la expresión y actividad de la isoforma mitocondrial de la iNOS, y en consecuencia los niveles intramitocondriales de nitritos, recuperando la actividad de los complejos respiratorios I y IV incluso por encima de los niveles basales en hígado y pulmón de ratas con sepsis inducida por inyección de LPS (Escames et al., 2003).

Dado estos efectos beneficiosos de la melatonina, su administración terapéutica provoca una clara reducción en la mortalidad asociada a la sepsis, si bien los valores de supervivencia registrados difieren de unos estudios a otros, probablemente por las diferentes dosis de melatonina usadas. En este sentido, se ha encontrado un aumento de la supervivencia del 28% con la administración de melatonina (dos dosis de 10 mg/kg en dos días) tras inducir sepsis por ligadura y punción ileocecal en ratones (Wichmann et al., 1996). Del 48% y 86% en ratas tratadas con melatonina (2 mg/kg) 3 y 6 horas después de la inyección de LPS, respectivamente (Maestroni, 1996); del 40% en ratones a los que se administró melatonina (5 mg/kg) después de la inyección de LPS (Wu et al., 2001); y del 73% en ratas con sepsis inducida con zimosán A a las que se le administró melatonina a una dosis de 0,8 mg/kg cada uno de los 10 días que duró el experimento (Reynolds et al., 2003). En nuestro grupo de investigación, hemos observado que la vida media de los ratones con

sepsis aumentó un 132% y su supervivencia un 154% tras tratarlos con melatonina (Escames et al., 2007).

Con toda esta evidencia experimental en animales, se realizó el primer estudio en humanos con la administración oral de melatonina en niños neonatos con sepsis (Gitto et al., 2001). La melatonina (dos dosis de 10 mg/kg separadas por un intervalo de una hora) fue administrada vía oral dentro de las 12 horas posteriores al diagnóstico de la enfermedad. En estos pacientes, la melatonina redujo el estrés oxidativo asociado al proceso séptico, mejorando asimismo parámetros serológicos relacionados con el proceso inflamatorio como la cantidad de glóbulos blancos y neutrófilos, plaquetas y niveles de proteína reactiva C, los cuales se mantuvieron altos en aquellos pacientes sépticos no tratados. Lo más importante desde un punto de vista clínico es que los 10 pacientes tratados con melatonina sobrevivieron, en contraste con el fallecimiento de 3 de los 10 pacientes a los que no se les administró melatonina.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Estudios preliminares han demostrado la implicación de la vía de señalización de NF- κ B en la fisiopatología de la sepsis al modular la expresión de cientos de genes importantes para las respuestas inmunológicas e inflamatorias, incluidos citoquinas y enzimas de carácter pro-inflamatorio, quimioquinas y moléculas de adhesión. Asimismo, estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación ponen de manifiesto que la condición inflamatoria se asocia a un importante daño mitocondrial causado por el aumento en la actividad y expresión de la i-mtNOS, generación de ROS/RNS y fallo en la cadena de transporte de electrones. Actualmente, se sabe que esta disfunción mitocondrial conlleva la inducción del inflamasoma NLPR3, el cual regula la maduración y consecuente activación de las citoquinas pro-inflamatorias IL1- β , IL-18 e IL-33.

Por otro lado, los ratones mutantes para ROR α , un factor de transcripción dependiente de la melatonina como ligando, muestran una mayor sensibilidad a la reacción inflamatoria asociada a la sepsis, si bien no se sabe el mecanismo exacto por el cual ROR α muestra su efecto anti-inflamatorio.

La melatonina previene la disfunción mitocondrial y el fallo multiorgánico en la sepsis, fundamentalmente a través de dos procesos: inhibición de la expresión de la iNOS y recuperación del estado redox mitocondrial, mediante la depuración directa e indirecta de radicales libres. No obstante, el o los mecanismos moleculares de estos efectos de la melatonina no están claros, y podrían estar relacionados con su interacción con NF- κ B y del ROR α .

En consecuencia, nuestra hipótesis de trabajo es la siguiente:

- a. Durante la sepsis se produce una activación conjunta de las vías de señalización dependientes de NF- κ B y el inflamasoma NLRP3, efecto cooperativo que junto con el importante fallo mitocondrial dan lugar a la creación de un círculo vicioso que aumenta tanto la severidad como la duración de la respuesta inflamatoria.
- b. El tratamiento con melatonina va a reducir de forma considerable esta respuesta inflamatoria asociada a la sepsis y disminuir el daño oxidativo mitocondrial, eventos que se traducirán en una mejoría significativa del cuadro séptico. Si estas propiedades anti-inflamatorias de la melatonina se deben a su interacción con ROR α como evento esencial, la falta de este factor de transcripción anulará el efecto protector de esta hormona en la sepsis.

Para comprobar esta hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo 1: Estudiar en ratones *wild-type*, controles y con sepsis, la activación de NF- κ B mediante la determinación de contenido y/o expresión de mediadores de señalización citosólicos (IRAK-1, IRAK-4, IKK α e IKK β), presencia de NF- κ B traslocado al núcleo y unido al DNA, niveles de expresión y contenido proteico de marcadores pro-inflamatorios, estado de los genes reloj, y expresión y actividad de los principales sistemas antioxidantes.

Objetivo 2: Evaluar en ratones *wild-type*, controles y con sepsis, la activación del inflamasoma NLRP3 mediante el análisis de la expresión y contenido de sus principales componentes (NLRP3 y ASC), activación de la caspasa-1 y maduración de la IL-1 β .

Objetivo 3: Estudiar la activación de NF- κ B e inflammasoma NLRP3 en ratones deficientes en ROR α , tanto controles como con sepsis.

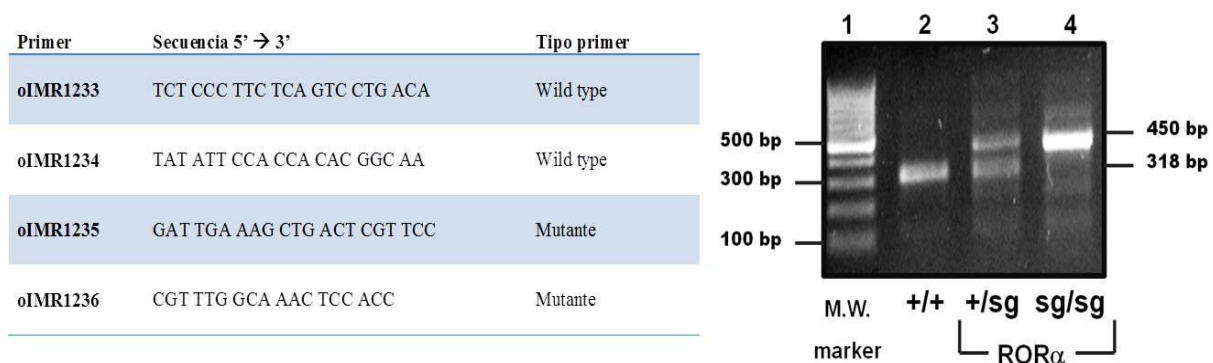
Objetivo 4: Evaluar el papel protector y mecanismos de acción de la melatonina mediante la determinación de todos los parámetros mencionados anteriormente en ratones sépticos *wild-type* y mutantes ROR α tratados con melatonina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES, PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO Y TRATAMIENTOS

1.1 ANIMALES

Para cumplir con los objetivos anteriormente mencionados, se utilizaron ratones *wild-type* de la cepa C57BL/6 así como ratones *staggerer* ($ROR\alpha^{sg/sg}$) homocigotos para una delección de 6,5 kb que previene la traslación del dominio de unión al ligando de $ROR\alpha$, interrumpiéndose así la función normal de este factor de transcripción (Hamilton et al., 1996). Los ratones *staggerer* homocigotos se obtuvieron a partir del cruce de parejas heterocigotas ($ROR\alpha^{+/sg}$), confirmándose el genotipo de la descendencia mediante PCR a partir de DNA genómico extraído de la cola (**Figura 20**). Asimismo, el fenotipo *staggerer* se identificó visualmente en los homocigotos, al presentar éstos una pérdida notable de la coordinación motora, temblor leve, hipotonía y pequeño tamaño en comparación con los



ratones heterocigotos y *wild-type*.

Figura 20. Genotipado de ratones $ROR\alpha^{sg/sg}$. Primers utilizados en el genotipado y resultado comparativo entre ratones *wild-type* (+/+), heterocigotos (+/sg) y homocigotos (sg/sg). El programa para la PCR consistió en 94 °C por 3 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 54 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, y una extensión final de 72 °C por 2 minutos (*Más información en Jackson Laboratory*)

Con la finalidad de monitorizar *in vivo* la respuesta inflamatoria asociada a la sepsis, así como el efecto terapéutico de la melatonina, se emplearon ratones macho de la cepa BALB/C-Tg ($NF\kappa B$ -RE-luc)-Xen (comúnmente denominados *NF- κ B-RE-luc*), los cuales

portan un transgen con 6 elementos de respuesta a NF- κ B asociados a cDNA de la luciferasa de luciérnaga (*Promega pGL-3*). Por último, la progresión de la infección asociada al proceso séptico se evaluó *in vivo* en ratones macho de la cepa *wild-type* BALB/C, cedidos por el servicio de experimentación animal de la Universidad de Granada.

Todas las cepas mencionadas se obtuvieron de *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine, USA) a través de *Charles Rivers Labs* (Barcelona, España), a excepción de la cepa *NF- κ B-RE-luc* que se adquirió a *Caliper Life Sciences* (Hopkinton, MA, USA). Los animales se estabularon en el servicio de experimentación animal del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada, en zona SPF (del inglés *specific pathogen free*), y bajo un ambiente controlado de fotoperíodo (ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas) y temperatura (22 ± 1 °C). El acceso al agua y a la comida (dieta estándar de laboratorio) fue continuo durante todos los experimentos; sin embargo, la severa ataxia que presentan los ratones *ROR $\alpha^{sg/sg}$* , y que los incapacita para alimentarse de manera convencional, obligó a darles la comida bien en forma de puré o humedecida en la jaula, facilitándoles asimismo el acceso al agua con la adición de platos de agua en cada jaula (Lau et al., 2008; Mamontova et al., 1998). Todos los experimentos se realizaron con ratones de una edad aproximada de tres meses y un peso entre los 25-30 g, con excepción de los ratones homocigotos *sg/sg* cuyo peso, debido a que acumulan menos tejido graso, fue inferior al mostrado por las otras cepas utilizadas (Lau et al., 2008). Todos los procedimientos experimentales se han realizado acorde a las guías española y europea de cuidado de animales (R.D. 53/2013; CETS # 123).

1.2 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO: MODELO DE SEPSIS EXPERIMENTAL

La sepsis se induce por ligadura y punción cecal (CLP, del inglés cecal ligation and puncture), un modelo experimental de carácter polimicrobiano que refleja a la perfección los cambios fisiológicos y síntomas, en términos de hipotermia, taquicardia y taquipnea observados en pacientes sépticos (Rittirsch et al., 2009; Wichterman et al., 1980). Tras anestesiarse a los animales con equitensin (0,1 mg/kg, vía intraperitoneal) y la aplicación de un desinfectante tópico, se procede a abrir la cavidad abdominal mediante laparotomía media, se localiza y libera el ciego y, mediante presión manual, se drenan retrógradamente las heces del colon ascendente hacia el ciego. Tras estos pasos, se liga el ciego justo por debajo de la válvula ileocecal y se punciona tres veces la superficie cecal antimesentérica con una aguja de 22G para permitir la extrusión de las heces, evitando lesionar los vasos sanguíneos adyacentes. Finalmente, procedemos a recolocar el paquete intestinal y suturar la pared abdominal con hilo de sutura estéril, aplicándose povidona yodada a la herida. Este procedimiento experimental se realizó bajo las mismas directrices en todas las cepas de ratones a fin de inducir la sepsis con alta fiabilidad y reproducibilidad. Asimismo, el procedimiento quirúrgico se realizó siempre en el mismo momento del día para evitar las variaciones circadianas en la respuesta inmune (Curtis et al., 2014).

1.3 PROGRAMA DE TRATAMIENTOS Y GRUPOS EXPERIMENTALES

Los ratones *wild-type* de la cepa C57BL/6 se agruparon en 6 grupos experimentales, con 20 ratones cada uno de ellos:

- Grupo control (C).
- Grupo de sepsis, subdividido a su vez en tres grupos que comprenden animales sacrificados a las 6 (S6), 8 (S8) o 24 (S24) horas después de la sepsis inducida por punción y ligadura cecal.
- Grupo de sepsis tratado con melatonina, el cual comprende dos grupos de ratones sacrificados a las 8 (S8M) o 24 (S24M) horas de inducir el proceso séptico. El grupo S8M recibió un tratamiento en base a 3 dosis de melatonina (30 mg/kg disuelta en 300 µl de 0,25% etanol:salino) de forma secuencial: 30 minutos antes de la operación (vía intraperitoneal), y 30 minutos y 4 horas (vía subcutánea) después del procedimiento quirúrgico. El grupo S24M recibió una dosis adicional de melatonina de 30 mg/kg a las 8 horas de la operación, igualmente por vía subcutánea (Figura 21 A).

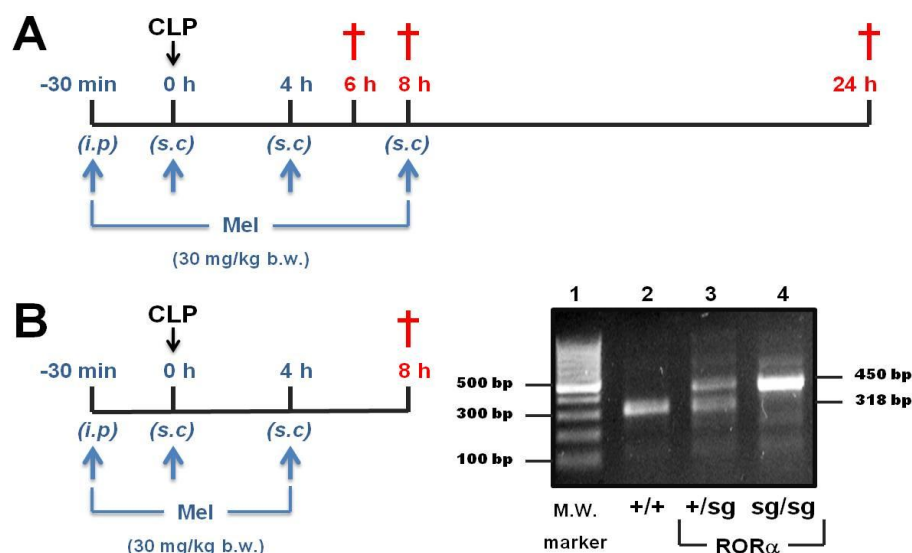


Figura 21. Programación de los grupos experimentales y tratamiento con melatonina en ratones *wild-type* C57BL/6 (A) y *RORα^{sg/sg}* (B). En azul se representa el momento de administración de la dosis de melatonina, mientras que en rojo la hora de sacrificio.

Dada la alta susceptibilidad y mortalidad previamente documentada frente al proceso inflamatorio (Delerive et al., 2001; Stapleton et al., 2005), los ratones $ROR\alpha^{sg/sg}$ homocigotos se estudiaron sólo durante las primeras 8 horas del proceso séptico, comparándose con los datos obtenidos a las 8 horas de la sepsis en la cepa *wild-type* C57BL/6. Así, los ratones $ROR\alpha^{sg/sg}$ fueron agrupados en grupo control, grupo de sepsis sacrificados a las 8 horas de la operación, y grupo de sepsis tratados con melatonina y sacrificados nuevamente a las 8 horas, de acuerdo al procedimiento experimental anteriormente mencionado (**Figura 21 B**). Cada uno de estos grupos experimentales se estableció con 20 ratones para la determinación de los distintos parámetros.

Tanto en los grupos de sepsis como en los de sepsis tratados con melatonina, los animales de ambas cepas, es decir, C57BL/6 y $ROR\alpha^{sg/sg}$, se sacrifican por dislocación cervical a los tiempos especificados y, rápidamente y en frío, se extrae el corazón que será congelado inmediatamente en nitrógeno líquido y conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la posterior obtención de las fracciones nuclear y citosólica.

2. ESTUDIOS *in vivo*

La monitorización *in vivo* de la activación de NF- κ B y la progresión de la infección se llevó a cabo mediante el equipo de imagen óptica IVIS Spectrum (*Caliper Life Sciences*, Hopkinton, MA, USA). La determinación del primer parámetro se realizó en ratones *NF- κ B-RE-luc* a los que se administró subcutáneamente D-luciferina a una dosis de 150 mg/kg disuelta en 30 μ l de PBS 15 minutos antes de la toma de imágenes (**Figura 22 A**). Pasado este período de tiempo, los ratones se anestesiaron con isofluorano al 1-1,5% en oxígeno al 100%, y se colocaron en posición ventral dentro del equipo IVIS Spectrum. La toma de imágenes *in vivo* se realiza bajo parámetros de exposición automáticos a las 0, 2, 4, 6, 8, 20 y 24 horas de la

sepsis y/o tratamiento con melatonina. La progresión de la infección se estudió *in vivo* de forma no invasiva en ratones *wild-type* BALB/C tras la administración intravenosa de la sonda Bacteriosense™645 (5 nmol/100 µl PBS/ratón), la cual tiene la propiedad de unirse a los lípidos cargados negativamente presentes en la membrana celular bacteriana. Inmediatamente después de su administración, los animales son anestesiados bajo las condiciones mencionadas con anterioridad y monitorizados a las 0, 8 y 24 horas del proceso séptico (**Figura 22 B**). Todas las imágenes obtenidas se analizaron y cuantificaron usando el software Living Image 3.0 (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA).

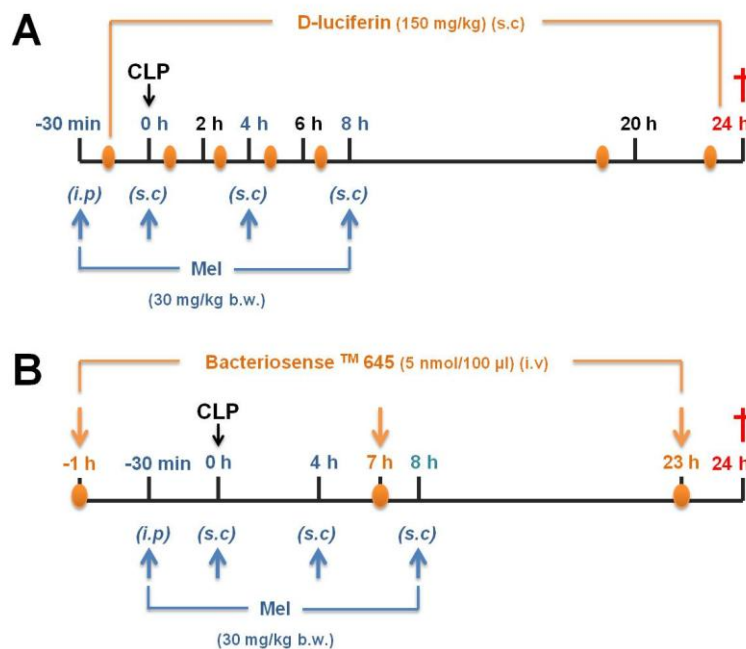


Figura 22. Programación de los grupos experimentales y tratamiento con melatonina en ratones *NF-κB-RE-luc* (A) y *wild-type* BALB/C (B) para el estudio *in vivo* de la respuesta inflamatoria asociada a la sepsis. En azul se representa el momento de administración de la dosis de melatonina, de color naranja el momento de administrar la D-luciferina o la sonda Bacteriosense, mientras que en rojo se representa la hora de sacrificio.

3. AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN CITOSÓLICA Y NUCLEAR

Para el aislamiento de la fracciones citosólica y nuclear se utiliza el método especificado en Nuclear Extract kit (*Active Motif Europe, La Hulpe, Bélgica*) el cual, basado en centrifugaciones diferenciales, nos permite obtener fracciones puras, libres de contaminación, que se utilizan para realizar las procedentes técnicas analíticas.

Tras descongelar el corazón, se lava en solución salina fría, se trocea el tejido mediante tijeras de disección y se homogeniza en un homogenizador de teflón (*Stuart Scientific, mod. SS2*) a 800 rpm que contiene 1/3 p/v de PBS al que se le adiciona un 5% de PIB (*Phosphatase Inhibitor Buffer, NaF 125 mM, β -glicerofosfato 250 mM, p-nitrofenilfosfato 250 mM, NaVO₃ 25 mM*). Todas estas manipulaciones se realizan en hielo para mantener una temperatura estable de 4 °C.

A continuación, el homogenado se centrifuga a 300 g durante 5 minutos a 4 °C (*Beckman Avanti™. 30, rotor de ángulo fijo F1010*), y el pellet obtenido se resuspende suavemente con pipeteo en 250 μ l de buffer hipotónico frío (HEPES 20 mM, NaF 5 mM, Na₂MoO₄ 10 μ M, EDTA 0,1 mM, pH 7,5). La resuspensión se incuba durante 15 minutos a 4 °C y, transcurrido este tiempo, se añade 50 μ l de IGEPAL al 10%, mezclando nuevamente los componentes de forma suave con pipeteo. La mezcla se centrifuga a 14.000 g durante 1 minuto a 4 °C. El sobrenadante procedente de esta nueva centrifugación, que corresponde a la fracción citosólica, se alícuota y se guarda a -80 °C. Mientras tanto, el pellet que se había obtenido, se resuspende en 200 μ l de buffer de lisis frío (HEPES 20 mM, glicerol 20%, NaCl 420 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, NaF 20 mM, DTT 0,5 mM, leupeptina 1 μ g/ml y 0.2 PMSF 0,2 mM, pH 7,9), y se incuba a 4 °C durante 30 minutos en constante agitación. Finalmente, pasado este tiempo de incubación, se centrifuga la mezcla a 14.000 g durante 10

minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido, que corresponde a la fracción nuclear pura, se alícuota y congela a -80 °C.

4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

4.1 EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción del RNA total libre de DNA se realiza mediante el kit comercial Real Total ARN Spin Plus (*Durviz SL, Valencia, España*), ajustando a las características de nuestro tejido el protocolo inicialmente descrito por la casa comercial.

Se añaden 700 µl de solución de lisis y 7,5 µl de β-mercaptoetanol al tejido (hasta 30 mg de tejido), proporcionando así a la muestra los agentes caotrópicos necesarios para inactivar inmediatamente las RNasas y crear las condiciones de unión apropiadas que favorecen la posterior absorción del RNA. Posteriormente, se homogeniza la mezcla en un homogenizador (*Dispomix ® System, Medic Tools AG, Suiza*) a 2500 rpm durante 3 ciclos de 10 segundos. Para aumentar el rendimiento en la extracción de RNA, se procede a la digestión del homogenado con la adición de 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml, *Quiagen, Alemania*) y posterior incubación de la mezcla durante 10 minutos a 55 °C. A continuación, se centrifuga a 10.000 g durante 3 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante obtenido se deposita en una columna de filtración, centrifugándose a 11.000 g durante un minuto con el objeto de reducir la viscosidad y limpiar el lisado. El filtrado se transfiere a un nuevo tubo de centrífuga, donde se añadirá 1 ml de etanol al 70%, procediéndose a la mezcla por agitación en vórtex o pipeteo. Esta mezcla se deposita en una columna de unión a RNA, y se centrifuga a 11.000 g durante un minuto. Seguidamente, se añaden 350 µl de tampón de desalado de membrana y se centrifuga a 11.000 g durante un minuto con el objeto de secar la membrana. Asimismo, la eliminación de las sales producirá una digestión de la DNasa mucho más

efectiva. Tras este paso, se prepara la mezcla de reacción de la DNasa (10 μl de DNasa reconstituida y 90 μl de tampón de reacción de DNasa), y se aplican 95 μl de dicha mezcla directamente en el centro de la membrana de sílica de la columna, incubándose durante 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añaden 200 μl de solución STOP/DNasa a la columna y se centrifuga a 11.000 g durante un minuto, colocándose la columna en un nuevo tubo de recolección. A continuación, se añaden 600 μl de solución de lavado a la columna y se centrifuga a 11.000 g durante un minuto. Se desecha el líquido y se coloca la columna en un nuevo tubo de recolección, al cual se añade 250 μl de solución de lavado y se centrifuga a 11.000 g durante dos minutos, lo que permite secar por completo la membrana. Finalmente, se coloca la columna en un microtubo de 1,5 ml y se añaden 60 μl de agua libre de nucleasas, incubándose un minuto a temperatura ambiente y centrifugando posteriormente a 11.000 g durante un minuto. Una vez obtenido el RNA se cuantifica en NanoDrop (*NanoDrop ND-1000 V3.5.2, NanoDrop Technologies, USA*), se verifica su calidad por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se guarda a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2 REACCIÓN DE REVERSO TRANSCRIPCIÓN

La obtención del cDNA (DNA copia) a partir del RNA total se llevó a cabo gracias al empleo del kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Así, la reacción de reverso transcripción se constituye en base a 10 μl de RNA total (2,5 μg) a los que se añaden el mismo volumen de 2XRT master mix que incluye, entre otros componentes, 2 μl de *random primers*, 0,8 μl de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados y 1 μl de reverso transcriptasa. La mezcla se dispone en hielo y se agita con pipeteo o vórtex suave, evitando en todo momento la formación de burbujas. Finalmente, se cargan las muestras en un termociclador Techgene Thermal Cycler/PCR modelo FTGene2D (*Techne, Cambridge, UK*) donde se programan las

condiciones especificadas en la **tabla 2** para que dé comienzo la reacción de reverso transcripción. Tras finalizar el programa, los cDNA se guardan a -20 °C hasta su posterior uso.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo (min)	10	120	5	∞

Tabla 2. Condiciones programadas en el termociclador para la reverso transcripción

4.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR RT-PCR

La RT-PCR se realizó con el kit FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (*Roche Applied Science, Mannheim, Alemania*) en el equipo Stratagene 3005P (*Stratagene, La Jolla CA, USA*). La secuencia de primers usados se indican en el **anexo 1** y se obtuvieron mediante el software Beacon Designer v. 4.0 (*Premier Biosoft Int., Palo Alto, USA*). El análisis de expresión por RT-PCR de cada uno de los genes de interés se realizó en base a las condiciones descritas en la **tabla 3**. Tras la correcta mezcla de los componentes indicados, evitando en todo momento la formación de burbujas, las muestras de cDNA se sometieron al programa de ciclos mostrados en la **tabla 4**. Los resultados obtenidos fueron analizados con el software MxPro™ QPCR Software v. 4.10 (*Stratagene, La Jolla CA, USA*) de acuerdo a la curva estándar generada en base a concentraciones crecientes de cDNA (500, 50, 5, 0,5 y 0,05 ng). Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a los valores de expresión de β -actina para cada muestra, usando el grupo **control wild-type** como grupo calibrador de los cambios en la expresión debido al proceso inflamatorio asociado a la sepsis o los efectos del tratamiento con melatonina.

	TNF- α	IL-1 β	I κ B α	NLRP3	Casp-1	HIF-1 α	Rev-Erb α	Bmal1	Clock	Sirt1	NAMPT
FSU SYBR	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Primers forward	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	1 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	1 μ l (10 μ M)	1 μ l (10 μ M)	1 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)
Primers reverse	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	1 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	1 μ l (10 μ M)	1 μ l (10 μ M)	1 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)
cDNA	1 μ l (80 ng)	1 μ l (400 ng)	1 μ l (40 ng)	1 μ l (80 ng)	1 μ l (80 ng)	1 μ l (400 ng)	1 μ l (40 ng)	1 μ l (80 ng)	1 μ l (400 ng)	1 μ l (40 ng)	1 μ l (40 ng)
H2O libre nucleasas	7,8 μ l	7,8 μ l	7 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l	7 μ l	7 μ l	7 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l

	GPx	GRd	SOD1	γ -GCS	G6PDH	Catalasa
FSU SYBR	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Primers forward	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)
Primers reverse	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)
cDNA	1 μ l (400 ng)	1 μ l (400 ng)	1 μ l (80 ng)	1 μ l (400 ng)	1 μ l (400 ng)	1 μ l (40 ng)
H2O libre nucleasas	7,8 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l

Tabla 3. Condiciones de RT-PCR para el análisis de expresión de los genes descritos.

Ciclos	Modo de análisis	Temperatura	Tiempo	Observaciones
1	Ninguno	95 °C	10 min	Activación de la Taq DNA polimerasa
40	Ninguno	95 °C	15 seg	Amplificación y análisis a tiempo real
	Cuantificación	55 °C	60 seg	

Tabla 4. Programa de ciclos de RT-PCR

4.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR OPEN-ARRAY

El *screening* de las potenciales dianas anti-inflamatorias de la melatonina se llevó a cabo en la plataforma OpenArray NT Cyler (*Biotrove Inc., Woburn, MA, USA*) mediante el análisis de subarrays precargados con la secuencia de primers de interés indicados en el **anexo 2**, y que fueron seleccionados de la base de datos TaqMan Gene Expression Assays (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). La preparación y carga del array se inicia con la disposición, en una placa de 96 pocillos, de una mezcla constituida por 1,44 µl de muestra (a una concentración final de 150 ng) y 4,6 µl de Master Mix Remix (MMR), el cual presenta en su composición la *GeneAmp Fast Master Mix* (sistema de polimerasa que no requiere un paso de activación y que disminuye el tiempo total de amplificación por PCR), y la solución *Taqman® REMix* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Los volúmenes necesarios de ambos componentes del MMR se especifican en la **tabla 5**.

GeneAmp Fast Master Mix	2,5 μ l	25 % exceso	3,125	Para 1 array (x48 muestras)	150
REMix	1 μ l		1,25		60
Agua	0,3 μ l		0,375		18

Tabla 5. Composición Master Mix Remix (MMR). A pesar de que el protocolo inicial corresponde a un volumen final de 3,8 ml, se procede a incrementar un 25% el volumen de todos los componentes con el objeto de minimizar posibles errores de pipeteo. GeneAmp Fast Master Mix se debe invertir 510 veces suavemente para su homogenización y, tras dar un spin, mantener en hielo. Asimismo, la mezcla del reactivo Remix no debe hacerse por vórtex, manteniéndose igualmente en hielo.

Una vez mezclados las muestras y el MMR por pipeteo suave y siempre en hielo, se centrifuga la placa de 96 pocillos a 1000 rpm durante 1-2 minutos, a fin de eliminar las posibles burbujas que se hayan formado durante la mezcla (**Figura 23, paso 1**). A continuación, se dispensan 5 μ l de la mezcla sobre una placa de 384 pocillos ideada para cargar los *arrays* y se procede a sellarla con un adhesivo de aluminio, incidiendo especialmente por los bordes de la placa para evitar tener evaporaciones de la muestra. Una vez preparada la placa de 384 con 5 μ l de la mezcla de MMR y muestra, perfectamente cerrada con el papel metálico, se centrifuga a 1000 rpm durante 1-2 minutos, nuevamente con el fin de eliminar burbujas, y se mantiene en hielo hasta el momento de su uso. Se recomienda, en este momento, rotular las 8 áreas en las que puede dividirse la placa de 384 pocillos, lo que facilitará los pasos posteriores (**Figura 23, paso 2**).

En un tercer paso, disponemos un *Tip Block* en el *Plate guide* que no vayamos a utilizar, y lo rellenamos con puntas de micropipeta específicas para este uso exclusivo. Asimismo, se prepara la *case* con el líquido de inmersión, tal y como se indica en el **paso 3 de la Figura 23**.

Tras este paso, cortamos con un bisturí el área que va a ser cargada en la placa de 384 pocillos, despegando cuidadosamente la correspondiente zona del papel adhesivo. A continuación, colocamos el *Plate guide* que corresponde a esa zona y disponemos el *Tip Block* en el hueco, comprobando que todas las puntas anteriormente dispuestas se encuentren alineadas. Procedemos a subir y bajar el *Tip Block* entre 20-30 veces, paso que debe permitir que el nivel de muestra esté un milímetro por encima del borde del *Tip Bloc* (**Figura 23, paso 4**).

El *array* diseñado con nuestros primers de interés se coloca en el *Plate Holder* de tal forma que el código de barras quede a la izquierda (**Figura 23, paso 5**), siendo siempre minuciosos en su manipulación; este conjunto *Plate Holder* más *array* se dispone en el *Autoloader* en base a las indicaciones dadas por el equipo. A continuación se coloca muy suavemente y despacio el *Tip Block* previamente cargado en el *Autoloader*, esperando la verificación por parte del equipo de una correcta disposición. Tras recibir dicha verificación, procedemos a alinear nuevamente las puntas dispuestas en el *Tip Block* y accionamos el equipo para que dé comienzo la carga automática de muestra en el *array*. Tras esta carga, retiramos el *Tip Block* de forma lenta para evitar la formación de burbujas en el *array*. Inmediatamente, con el objeto de evitar evaporaciones de la muestra, se introduce el *array* con el código en el lado con el borde negro brillante de la *Case*, deslizándolo por los surcos pero sin forzar en ningún momento (**Figura 23, paso 6**). Una vez que el *array* llega al fondo de la *Case*, se retira el sobrante del líquido de inmersión y se sustituye por un pegamento específico, recomendándose su aplicación primero de un lado de la *Case* hasta que llegue a la mitad, y repetir el proceso en la otra mitad. Realizado este paso, se deja 3 minutos por cada lado en el equipo de sellado proporcionado por la casa comercial (**Figura 23, paso 6**), y se limpia cuidadosamente ambas caras de la *Case* con etanol al 70%. Finalmente se le adhiere un marco metálico que va a facilitar el contacto de la *Case* con el bloque térmico del

termociclador Taqman OpenArray NT Cyler (**Figura 23, paso 7**) (Biotrove Inc., Woburn, MA, USA).

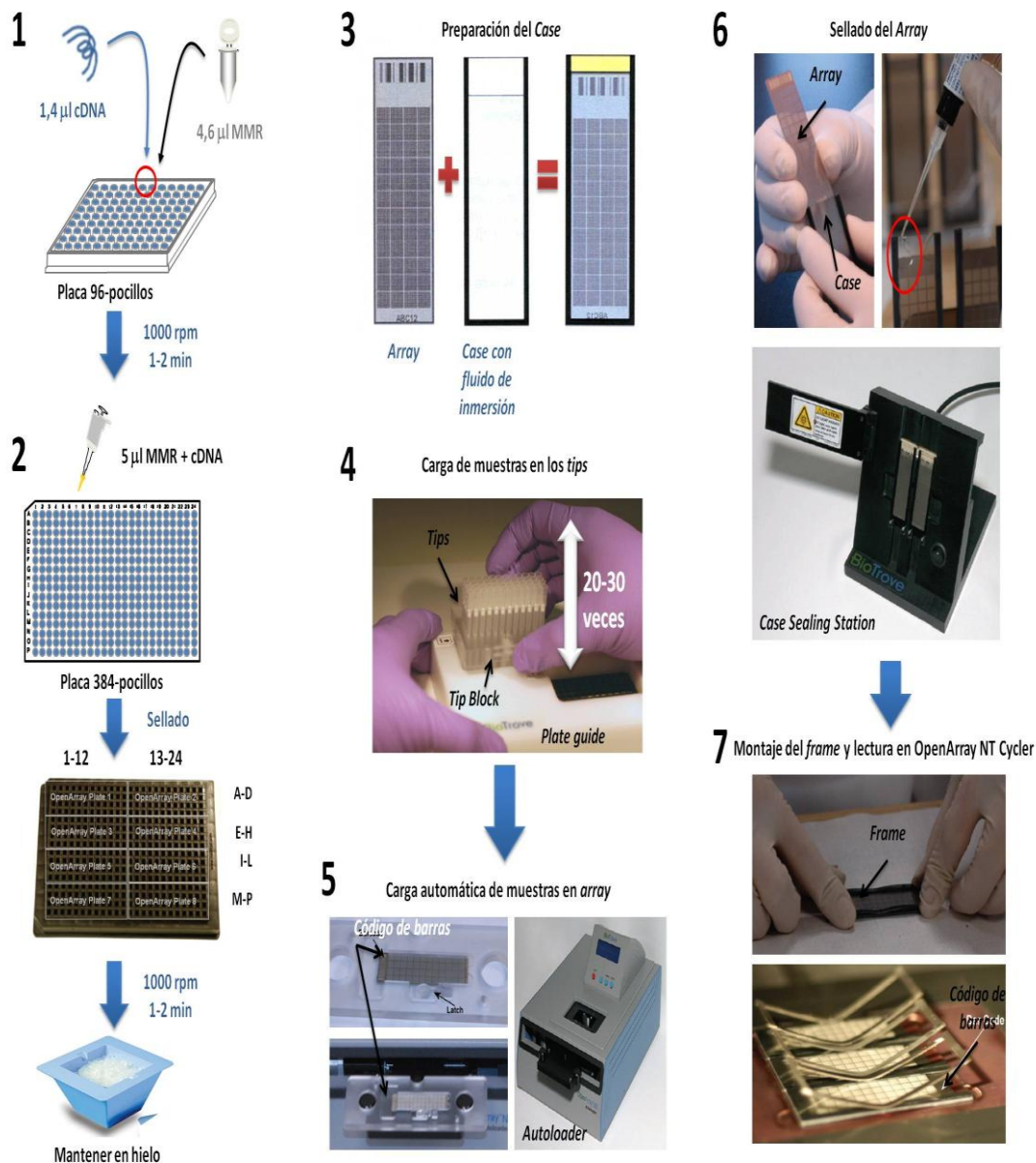


Figura 23. Protocolo desarrollado para el análisis de expresión génica por OpenArray

Las muestras de cDNA presentes en los *arrays* se sometieron a un ciclo de 90 °C de 10 minutos seguido de 36 ciclos de 28 segundos a 95 °C, 1 minuto a 55 °C, y 70 segundos a 72 °C. Los resultados obtenidos fueron analizados con el software Biotrove OpenArray NT Cyler System Software (versión 1.0.4) (Biotrove Inc., Woburn, MA, USA) y DataAssist™ Software

(versión 3.0) (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a los valores de expresión de los genes constitutivos *hprt1* (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa), *pum1* (homólogo de pumilio 1) y *psmc4* (subunidad reguladora 6B del proteosoma 26S), usando el grupo **control wild-type** como grupo calibrador de los cambios en la expresión debido al proceso inflamatorio asociado a la sepsis o los efectos del tratamiento con melatonina.

5. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA POR WESTERN BLOT

La fracción citosólica o nuclear, una vez descongelada, se trata con *Sample Buffer* constituido en base a SDS 2,5%, β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,01%. A continuación se procede a incubar la mezcla a 99 °C durante cinco minutos y posterior incubación a 4 °C durante el mismo período de tiempo. El tratamiento de la muestra se completa con una breve centrifugación a velocidad máxima. Tras esta secuencia de pasos hemos conseguido no sólo desnaturalizar la proteína a su estructura lineal primaria, facilitando así la unión del anticuerpo a su epítipo correspondiente, sino también eliminar cualquier material insoluble que pueda presentarse en la muestra y que será responsable de la aparición de patrones “desnudos” durante la electroforesis.

Las muestras preparadas se aplican en un gel de poliacrilamida al 7,5% o al 12,5% en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato (SDS-PAGE) (*PhastGel Media Homogeneous, GE Healthcare Bioscience, USA*). Tanto el porcentaje de poliacrilamida empleado así como la cantidad de proteína aplicada en el gel variarán en función de la proteína a analizar (**tabla 5**). La separación electroforética, en un gel del 7.5% SDS-PAGE, se realiza bajo las siguientes condiciones: paso 1.1: 250 V, 10 mA, 3 W, 15 °C, 1 vh; paso 1.2: 250 V, 1 mA, 3 W, 15 °C, 1 vh; paso 1.3: 250 V, 10 mA, 3 W, 15 °C, 60 vh. Estas condiciones fueron similares para el gel del

12.5% SDS-PAGE a excepción del paso 1.3, cuyas condiciones fueron las siguientes: 250 V, 10 mA, 3 W, 15 °C, 70 vh. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (*HybondTM-ECLTM nitrocellulose membrane, GH Healthcare Europe GmbH, Barcelona, España*) bajo las siguientes condiciones: 20 V, 25 mA, 1 W, 15 °C, 5 vh. Tanto la electroforesis como la transferencia se llevan a cabo en el equipo *PhastsystemTM (GE Healthcare Bioscience, USA)*. Tras la transferencia, se tiñe la membrana para la visualización de las proteínas con una solución de *Rojo Ponceau* (Rojo Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3% y ácido acético 3%) y se bloquea la membrana durante 1-4 horas a temperatura ambiente en tampón de bloqueo PBS-T (fosfato potásico 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4, Tween20 0,01%) más 5% de BSA o leche descremada en polvo. Los tiempos de bloqueo así como la composición del tampón empleado para cada proteína se especifican en la **tabla 5**. A continuación, se incuba la membrana durante toda la noche (aproximadamente 14-16 horas) a 4 °C en agitación constante con el anticuerpo primario específico diluido en el tampón de bloqueo. Tras la retirada del anticuerpo primario, se lava la membrana 3 veces con PBS-T durante 10 minutos y se procede a incubar 1 hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario diluido en PBS-T. Las referencias de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el estudio, así como las diluciones empleadas, se especifican en la **tabla 5 y anexo 3**. Finalmente, se vuelve a lavar la membrana 3 veces con PBS-T durante 10 minutos y se revela con la adición de un reactivo de quimioluminiscencia (*Western LightningTMPlus-ECL de PerkinElmer Inc.*) según las instrucciones del fabricante. La imagen la digitalizamos en un equipo de imagen (*Image Station 2000R, Eastman Kodak Company*) y se cuantifica mediante el uso del software 1D Image Analysis (versión 3.6).

	NF- κ B	IRAK-1	IRAK-4	IKK α	IKK β	I κ B α	IL-1 β	TNF α	iNOS
μg prot/pocillo	20 μ g	10 μ g	10 μ g	10 μ g	10 μ g	12 μ g	15 μ g	15 μ g	20 μ g
SDS-PAGE	12,5 %	7,5 %	7,5 %	7,5 %	7,5 %	12,5 %	12,5 %	12,5 %	7,5 %
Bloqueo	2 h PBS-T+5% BSA	3 h PBS-T+5% milk	3 h PBS-T+5% milk	2 h PBS-T+5% BSA	2 h PBS-T+5% BSA	2 h PBS-T+5% BSA	3 h PBS-T+5% BSA	2 h PBS-T+5% BSA	2 h PBS-T+5% milk
Ac 1°	1:100	1:500	1:200	1:500	1:500	1:100	1:100	1:100	1:100
Ac 2°	Anti-mouse 1:500	Anti-rabbit 1:5000	Anti-goat 1:1000	Anti-mouse 1:1000	Anti-mouse 1:1000	Anti-mouse 1:1000	Anti-mouse 1:1000	Anti-mouse 1:500	Anti-rabbit 1:5000

	NLRP3	ASC	Caspasa-1	Caspasa-1 p20	ROR α	Ac-NF- κ B	Sirt1
μg prot/pocillo	15 μ g	15 μ g	15 μ g	20 μ g	15 μ g	20 μ g	20 μ g
SDS-PAGE	7,5 %	12,5 %	12,5 %	12,5 %	12,5 %	12,5 %	7,5 %
Bloqueo	1 h PBS-T+5% BSA	1 h PBS-T+5% BSA	2 h PBS-T+5% BSA	3 h PBS-T+5% BSA	3 h PBS-T+5% BSA	3 h PBS-T+5% BSA	2 h PBS-T+5% milk
Ac 1°	1:250	1:500	1:250	1:100	1:100	1:100	1:100
Ac 2°	Anti-mouse 1:1000	Anti-mouse 1:1000	Anti-mouse 1:1000	Anti-goat 1:1000	Anti-goat 1:1000	Anti-rabbit 1:5000	Anti-mouse 1:1000

Tabla 5. Condiciones de Western Blot para el análisis del contenido de las proteínas descritas.

6. DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO CELULAR

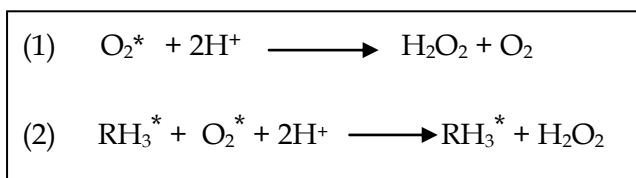
6.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA DEPENDIENTE DE COBRE Y ZINC (Cu-Zn-SOD; SOD1)

La familia de la superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.11) está integrada por tres isoformas: a) una isoforma dependiente de cobre y zinc (Cu-Zn-SOD; SOD1), predominante en la fracción soluble celular y líquido extracelular, y en la cual los ligandos de ambos metales son cadenas laterales de histidina; b) la isoforma manganeso dependiente (Mn-SOD; SOD2), localizada en la matriz mitocondrial, que presenta tres cadenas laterales de histidina, una de aspartato y una molécula de agua o un ligando hidroxilo como ligandos de los iones manganeso en función de su estado de oxidación; y c) una isoforma dependiente de hierro (Fe-SOD), exclusiva de bacterias, y cuyo sitio activo comparte características estructurales con la anterior isoforma.

Independientemente del metal que actúe como cofactor, las diferentes isoformas de la SOD representan la primera línea de defensa de las células frente al estrés oxidativo, catalizando la conversión del radical anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (*ecuación 1*). Precisamente, su actividad enzimática implica la presencia de alguna de sus isoformas en cualquier tipo celular con capacidad para utilizar el oxígeno y, en consecuencia, producir anión superóxido (Fridovich, 1974).

El método utilizado para la determinación de la SOD1 se basa en el desarrollado por Misra y Fridovich (Misra and Fridovich, 1972) : la epinefrina, en medio alcalino, experimenta una auto-oxidación generándose en consecuencia anión superóxido que, a su vez, transforma la adrenalina en adrenocromo. En presencia de SOD1, la producción de dicho adrenocromo se reduce al neutralizar esta enzima la síntesis de anión superóxido (*ecuación 2*). Asimismo, la valoración de la actividad enzimática requiere conocer la dosis inhibitoria 50 (ID50), es

decir, la cantidad de enzima capaz de inhibir en un 50% la producción del adenocromo; por ello, la actividad de la SOD1 se expresará en U/mg de proteínas, definiéndose una unidad como *la cantidad de proteína equivalente capaz de inhibir la producción de adenocromo en un 50%*.



Reacciones catalizadas por la SOD *in vivo* (1) e *in vitro* (2) donde: O_2^* , anión superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; RH_3^* , adrenalina; $RH_3^* + H_2O_2$, adrenocromo.

Protocolo

De forma previa a la determinación de la actividad enzimática, debemos extraer la SOD1 presente en nuestras muestras experimentales. Para ello, realizamos una dilución 1/5 de la muestra en agua Milli-Q y, en un tubo de vidrio, añadimos 500 µl de dicha dilución y 800 µl de una mezcla etanol-cloroformo (1.66/1). A continuación agitamos manualmente durante 60 segundos y centrifugamos a 3.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, recogiendo el sobrenadante correspondiente a la SOD1 que se mantendrá en hielo hasta su posterior uso (máximo 24 horas).

Una vez extraída la SOD1, se procede a preparar epinefrina 6 mM en HCl 1 mM, evitando en todo momento su exposición a la luz a fin de que no se auto-oxide. Asimismo, se realizan distintas diluciones de la muestra en función de lo especificado en la siguiente tabla:

Dilución	Sobrenadante	Agua Milli-Q
1:50	10 µL	490 µL
1:25	20 µL	480 µL
3:50	30 µL	470 µL
2:25	40 µL	460 µL

Finalmente, la actividad de la SOD1 se determina mediante reacciones en microplaca en las que tendremos en cuenta, como consideraciones generales, que (1) la epinefrina debe ser el último reactivo que se añada, al ser ésta la responsable de iniciar la reacción, y (2) asegurarnos que los distintos reactivos se mezclen de forma correcta.

- El primer pocillo de la microplaca, correspondiente al blanco de reacción, se constituye en base a 250 µl de tampón carbonato 50 mM/EDTA-Na₂ 0,1 mM, 20 µl de HCl 1 mM y 30 µl de agua Milli-Q.
- En el segundo pocillo tendrá lugar la reacción de la epinefrina en la cual debemos observar una formación máxima de adrenocromo ya que este punto no muestra SOD en su composición: 250 µl de tampón carbonato 50 mM/EDTA-Na₂ 0,1 mM, 20 µl de epinefrina 6 mM y 30 µl de agua Milli-Q.
- Los restantes pocillos corresponden a la reacción de la SOD, en los cuales determinaremos la actividad enzimática en distintas diluciones de la muestra

Dilución	Tampón Carbonato	Dilución	Epinefrina	Agua Milli-Q
1: 100	250 µL	15 µL de la dilución 1:50	20 µL	15 µL
1: 50	250 µL	30 µL	20 µL	••••••••
1: 25	250 µL	30 µL	20 µL	••••••••
3: 50	250 µL	30 µL	20 µL	••••••••
2: 25	250 µL	30 µL	20 µL	••••••••

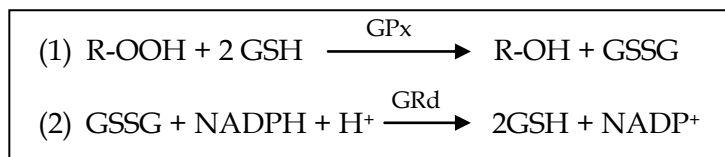
La lectura se realiza en un espectrofotómetro de placa (*Bio-Tek Power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer*) a 480 nm y a una temperatura de 30 °C. Obtendremos valores de absorbancia cada 60 segundos durante un período de tiempo de 10 minutos, determinando para cada punto de reacción de los anteriormente indicados el intervalo de tiempo en el cual el incremento de absorbancia muestra una mayor tendencia lineal. Una vez anotados tanto

los intervalos de tiempo como sus correspondientes absorbancias, procedemos a aplicar la fórmula ($\Delta Absorbancia/\Delta tiempo de reacción$) $\times 60$, diseñando con los valores obtenidos la función lineal y exponencial que mejor se ajuste a nuestros valores de absorbancia, escogiendo para la determinación de la actividad de la SOD1 aquella función cuyo valor de regresión sea más cercano a la unidad.

6.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx) CITOSÓLICA

La acción enzimática de la SOD1 debe ir siempre acoplada a otros sistemas antioxidantes que eviten, en última instancia, la acumulación de H_2O_2 en la célula. Una de estas enzimas acopladas es la glutatión peroxidasa (GPx; EC 1.11.1.9), la cual cataliza la reducción de la mayor parte del H_2O_2 formado a nivel citosólico a H_2O y O_2 , empleando para ello glutatión reducido (GSH) como agente reductor. La GPx muestra dos isoformas diferentes, una dependiente de selenio como cofactor para su acción enzimática (Se-GPx), y otra totalmente independiente de este elemento (iSe-GPx). Ambas isoformas son capaces de usar hidroperóxidos orgánicos (t-BHP, cumeno hidroperóxido) como sustratos, si bien sólo la Se-GPx es capaz de utilizar la forma inorgánica (H_2O_2) (Lawrence and Burk, 1976). Otra diferencia entre ambas isoformas reside en su localización celular al ser descrita la Se-GPx como isoforma mitocondrial a diferencia de la iSe-GPx, presente de forma exclusiva a nivel citosólico (Lawrence and Burk, 1978). Sin embargo, aún existe cierta controversia al respecto, lo que nos obliga a utilizar como sustrato un hidroperóxido orgánico y asegurarnos la medida total de la actividad de la GPx citosólica.

El método empleado consiste en una técnica espectrofotométrica indirecta basada en la reacción acoplada con la glutatión reductasa (GRd) y utilizando cumeno hidroperóxido como sustrato (Jaskot et al., 1983). Las reacciones que tienen lugar son:



Entonces, la actividad de la GPx se mide indirectamente siguiendo la oxidación del NADPH a 340 nm.

Protocolo

En primer lugar procedemos a preparar nuestras muestras experimentales, sonicando la fracción citosólica (*Sonuplus HD-2070*) y posteriormente centrifugando a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. La actividad de la GPx, así como la posterior determinación de la GRd, se realiza en el sobrenadante obtenido, alicuotando 50 µl para determinar la concentración de proteínas (LOWRY et al., 1951). A continuación se incuban 10 µl de muestra en una microplaca durante 4 minutos a 37 °C con 240 µl de una solución de trabajo compuesta por fosfato potásico 50 mM, EDTA dipotásico 1 mM, pH 7,4, azida sódica 4 mM, GSH 4 mM, NADPH 0,2 mM y GRd (0,5 U/ml). Tras la incubación se añaden 10 µl de cumeno hidroperóxido (1:250 en buffer fosfato potásico 50 mM, EDTA dipotásico 1 mM, pH 7,4) para iniciar la reacción y se mide la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos en un espectrofotómetro de placa (*BioTek Power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer*). En todas las determinaciones se resta la oxidación no enzimática del NADPH sustituyendo los 240 µl de la solución de trabajo por NADPH 0,2 mM en buffer fosfato potásico 50 mM, EDTA

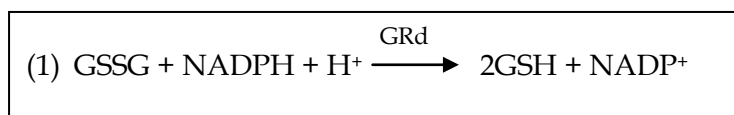
dipotásico 1 mM, pH 7,4. La actividad de la GPx es expresada en nmol de NADPH oxidado/min * mg proteína en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad GPx} = \frac{\Delta\text{Abs catalizada} - \Delta\text{Abs no catalizada}}{0,062} \times \frac{\text{Volumen total}}{\text{Volumen muestra}}$$

6.3 DETERMINACIÓN DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA (GRd) CITOSÓLICA

La acción catalítica de la GPx conlleva la oxidación del glutatión reducido (GSH), cualitativamente el principal antioxidante endógeno de la célula, a glutatión oxidado (GSSG); por ello, la acción de la GPx lleva asociada la puesta en marcha de un sistema cíclico que restaure nuevamente los niveles de GSH. En dicho sistema cíclico, la glutatión reductasa (GRd; EC 1.6.4.2) va a catalizar la reducción del GSSG a GSH, requiriendo para tal acción el poder reductor del NADPH que se convierte en NAD⁺, si bien la acción acoplada de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa restablece nuevamente el *pool* celular de NADPH.

En base a estas consideraciones teóricas, la determinación de la actividad de la GRd se realizó cuantificando de forma directa la oxidación del NADPH consecuencia del proceso de reducción del GSSG catalizado por la GRd (Jaskot et al., 1983), tal y como se muestra en la siguiente reacción:



Protocolo

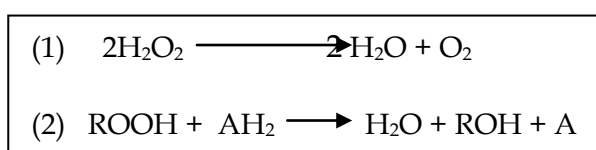
Utilizando la misma muestra procesada para la determinación de la GPx, 35 ml de esta muestra se añade a 465 ml de una solución de trabajo compuesta por fosfato potásico 50

mM, EDTA dipotásico 1 mM, pH 7,4 y GSSG 2 mM. Tras una incubación a 37 °C durante 4 minutos, se añade 8,5 ml de NADPH 9,5 mM preparado en fosfato potásico 50 mM, EDTA dipotásico 1 mM, pH 7,4. La oxidación del NADPH es registrada durante 3 minutos a 340 nm en un espectrofotómetro de cubeta (*UV1603 Shimadzu spectrophotometer*). En todas las determinaciones se resta la oxidación no enzimática del NADPH mediante la sustitución de los 465 ml de solución de trabajo por el mismo volumen de buffer fosfato potásico 50 mM, EDTA dipotásico 1 mM, pH 7,4. La actividad de la GRd es expresada en nmol NADPH oxidado/min * mg prot en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad GRd} = \frac{\Delta\text{Abs catalizada} - \Delta\text{Abs no catalizada}}{0,062} \times \frac{\text{Volumen total}}{\text{Volumen muestra}}$$

6.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA (CAT)

El peróxido de hidrógeno generado por la SOD1 puede detoxificarse, además de por el sistema GPx/GRd, por acción de la catalasa (CAT; EC 1.11.1.6), una enzima que si bien no es mayoritaria su actividad a nivel citosólico (representa un 20% del total, registrándose el 80% restante a nivel peroxisomal) muestra una gran eficiencia en la conversión del H₂O₂ a H₂O y O₂, tanto que no puede ser saturada por H₂O₂ a ninguna concentración (*ecuación 1*). Además de esta función catalítica, la catalasa muestra una actividad peroxidasa, catalizando la oxidación de compuestos reducidos (metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles) bajo condiciones de pH básico (*ecuación 2*).



La presencia de ambas actividades hacen que la catalasa, aunque no sea esencial para algunos tipo de células en condiciones normales, tenga un papel clave en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células, cooperando con la GPx en la captura del H₂O₂ antes de que puede difundir de la célula y extender el daño oxidativo.

Protocolo

Para evaluar la actividad de la catalasa se emplea el método desarrollado por Aebi, 1984 (Aebi, 1984) basado en medir la disminución del H₂O₂ por la acción catalítica de la enzima. Para ello, se mezcla la muestra citosólica (concentración final: 0,15 mg/ml) con una solución de trabajo compuesta por fosfato potásico 50 mM, pH 7 y H₂O₂ 15 mM hasta un volumen final de reacción de 500 µl. El descenso en la densidad óptica es registrada durante 3 minutos a 240 nm en un espectrofotómetro de cubeta (*UV1603 Shimadzu spectrophotometer*). La actividad de la catalasa se expresa en µmoles /min * mg prot en base a la siguiente fórmula

$$\text{Actividad CAT} = \frac{\Delta \text{Absorbancia} / \text{min} \times 1000}{\epsilon_{240} \times \text{concentración final muestra}}$$

donde ϵ_{240} es el coeficiente de extinción molar del H₂O₂ a 240 nm (39, 58 M⁻¹ x cm⁻¹)

7. DETERMINACIÓN PARÁMETROS ANALÍTICOS POR ELISA

7.1 CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD DE UNIÓN AL DNA DE NF- κ B

p65

Se utilizó el kit TransAM™ NF- κ B p65 (*Active Motif Europe, Rixensart, Bélgica*) para registrar la unión al DNA mostrada por la subunidad p65 de NF- κ B en los distintos grupos experimentales, kit donde se combina la rapidez y sencillez del formato ELISA con una forma sensible y específica para la activación de NF- κ B al contener una placa con 96 pocillos en los cuales ha sido inmovilizado la secuencia consenso de unión para *kappaB*: 5'-GGGACTTCC-3'. El ensayo se realizó en todo momento de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

En primer lugar se prepara la placa proporcionada por el kit para la unión de NF- κ B a su secuencia consenso, añadiendo para ello 30 μ l de *Complete Binding Buffer* a cada pocillo. A continuación, adicionamos 20 μ l de la muestra (concentración final de 20 μ g), del extracto nuclear Jurkat proporcionado por el kit (concentración final de 2,5 μ g) o de *Complete Binding Buffer* en función de si el pocillo es definido como muestra, control positivo o blanco, respectivamente. Una vez dispensada la placa conforme a los volúmenes anteriormente mencionados, procedemos a sellarla e incubarla durante una hora a temperatura ambiente con una agitación media de 100 rpm. Pasado este tiempo, lavamos cada pocillo 3 veces con 200 μ l de *Washing Buffer 1X*. Tras finalizar estos lavados, añadimos 100 μ l de anticuerpo NF- κ B diluido 1.1000 en *Antibody Binding Buffer*, sellamos nuevamente la placa e incubamos una hora a temperatura ambiente sin agitación. Finalizada la incubación con el anticuerpo primario, lavamos nuevamente con *Washing Buffer 1X* de forma similar a lo descrito con anterioridad e incubamos 1 hora a temperatura ambiente sin agitación con 100 μ l de

anticuerpo HRP diluido 1:1000 en *Antibody Binding Buffer 1X*. Tras los pertinentes lavados, añadimos 100 μ l de *Developing Solution* e incubamos 1 minuto a temperatura ambiente hasta que el color de las muestras vire a un color azul intenso. Finalmente, adicionamos 100 μ l de *Stop Solution*, tornándose las muestras del color azul oscuro a un color amarillo. La lectura de absorbancias se realiza en un espectrofotómetro de placas (*Bio-Tek Power-Wave_x, Microplate Scanning Spectrophotometer*) a 450 nm, expresándose la capacidad de unión de NF- κ B al DNA en términos de densidad óptica.

7.2 NIVELES INTRACELULARES DE NAD⁺

Para una rápida, sensible y precisa medida de los niveles celulares de NAD/NADH se utilizó el kit NAD/NADH Assay Kit (*Abcam, Cambridge, MA, USA*). Se trata de un kit colorimétrico que, gracias a la presencia del componente *NAD Cycling Enzyme Mix*, reconoce específicamente NAD/NADH, pero no NADP o NADPH, en una reacción de reciclaje enzimático, sin necesidad de purificar las muestras.

De acuerdo a las instrucciones dadas por la casa comercial, se homogeniza 20 mg de corazón en 400 μ l de *NADH/NAD Extraction Buffer* y se centrifuga a 14.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, utilizándose el sobrenadante obtenido para la determinación de los niveles de NAD/NADH. En un segundo paso, procedemos a preparar la curva estándar sobre la cual se extrapolarán los datos de absorbancia obtenidos en nuestras muestras; para ello, preparamos un estándar de NADH 10 μ M en un volumen final de 500 μ l a partir del cual definimos los distintos puntos de la curva en base a los volúmenes reflejados en la siguiente tabla:

Estándar	NADH 10 μ M estándar (μ l)	Assay Buffer (μ l)	Volumen final estándar/pocillo (μ l)	Concentración NADH
1	0	150	50	0 pmol/pocillo
2	6	144	50	20 pmol/pocillo
3	12	138	50	40 pmol/pocillo
4	18	132	50	60 pmol/pocillo
5	24	126	50	80 pmol/pocillo
6	30	120	50	100 pmol/pocillo

A continuación, realizamos un paso de descomposición del NAD necesario para la determinación de los niveles de NADH; este paso consiste en la incubación a 60 °C durante 30 minutos de 200 μ l del homogenado anteriormente obtenido, seguido de una breve centrifugación a máxima velocidad para eliminar cualquier precipitado que haya podido formarse. Finalmente, las muestras se mantienen en hielo hasta el comienzo del ensayo. La determinación de los niveles totales de NAD/NADH se realiza directamente en el sobrenadante, sin necesidad de tratamientos previos.

Tras la preparación de todos los estándares y las muestras, se carga una placa de 96 pocillos, por duplicado, 50 μ l de las diferentes diluciones de los estándares, 50 μ l de las muestras sin tratar, y 50 μ l de las muestras en las cuales se ha procedido a la descomposición del NAD⁺. Seguidamente se añade 100 μ l de *Reaction Mix* (constituido por 98 μ l de *NADH Cycling Buffer* y 2 μ l de *NADH Cycling Enzyme Mix*) a todos los pocillos, y se incuba la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos, período de tiempo suficiente para convertir el NAD en NADH. Finalmente se adicionan 10 μ l de *NADH Developer* y se realizan lecturas de absorbancias a 450 nm entre las 1-4 horas, tiempo de lectura que vendrá determinado por el momento de estabilidad de la reacción colorimétrica. Las concentraciones de NAD⁺, NADH y NAD total se expresan en μ g/mg proteína, conociendo el peso molecular del NADH (663,4 g/mol) y mediante la aplicación de las siguientes fórmulas:

$$[NADt] = \frac{\text{Absorbancia corregida} - \text{y-intercepto}}{\text{Pendiente de la recta}}$$

$$[NADH] = \frac{\text{Absorbancia corregida} - \text{y-intercepto}}{\text{Pendiente de la recta}}$$

$$[NAD^+] = [NADt] - [NADH]$$

8. CONSUMO DE OXÍGENO MITOCONDRIAL

La determinación del consumo de oxígeno mitocondrial en los distintos grupos experimentales se llevó a cabo mediante el sistema de respirometría de alta resolución Oxygraph-2k (*Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria*) equipado con un electrodo TPP⁺ ion selectivo (*Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria*) y un electrodo de referencia MI-401 (*Microelectrodes Inc., Bedford, USA*). El análisis del estado respiratorio se realizó en fibras musculares de corazón, lo que permite el acceso experimental y evaluación de todo tipo de mitocondrias, descartándose así la posibilidad de una pérdida selectiva de mitocondrias dañadas durante el proceso de aislamiento mitocondrial (Larsen et al., 2014). En primer lugar, se procede a la obtención de 0,7 mg de fibras musculares, las cuales serán permeabilizadas mediante métodos mecánicos, es decir, la separación manual de los haces de fibras, y químicos, sumergiendo las fibras en una solución de saponina 5 mg/ml en buffer de preservación BIOPS (CaK₂EGTA 2,77 mM, K₂EGTA 7,23 mM, Na₂ATP 5,7 mM, MgCl₂ · 6H₂O 6,56 mM, taurina 20 mM, fosfocreatina disódica 15 mM, imidazol 20 mM, DTT 0,5 mM y MES 50 mM, pH 7,1). Una vez permeabilizadas, las fibras musculares se disponen en el interior de las cámaras del respirómetro a 37 °C en un volumen de 2 ml de medio de respiración MiR06Cr (EGTa 0,5 mM, MgCl₂ · 6H₂O 36 mM, taurina 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20 mM, D-sacarosa 110 mM, BSA libre de ácidos grasos 1 g/l, ácido lactobiónico 60

mM y catalasa 280 unidades/ml, pH 7,1, medio que será enriquecido con creatina 3 mg/ml). Los datos de consumo de oxígeno se corrigen en base a la adición de inhibidores de los diferentes complejos respiratorios (rotenona, ácido malónico y antimicina A). Los datos se obtienen y se analizan mediante DatLab 4 software (*Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria*).

9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY

Para calcular la concentración de proteínas presentes en las distintas fracciones analizadas (citosol, núcleo, mitocondria y membrana celular) se utiliza el método de Lowry con las pertinentes modificaciones del método de Biuret (LOWRY et al., 1951; Simonian, 2002). Se trata de una técnica colorimétrica con dos reacciones complementarias:

- a) Reacción de Biuret, específica de los grupos amino de los enlaces peptídicos, y que implica la formación de un complejo coordinado coloreado de estos grupos con el cobre en medio alcalino. Este pH alcalino permite el desplegamiento de las proteínas globulares en medio acuoso, es decir, actúa a modo de agente desnaturizante para permitir que los iones de cobre lleguen hasta los grupos amino de los enlaces peptídicos.
- b) Reducción del reactivo de Fenol producida por el efecto de ciertos radicales aromáticos de los aminoácidos y de los complejos de Biuret. Este reactivo actúa a modo de indicador redox el cual, al reducirse, adquiere un color azul de intensidad variable en función de la cantidad de proteínas presentes en la muestra, y que puede cuantificarse midiendo la absorbancia a 650 nm.

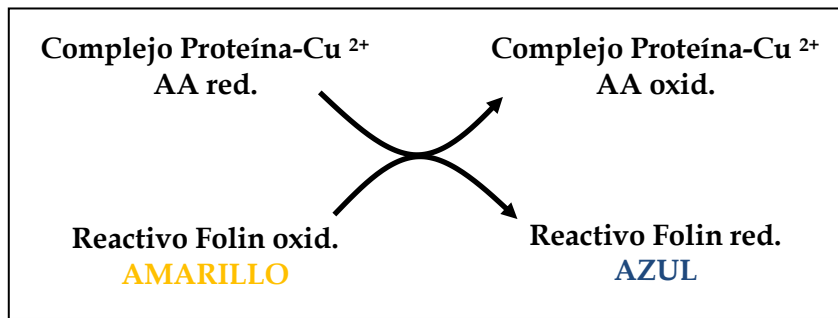


Figura 24. Reacciones colorimétricas dadas en la determinación de proteínas según el método de Lowry

Protocolo

Para medir la concentración de proteínas de cualquier muestra citosólica, nuclear, mitocondrial o membrana celular, se adapta el método de Lowry a un micrométodo realizado en placas de enzimoimmunoensayo.

En primer lugar, se procede a la preparación de una recta patrón en la cual se utiliza albúmina sérica bovina como estándar (disuelta en TRIS 20 mM) a concentraciones entre 0,05-0,6 mg/ml. A continuación se dispone en los pocillos 50 μ l de blanco, patrones o muestras, añadiendo posteriormente 200 μ l de reactivo de Lowry (carbonato disódico al 2% en NaOH 0,1 M, tartrato de sodio-potasio al 1% y sulfato cúprico al 0,5%, siendo la proporción de estas soluciones de 98:1:1) y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación (agitador de placas: *Grant Bio PMS-1000 Microplate Shaker*). Finalmente, la reacción se revela con 50 μ l de reactivo de fenol diluido 1:10 con agua Milli-Q. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 650 nm en un espectrofotómetro de placa (*Bio-Tek Power-Wave_s, Microplate Scanning Spectrophotometer*).

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos presentados en esta Tesis Doctoral se expresan como la media aritmética (medida de la tendencia central) \pm error estándar (medida de la dispersión de los datos), utilizándose para ello de cuatro a seis experimentos por duplicado, al menos que se especifique lo contrario en las leyendas que acompañan a las figuras de los resultados. La comparación de medias entre los diferentes grupos experimentales se realiza mediante un análisis ANOVA, comprobándose en cada grupo de estudio la hipótesis de normalidad de las distribuciones mediante el test de la *t* de Student (*Prism Software, GraphPad, San Diego, CA, USA*). Se consideró un valor de $P < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Los resultados mostrados en este apartado corresponden al trabajo:

García JA, Volt H, Venegas C, Doerrier C, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. Disruption of the NF- κ B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor alpha (ROR α) and blocks the septic response in mice. FASEB 2015; Factor de Impacto: 5.480; Áreas: Biology - Biochemistry & Molecular Biology - Cell Biology; Posición/area:- 7/85 - 47/291 - 45/185.

En este trabajo se describe que la activación persistente y cooperación entre las vías de señalización dependientes de NF- κ B y NLRP3 tiene lugar de forma paralela a una grave situación de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en corazón de ratones sépticos, lo que sin duda va a amplificar y sostener la respuesta inflamatoria sistémica asociada a esta patología. Asimismo, se demuestra por primera vez que la melatonina requiere al receptor retinoide huérfano alfa (ROR α) para interrumpir la conexión entre NF- κ B y NLRP3 durante la sepsis, recuperar la función mitocondrial normal y restablecer el estado redox celular. En su conjunto, los resultados que se exponen a continuación justifican fehacientemente el uso de la melatonina como co-terapia en pacientes sépticos.

1. LA MELATONINA INHIBE LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B Y NLRP3 DURANTE LA SEPSIS

La **figura 25** ilustra la monitorización *in vivo* de la dinámica temporal de la respuesta inflamatoria y el efecto terapéutico de la melatonina en ratones *NF- κ B-RE-luc*, determinación que se realiza con el sistema de análisis de imagen IVIS-Spectrum. La capacidad de unión de NF- κ B al DNA muestra un incremento transitorio y tiempo-dependiente al monitorizarse tanto el cuerpo entero como el corazón de ratones *NF- κ B-RE-luc* sépticos, con unos valores máximos de unión a las 8 horas de inducir la sepsis por CLP (**Figura 25 A,B**). Sin embargo, la señal bioluminiscente dependiente de la activación de NF- κ B registrada al analizar el cuerpo entero del ratón fue mayor en comparación con la señal emitida por la zona donde se localiza el corazón, hecho que puede relacionarse con la localización anatómica profunda de este último que dificulta la detección de la bioluminiscencia. En relación con esta activación de NF- κ B, se observó *in vivo* un aumento de la señal fluorescente relacionada con la infección a lo largo de las 24 h del proceso séptico en ratones BALB/C (**Figura 25 C**). Asimismo, se analizó en ratones wild-type C57BL/6 la translocación nuclear y capacidad de unión de NF- κ B al DNA mediante western blot y ELISA, respectivamente, confirmándose la máxima activación de NF- κ B a las 8 horas de inducir la sepsis (**Figura 26 A**). El tratamiento con melatonina disminuyó notablemente los niveles nucleares de NF- κ B y su capacidad de unión al DNA, si bien la carga bacteriana asociada al proceso séptico no se vio alterada (**Figura 25 y Figura 26 A**).

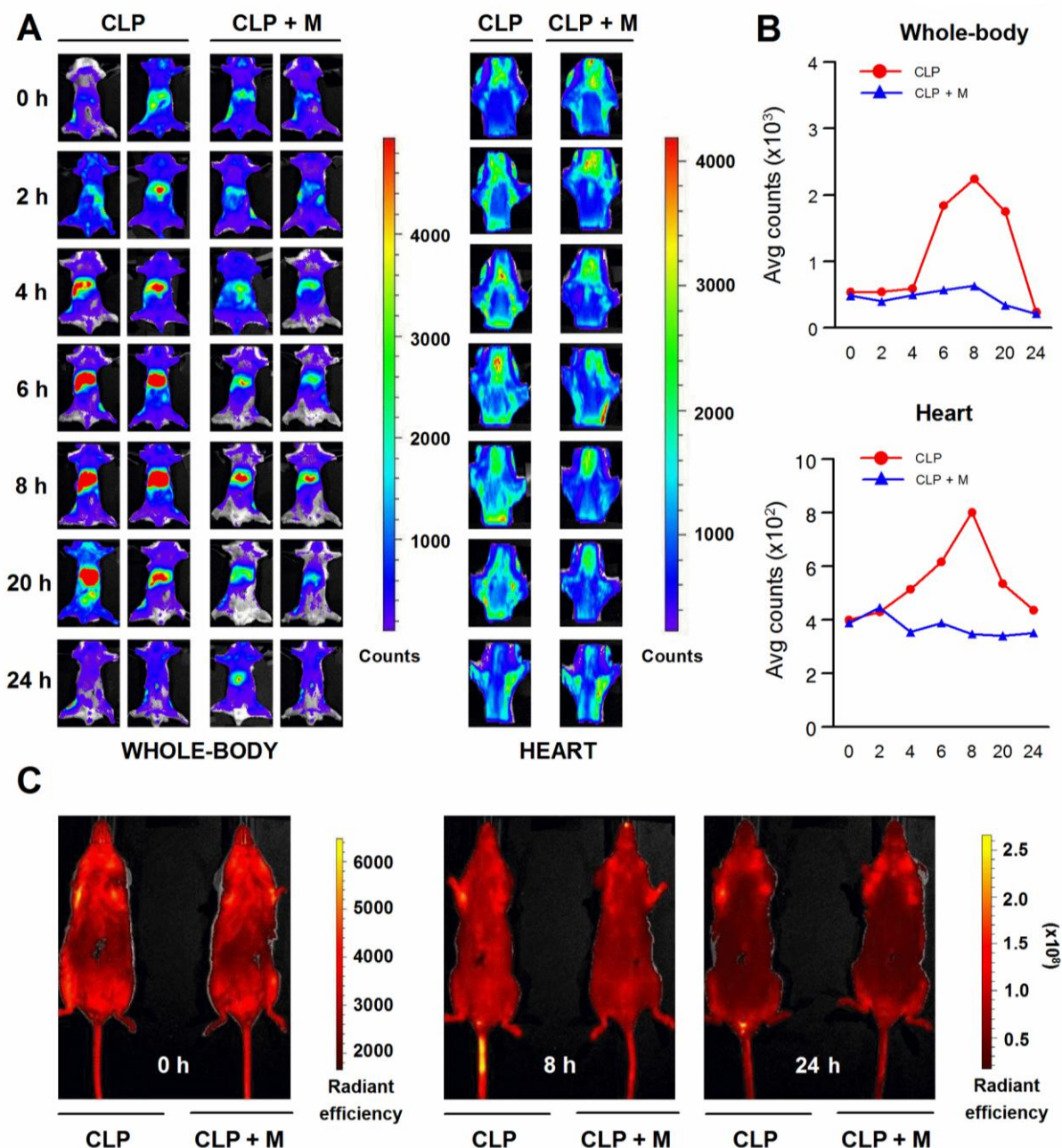


Figura 25. Estudio *in vivo* de los efectos anti-inflamatorios de la melatonina en ratones sépticos. **A)** Análisis cinético *in vivo* de la capacidad de unión de NF- κ B al DNA en ratones *NF- κ B-RE-luc LPTA*® sépticos sin tratar (CLP) o tratados con melatonina (CLP+M). Cada grupo experimental está constituido por 7 ratones. La escala de color indica la intensidad de la bioluminiscencia registrada. **B)** Representación gráfica de la actividad luciferasa media mostrada en A. **C)** Imagen fluorescente de la carga bacteriana en ratones BALB/C sépticos sin tratar (CLP) o tratados con melatonin (CLP+M). Se analizaron 5 ratones por grupo experimental. La escala de color indica la eficiencia de la radiación.

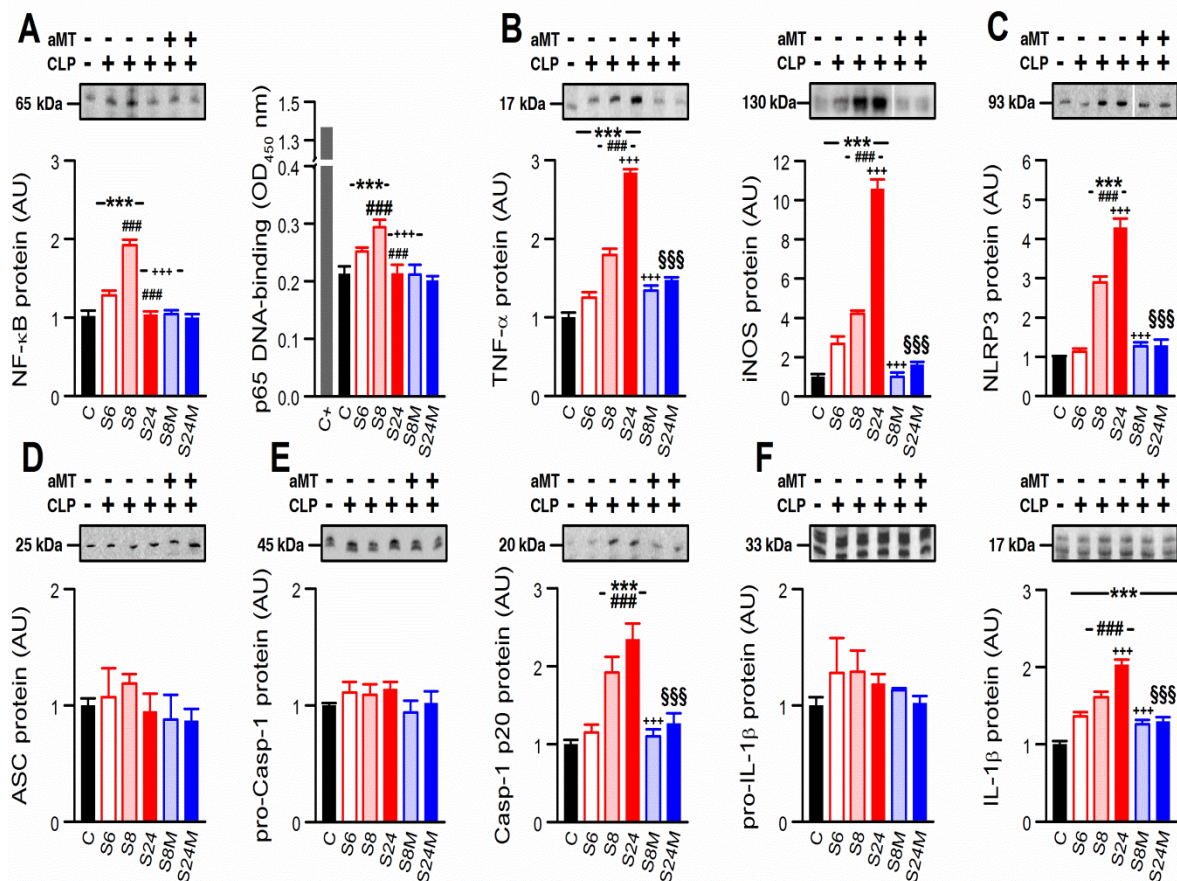


Figura 26. La melatonina inhibe las vías de señalización de NF-κB y NLRP3 en ratones wild-type sépticos. **A)** Análisis cinético *in vitro* de los niveles nucleares y capacidad de unión de NF-κB al DNA. **B)** Western blot representativo de los niveles citosólicos de TNF-α e iNOS. La activación del inflammasoma NLRP3 se evaluó mediante los niveles citosólicos de NLRP3 y ASC (**C, D**), activación de la caspasa-1 (**E**) y maduración de la IL-1β (**F**). Los experimentos se realizaron en corazón de ratones *wild-type* C57BL/6 sépticos con o sin tratamiento con melatonina. Las líneas blancas indican un agrupamiento de imágenes de diferentes partes del mismo gel. Los datos se expresan como la media ± error estándar (SEM), con n= 5 animales por grupo experimental. AU, unidades arbitrarias. C, control *wild-type*; S6, sepsis 6 horas; S8, sepsis 8 horas; S24, sepsis 24 horas; S8M, sepsis 8 horas más tratamiento con melatonina; S24M, sepsis 24 horas más tratamiento con melatonina. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ vs C; ### $P < 0.001$ vs S6; +++ $P < 0.001$ vs S8; §§§ $P < 0.001$ vs S24.

Como consecuencia del efecto mostrado sobre la translocación nuclear y capacidad de unión de NF-κB al DNA, la melatonina reduce de forma significativa tanto los niveles de proteína y expresión de los principales marcadores pro-inflamatorios dependientes de NF-κB, incluidos TNF-α, iNOS, COX-2, pro-IL1β e IFN-γ, los cuales mostraban un incremento

significativo durante el proceso inflamatorio asociado a la sepsis (Figura 26 B y Figura 27 A,D). En general, se observa que la administración de melatonina impide que el estímulo bacteriano cause la activación de la inmunidad innata dependiente de la vía de señalización de NF- κ B.

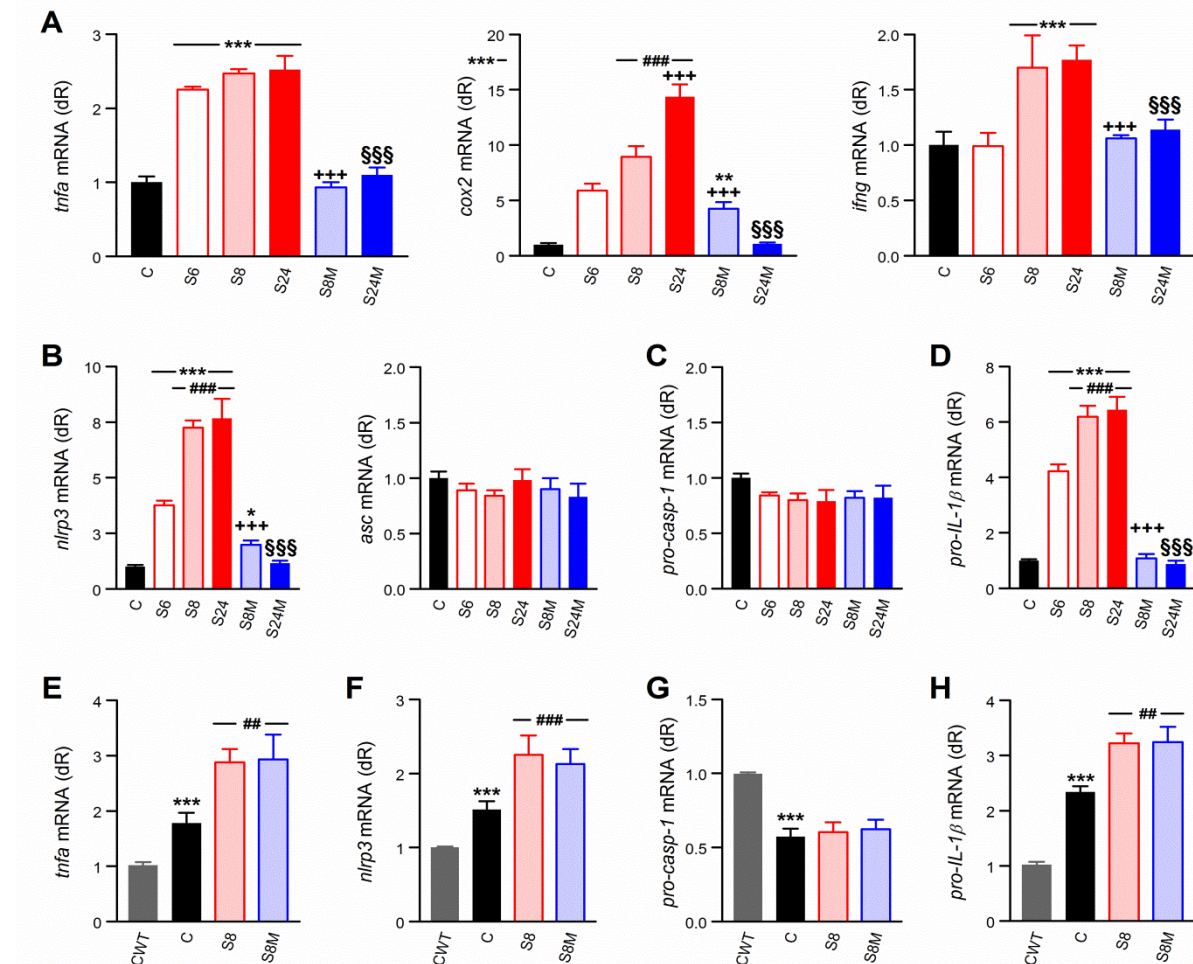


Figura 27. Efecto de la melatonina sobre los niveles de mRNA de mediadores pro-inflamatorios dependientes de NF- κ B e inflammasoma NLRP3 en ratones wild-type y ROR $\alpha^{sg/sg}$ sépticos. (A) Niveles de expresión de *tnfa*, *cox2* e *ifng* (A) y componentes del inflammasoma NLRP3 (B-D) en *wild-type*. Efecto de la sepsis o el tratamiento con melatonina en los niveles de expresión de *tnfa* (E) e inflammasoma NLRP3 (F-G) en ROR $\alpha^{sg/sg}$. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (SEM), con n= 5 animales por grupo experimental. dR, cuantificación relativa. (A-D) C, control *wild-type*; S6, sepsis 6 horas; S8, sepsis 8 horas; S24, sepsis 24 horas; S8M, sepsis 8 horas más tratamiento con melatonina; S24M, sepsis 24 horas más tratamiento con melatonina. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs C and *** $P < 0.001$ vs C; ### $P < 0.001$ vs S6; +++ $P < 0.001$ vs S8; §§§ $P < 0.001$ vs S24. (E-H) CWT, control *wild-type*; C, control ROR $\alpha^{sg/sg}$; S8, sepsis 8 horas ROR $\alpha^{sg/sg}$; S8M, sepsis 8 horas más melatonina ROR $\alpha^{sg/sg}$. *** $P < 0.001$ vs CWT; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs C.

Nuestro siguiente paso fue preguntarnos si el inflamasoma NLRP3 mostraba el mismo perfil temporal de activación que el observado para NF- κ B, lo que sin duda explicaría la respuesta inflamatoria desproporcionada característica de la sepsis. En este sentido, los niveles de mRNA y proteína de NLRP3 incrementaron de forma significativa durante todo el proceso séptico, mientras que la expresión y niveles proteicos de ASC no se vieron modificados (**Figura 26 C, D y Figura 27 B**). A pesar de no observarse cambios significativos en los niveles de proteína y mRNA de la procaspasa-1 (**Figura 26 E y Figura 27 C**), en ratones *wild-type* la sepsis incrementa los niveles de la forma biológicamente activa de caspasa-1 e IL-1 β madura, lo que nos indica una marcada activación del inflamasoma NLRP3 (**Figura 26 E, F**). El tratamiento con melatonina reduce significativamente la expresión y niveles de proteína de NLRP3, caspasa-1 activa e IL-1 β madura recuperando los valores control. Sin embargo, los niveles de mRNA y proteína de ASC y pro-caspasa-1 se mantienen constantes con respecto al control y los diferentes grupos sépticos (**Figura 26 C-F y Figura 27 B, C**). De forma conjunta, nuestros datos demuestran que la melatonina inhibe la inducción de las dos principales vías de señalización implicadas en la respuesta inmune innata durante la sepsis, interrumpiendo por tanto la conexión entre NF- κ B y NLRP3.

2. LA MELATONINA NO TIENE EFECTO SOBRE LOS EVENTOS CITOSÓLICOS IMPLICADOS EN LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B

Los pasos experimentales siguientes se diseñaron con el objetivo de determinar los mecanismos moleculares por los cuales la melatonina inhibe la vía de señalización de NF- κ B. En primer lugar, nuestro estudio se centró, en la vía citosólica que conduce a la translocación nuclear de NF- κ B y su posterior activación transcripcional. En este sentido, observamos que los niveles proteicos de IRAKs y de las subunidades catalíticas del complejo IKK no varían

tras el tratamiento con melatonina en ratones *wild-type* en comparación con el grupo séptico (Figura 28 A, B). Asimismo, la melatonina no afecta la expresión y los niveles citosólicos del inhibidor IκBα, si bien se aprecia un descenso aún más significativo en sus niveles nucleares (Figura 29 A).

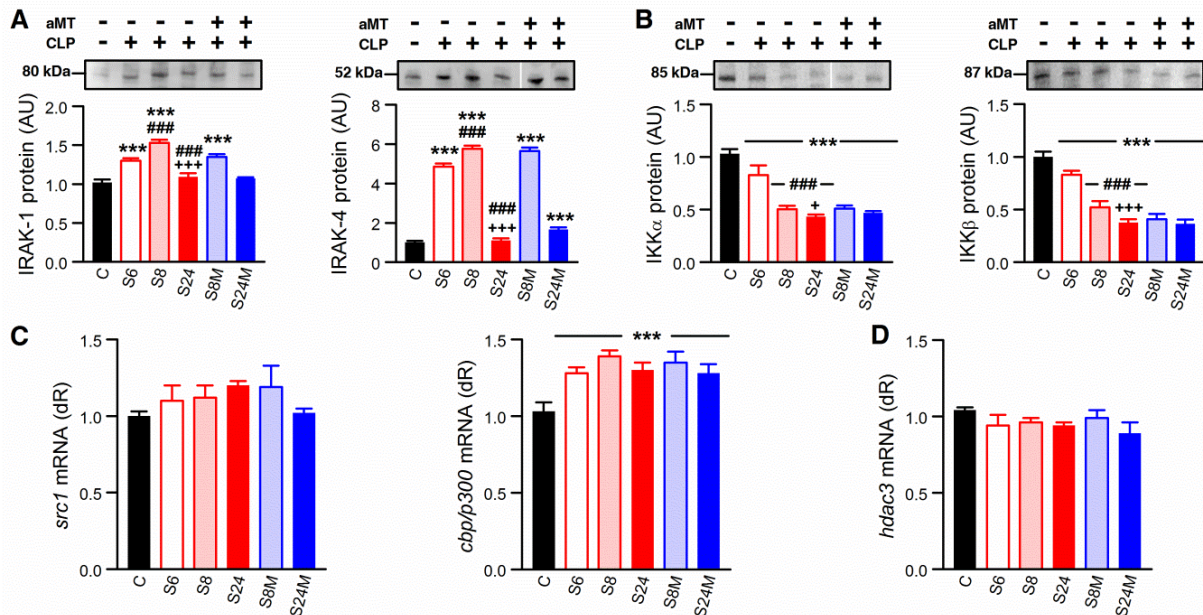


Figura 28. Efecto de la melatonina sobre la vía citosólica e HAT/HDACs clásicas implicadas en la activación de NF-κB. Niveles citosólicos de IRAK-1 e IRAK-4 (A) y de las subunidades catalíticas IKKα e IKKβ (B) en ratones *wild-type*. Efecto de la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la expresión de HAT/HDACs, incluidas *src-1*, *hdac3* y *cbp/p300*, en ratones *wild-type* (C). Los datos se expresan como la media ± error estándar (SEM), con n= 4-5 animales por grupo experimental. AU, unidades arbitrarias; dR, cuantificación relativa. C, control *wild-type*; S6, sepsis 6 horas; S8, sepsis 8 horas; S24, sepsis 24 horas; S8M, sepsis 8 horas más tratamiento con melatonina; S24M, sepsis 24 horas más tratamiento con melatonina ***P < 0.001 vs C; ### P < 0.001 vs S6; +P < 0.05 y +++P < 0.001 vs S8.

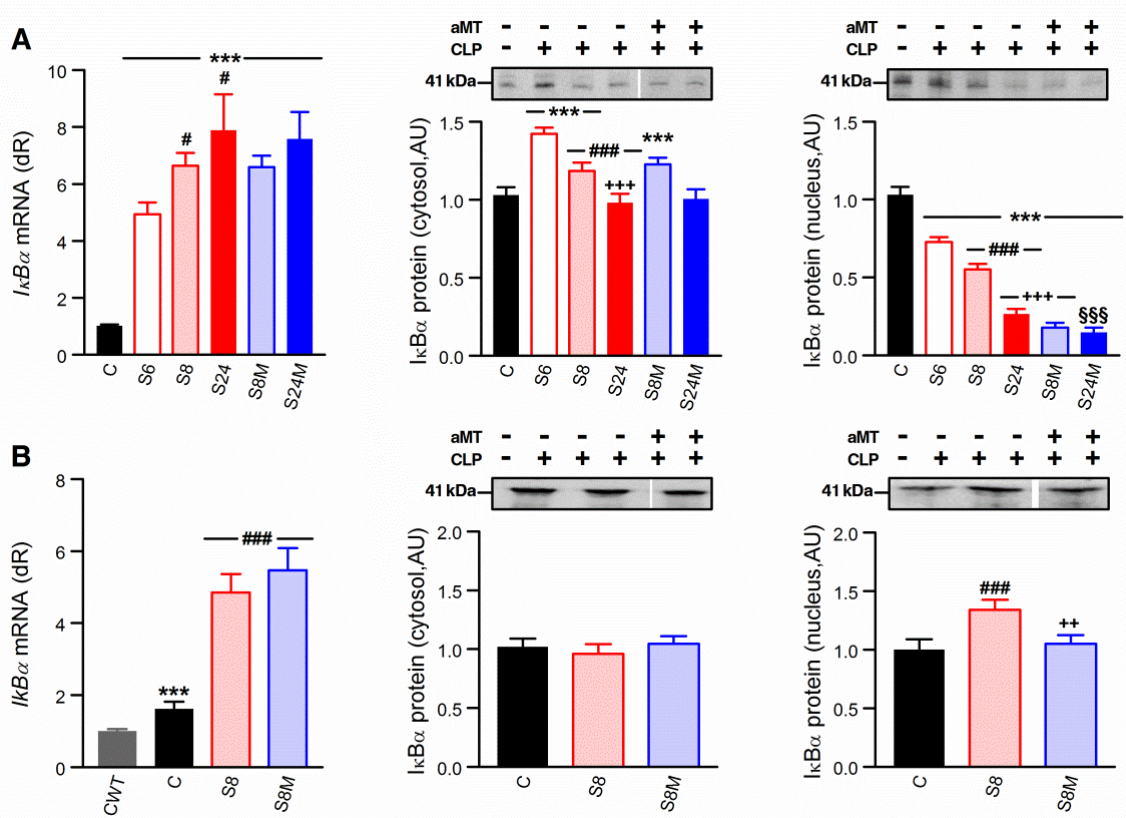


Figura 29. Efecto de la melatonina sobre el reciclaje de $I\kappa B\alpha$ en ratones wild-type y $ROR\alpha^{sg/sg}$. Niveles de mRNA y contenido proteico citosólico y nuclear del inhibidor $I\kappa B\alpha$ en ratones *wild-type* (A) y ratones $ROR\alpha^{sg/sg}$ (B) durante la sepsis con o sin tratamiento con melatonina. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (SEM), con $n=5$ animales por grupo experimental. AU, unidades arbitrarias; dR, cuantificación relativa. (A) C, control *wild-type*; S6, sepsis 6 horas; S8, sepsis 8 horas; S24, sepsis 24 horas; S8M, sepsis 8 horas más tratamiento con melatonina; S24M, sepsis 24 horas más tratamiento con melatonina $***P < 0.001$ vs C; # $P < 0.05$ y $###P < 0.001$ vs S6; $+++P < 0.001$ vs S8; $§§§P < 0.001$ vs S24. (B) CWT, control *wild-type*; C, control $ROR\alpha^{sg/sg}$; S8, sepsis 8 horas $ROR\alpha^{sg/sg}$; S8M, sepsis 8 horas más melatonina $ROR\alpha^{sg/sg}$. $***P < 0.001$ vs CWT; $###P < 0.001$ vs C; $++P < 0.01$ vs S8.

3. CONEXIÓN ENTRE LOS EFECTOS DE LA MELATONINA Y LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ROR α /Sirtuina-1

Hasta este punto, nuestros resultados sugieren que la melatonina inhibe la actividad transcripcional de NF- κ B una vez que éste ha sido activado por la señal pertinente y translocado al núcleo. Sin embargo, al analizar la expresión de HAT/HDACs clásicas, como por ejemplo *src-1*, *hdac3* y *cbp/p300*, observamos que el tratamiento con melatonina no produce ningún efecto en comparación con los niveles de expresión registrados durante la sepsis (**Figura 28 C, D**). Por el contrario, en corazón de ratones *wild-type* la respuesta inflamatoria asociada al proceso séptico así como el tratamiento con melatonina van a provocar cambios significativos sobre la vía de señalización dependiente del receptor nuclear ROR α (**Figura 30**). En este sentido, la sepsis incrementa la expresión y los niveles citosólicos de ROR α , mientras que se aprecia un descenso en su contenido nuclear (**Figura 30 A**). Estos cambios tienen lugar de forma paralela a un aumento en la expresión del correpresor *rev-erba*, lo que supone una inhibición de la actividad transcripcional dependiente de ROR α al observarse que la expresión de sus genes diana *bmal1* y *clock* permanece constante en el grupo control y los diferentes grupos sépticos (**Figura 30 B, C**). Asimismo, la actividad transcripcional de ROR α y NF- κ B es regulada conjuntamente por la sirtuina-1 (Sirt1) deacetilasa dependiente de NAD⁺ (Nakahata et al., 2008; Yeung et al., 2004). Como muestra la **figura 30 D**, la expresión y los niveles nucleares de Sirt1 aumentan significativamente durante la sepsis. Este aumento se observa igualmente en los niveles de mRNA de *nampt*, la enzima limitante en la biosíntesis de NAD⁺, si bien los niveles de NAD⁺ se reducen drásticamente durante la sepsis. Por tanto, los niveles de p65 acetilado en el residuo Lys310, una de las principales dianas de la actividad deacetilasa de Sirt1, permanecen elevados durante la sepsis (**Figura 30 E, F**).

La administración de melatonina en los ratones *wild-type* con sepsis previene estos cambios producidos sobre la vía de señalización dependiente de ROR α . De hecho, la melatonina no sólo incrementa aún más los niveles de mRNA de ROR α sino que contrarresta el descenso en su contenido nuclear, aumentando los niveles de ROR α incluso por encima de los valores control. La melatonina reduce de forma paralela la expresión de *rev-erba* recuperando los valores control y, en consecuencia, la expresión de *bmal1* y *clock* aumenta de forma significativa tras el tratamiento (**Figura 30 A-C**). Asimismo, tras la administración de melatonina, la expresión y contenido nuclear de Sirt1 son significativamente mayores con respecto a los cambios observados durante la sepsis (**Figura 30 D**). Sin embargo, la expresión de *nampt* no varía tras el tratamiento con melatonina, a pesar de contrarrestar la depleción de NAD⁺ a nivel del control, lo que provoca un descenso en los niveles de p65 acetilado en su residuo Lys310 restableciendo los valores basales (**Figura 30 E, F**). Estos datos sugieren que la conexión entre melatonina y la vía de señalización ROR α /Sirt1 es indispensable para los efectos anti-inflamatorios mostrados por la indolamina sobre la vía de NF- κ B durante la inflamación.

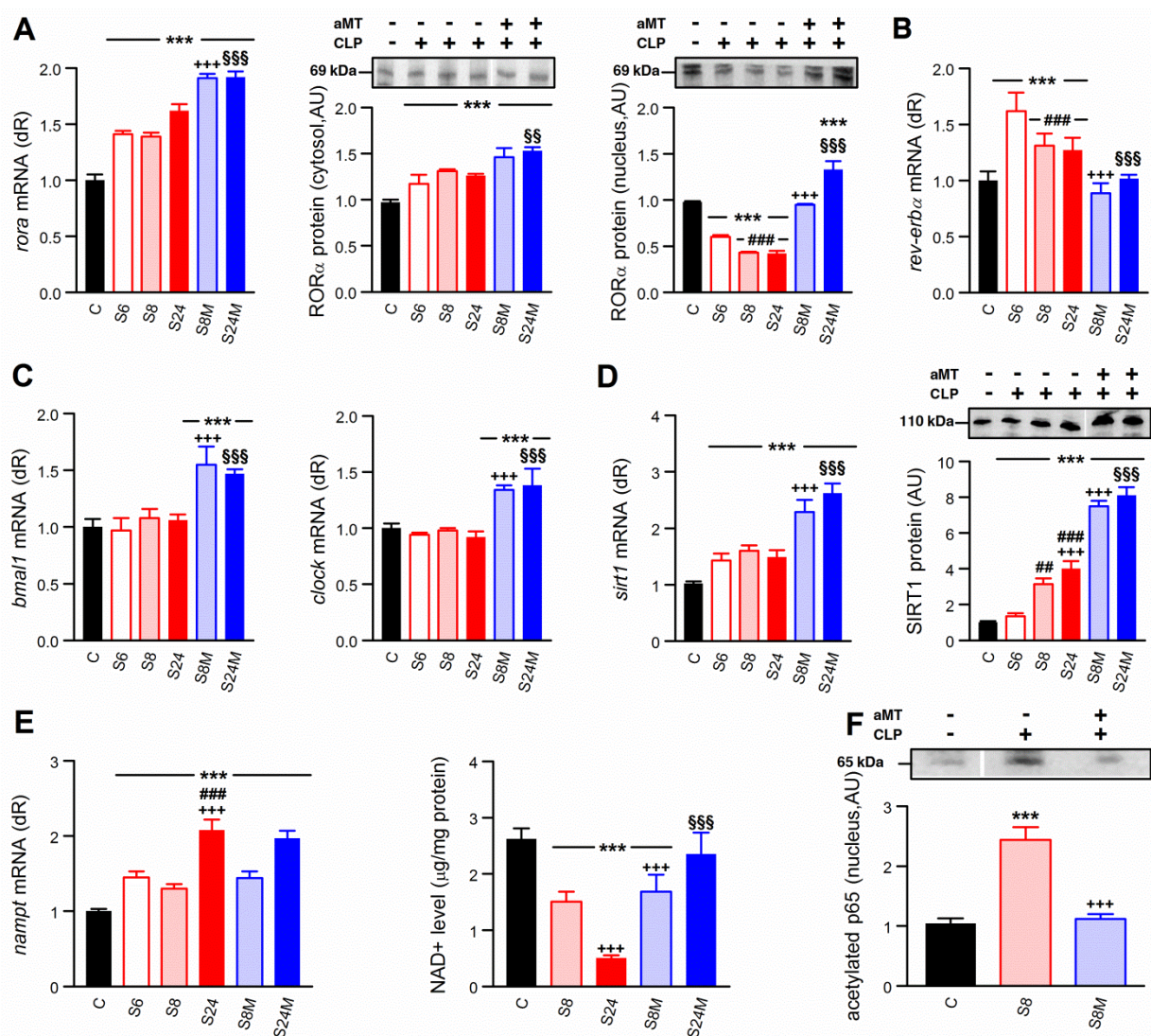


Figura 30. La deacetilación de NF-κB dependiente de Sirt1 es esencial para la acción anti-inflamatoria de la melatonina. (A) Niveles de mRNA y contenido proteico citosólico y nuclear de RORα. (B, C) Expresión de genes implicados en la maquinaria circadiana: *rev-erba*, *bmal1* y *clock*. (D) Expresión y contenido nuclear de Sirt1. (E) Efectos de la sepsis o tratamiento con melatonina sobre la expresión de *nampt* y los niveles de NAD+. (F) Western blot de los niveles nucleares de p65 acetilado. Los experimentos se realizaron en corazón de ratones *wild-type* C57BL/6 sépticos con o sin tratamiento con melatonina. Las líneas blancas indican un agrupamiento de imágenes de diferentes partes del mismo gel. Los datos se expresan como la media ± error estándar (SEM), con n= 5-7 animales por grupo experimental. AU, unidades arbitrarias; dR, cuantificación relativa. C, control *wild-type*; S6, sepsis 6 horas; S8, sepsis 8 horas; S24, sepsis 24 horas; S8M, sepsis 8 horas más tratamiento con melatonina; S24M, sepsis 24 horas más tratamiento con melatonina. ****P* < 0.001 vs C; ## *P* < 0.001 y ### *P* < 0.001 vs S6; +++*P* < 0.001 vs S8; \$\$\$*P* < 0.001 vs S24.

4. LA AUSENCIA DE ROR α SUPRIME LA INHIBICIÓN DE LA MELATONINA SOBRE NF- κ B

En base a los datos presentados en la **figura 30**, nuestra hipótesis es que el bloqueo de la vía de señalización de ROR α inhibiría la acción anti-inflamatoria de la melatonina. En este sentido, el grupo control de los ratones mutantes para ROR α (ROR $\alpha^{sg/sg}$) muestran una capacidad de unión de NF- κ B al DNA significativamente mayor que en los ratones *wild-type* (**Figura 26 A versus Figura 31 A**). Asimismo, la translocación nuclear de NF- κ B en respuesta al estímulo séptico es significativamente mayor en ratones ROR $\alpha^{sg/sg}$ en comparación con los ratones *wild-type*, si bien este aumento no se traduce en una mayor unión de NF- κ B al DNA durante la sepsis en ratones ROR $\alpha^{sg/sg}$ (**Figura 26 A versus Figura 31 A**). En consecuencia, aumenta la expresión constitutiva de los mediadores pro-inflamatorios dependientes de NF- κ B, incluidos TNF- α , pro-IL-1 β e iNOS, en corazón de ratones ROR $\alpha^{sg/sg}$. La sepsis incrementa aún más la expresión y contenido proteico de estos mediadores pro-inflamatorios, alcanzando un nivel de inducción similar al observado en ratones *wild-type* (**Figura 26 B; Figura 27 A versus Figura 27 E, H; Figura 31 B, C, F**). Los ratones mutantes para ROR α no muestran cambios en la translocación nuclear y capacidad de unión de NF- κ B al DNA después del tratamiento con melatonina (**Figura 26 A versus Figura 31 A**) y, en consecuencia, la melatonina falla a la hora de prevenir el aumento en la expresión y niveles proteicos de TNF- α , pro-IL-1 β e iNOS en ratones ROR $\alpha^{sg/sg}$ sépticos (**Figura 27 E, H; Figura 31 B, C y F**). Estos datos sugieren que la melatonina requiere al receptor nuclear ROR α para inhibir la respuesta inflamatoria dependiente de NF- κ B durante la sepsis.

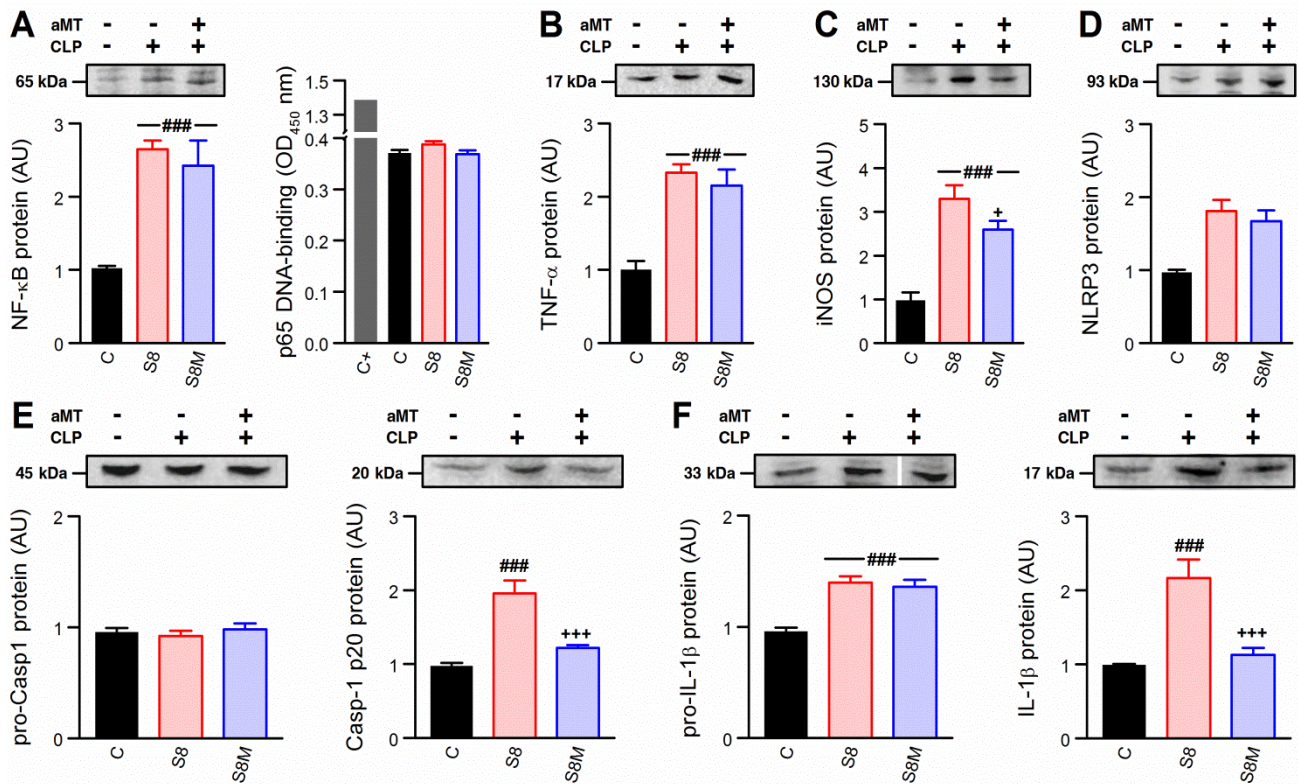


Figura 31. La melatonina inhibe la respuesta inflamatoria dependiente de NF-κB, pero no la activación del inflamasoma, mediante mecanismos de señalización dependientes de RORα. (A) Niveles nucleares y capacidad de unión de NF-κB al DNA en ratones RORα^{sg/sg}. (B, C) Western blot de los niveles citosólicos de TNF-α e iNOS. Los efectos de la melatonina sobre la activación de NLRP3 se analizan a partir de los niveles proteicos de NLRP3 (D), pro-caspasa-1 y caspasa-1 activa (E), e IL-1β madura (F). Los experimentos se realizaron en corazón de ratones RORα^{sg/sg} sépticos con o sin tratamiento con melatonina. Las líneas blancas indican un agrupamiento de imágenes de diferentes partes del mismo gel. Los datos se expresan como la media ± error estándar (SEM), con n= 5 animales por grupo experimental. AU, unidades arbitrarias. C, control RORα^{sg/sg}; S8, sepsis 8 horas RORα^{sg/sg}; S8M, sepsis 8 horas más melatonina RORα^{sg/sg}. ### $P < 0.001$ vs C; + $P < 0.05$ y +++ $P < 0.001$ vs S8.

5. LA MELATONINA INHIBIFE LA MADURACIÓN DE IL-1 β EN AUSENCIA DE ROR α

Estos resultados nos obliga a evaluar el papel que cumple el receptor nuclear ROR α en el efecto inhibitor de la melatonina sobre el inflammasoma NLRP3. Los ratones ROR $\alpha^{sg/sg}$ mostraron una mayor expresión basal de *nlrp3* con respecto a los ratones *wild-type*; durante la sepsis, los niveles de mRNA y proteína de NLRP3 aumentaron de forma significativa, si bien este incremento fue menor al compararlo con el observado en ratones *wild-type* sépticos (**Figura 26 C; Figura 27 B versus Figura 27 F; Figura 31 D**). Por el contrario, los ratones mutantes presentaron una menor expresión constitutiva de la pro-caspasa-1, sin que su expresión o los niveles proteicos presentes en el citosol se vean afectados por la sepsis o el tratamiento con melatonina (**Figura 27 G, Figura 31 E**). A pesar de esto, la sepsis induce una marcada activación del inflammasoma NLRP3 en ratones ROR $\alpha^{sg/sg}$. En efecto, los niveles de caspasa-1 activa e IL-1 β madura aumentan a las 8 horas del proceso séptico, alcanzando valores superiores a los mostrados por ratones *wild-type* sépticos (**Figura 26 E-F versus Figura 31 E-F**).

La administración de melatonina en ratones mutantes sépticos previene muchos de los cambios producidos sobre el inflammasoma NLRP3. De hecho, aunque la melatonina no tiene ningún efecto sobre la expresión y niveles de proteína de NLRP3, inhibe la actividad de la caspasa-1 y, en consecuencia, reduce los niveles de IL-1 β madura (**Figura 27 F-H; Figura 31 D-F**). Nuestros datos indican, por tanto, que la melatonina inhibe la activación de la caspasa-1 mediada por NLRP3 y la consecuente maduración de IL-1 β mediante mecanismos independientes del receptor nuclear ROR α .

6. LA DEACETILACIÓN DE NF- κ B MEDIADA POR Sirt-1 REQUIERE LA PARTICIPACIÓN DE ROR α

Para indagar más sobre el papel de ROR α en las acciones anti-inflamatorias de la melatonina, nuestro siguiente paso consistió en analizar la expresión y translocación nuclear del inhibidor I κ B α , al ser éste un hipotético gen diana de ROR α (Delerive et al., 2001). Los ratones ROR $\alpha^{sg/sg}$ mostraron una mayor expresión constitutiva de I κ B α , observándose un mayor aumento durante la sepsis si bien no es tan marcado como el observado en ratones wild-type sépticos (**Figura 29 A, B**). Además, los niveles citosólicos de I κ B α permanecen constantes en ratones mutantes controles y sépticos, lo que va a permitir un aumento significativo en los niveles nucleares de I κ B α durante la sepsis en los ratones ROR $\alpha^{sg/sg}$ (**Figura 29 A, B**). El tratamiento con melatonina no afecta los niveles de expresión de I κ B α o su contenido citosólico en ratones *wild-type* y mutantes para ROR α , mientras que disminuye significativamente su contenido nuclear (**Figura 29**). Este descenso, más que relacionarse con una mayor capacidad de unión de I κ B α a NF- κ B, puede reflejar unos mayores niveles de p65 deacetilado tras la administración de melatonina (Chen et al., 2001).

La **figura 32** muestra la importancia de la conexión ROR α -Sirt1 en la acción anti-inflamatoria de la melatonina sobre la respuesta inflamatoria dependiente de NF- κ B. La mutación en el gen *rora* (**Figura 32 A**) provoca que los ratones ROR $\alpha^{sg/sg}$ muestren una mayor expresión basal de *rev-erba* y, en consecuencia, menores niveles de mRNA de *bmal1* en comparación con los ratones *wild-type*, si bien la expresión de *clock* no difiere significativamente entre las dos cepas. La respuesta inflamatoria asociada a la sepsis induce una fuerte caída en la expresión de estos genes, mientras que el tratamiento con melatonina no produce ningún efecto (**Figura 32 B, C**). Junto a esta deficiencia en la maquinaria circadiana, los ratones ROR $\alpha^{sg/sg}$ muestran una expresión constitutiva de Sirt1

significativamente menor que en los ratones *wild-type*. Esta expresión de Sirt1 es inducida en ratones $ROR\alpha^{sg/sg}$ sépticos, si bien no se corresponde con un aumento paralelo en el contenido nuclear de la deacetilasa. La administración de melatonina no modifica los niveles de mRNA de Sirt1 con respecto al grupo séptico, pero sí provoca un ligero incremento en sus niveles nucleares (**Figura 32 D**). Sin embargo, la expresión de *nampt* no varía con la sepsis o tras el tratamiento con melatonina en ratones $ROR\alpha^{sg/sg}$. Además, los niveles basales de NAD⁺ en esta cepa son significativamente menores que en los ratones *wild-type*, observándose además una importante depleción durante la sepsis que no va a ser contrarrestada por la administración de melatonina (**Figura 32 E**). En consecuencia, los niveles de p65 acetilado en su residuo Lys310 fueron superiores a los mostrados por los ratones *wild-type*, manteniéndose dichos niveles sin cambios durante la sepsis y el tratamiento con melatonina (**Figura 32 F**). En definitiva, estos resultados confirman que la melatonina inhibe los procesos inflamatorios dependientes de NF- κ B incrementando su deacetilación en el residuo Lys310 por la Sirt1 a través de mecanismos dependientes de $ROR\alpha$.

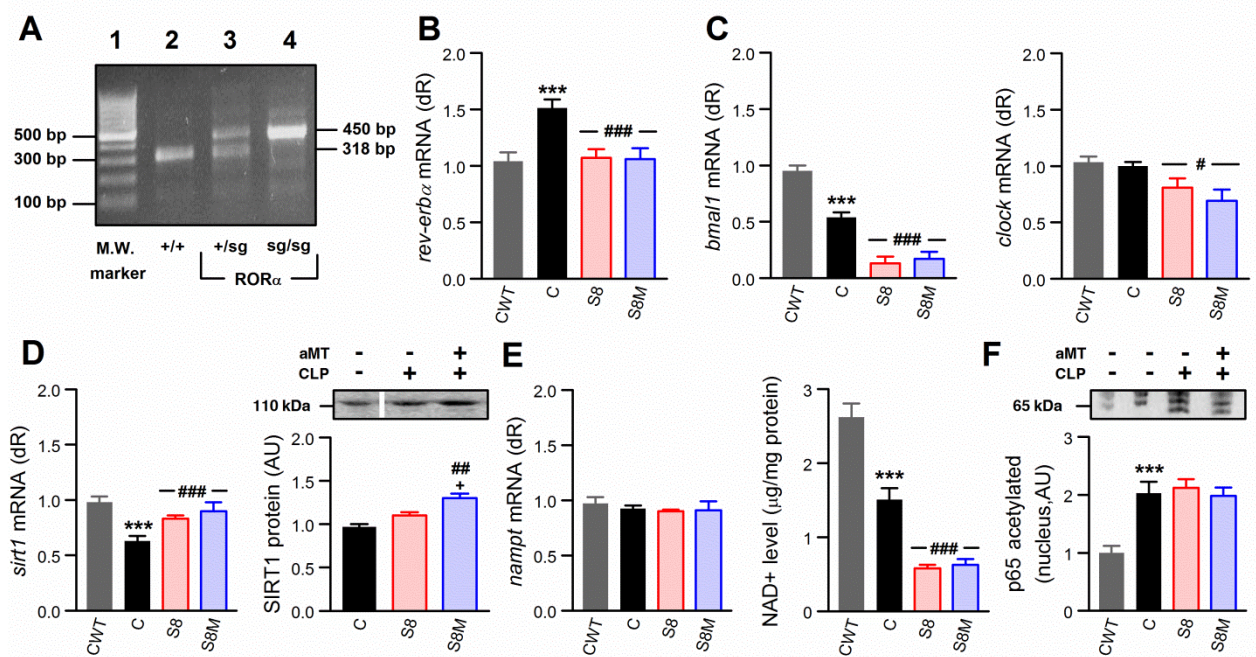


Figura 32. La delección de ROR α impide la deacetilación mediada por Sirt1 de p65 por la melatonina (A) Gel representativo de la delección genómica de 6.5 kb en el exón que codifica para el dominio de unión al ligando de ROR α . (B, C) Expresión de los genes circadianos *rev-erba*, *bmal1* y *clock*. (D) Niveles de mRNA y contenido nuclear de Sirt1. (E) Efecto de la mutación en ROR α sobre la expresión de *nampt* y los niveles de NAD⁺. (F) Western Blot de los niveles acetilados de p65. Los experimentos se realizaron en corazón de ratones ROR α *sg/sg* sépticos con o sin tratamiento con melatonina. Las líneas blancas indican un agrupamiento de imágenes de diferentes partes del mismo gel. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (SEM), con n= 5 animales por grupo experimental. AU, unidades arbitrarias; dR, cuantificación relativa. CWT, control *wild-type*; C, control ROR α *sg/sg*; S8, sepsis 8 horas ROR α *sg/sg*; S8M, sepsis 8 horas más melatonina ROR α *sg/sg*. *** $P < 0.001$ vs CWT; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs C; + $P < 0.05$.

7. LA MELATONINA REQUIERE ROR α PARA MODULAR LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE

Para finalizar, se examinaron los cambios que inducen tanto el proceso inflamatorio como el tratamiento con melatonina en el estado redox citosólico y mitocondrial, estudio que nos va a permitir comprender aún mejor los efectos antisépticos mostrados por la indolamina. En este sentido, y a pesar del aumento en la primera (SOD1) y segunda (GPx) línea de defensa antioxidante (**Figura 33 A, B; Figura 34 A, B**), el descenso observado en la expresión y actividad de la GRd, junto con la ausencia de cambios en la catalasa, hacen que la sepsis reduzca considerablemente la capacidad antioxidante celular (**Figura 33 C, D; Figura 34 C, D**). En la mitocondria, la sepsis induce de forma tiempo-dependiente la expresión del factor 1 inducible por hipoxia (*hif1a*) y reduce de forma significativa el consumo de oxígeno mitocondrial (**Figura 33 I**). El tratamiento con melatonina modifica notablemente el patrón de expresión y actividad de los sistemas antioxidantes, reduciendo la expresión y actividad de SOD1 y GPx hasta valores cercanos al grupo control al tiempo que incrementa la expresión y actividad de la GRd por encima de los valores control (**Figura 33 A-C; Figura 34 A-C**). Asimismo, la melatonina aumenta significativamente la expresión de la catalasa, si bien no muestra ningún efecto notable sobre su actividad (**Figura 33 D; Figura 34 D**). A nivel mitocondrial, la melatonina restablece el consumo de oxígeno y reduce la expresión de *hif1a* recuperando, por tanto, la función mitocondrial que había sido dañada durante la sepsis (**Figura 33 I**).

Por el contrario, los ratones mutantes para ROR α mostraron graves deficiencias en la respuesta antioxidante durante la sepsis y el tratamiento con melatonina. De hecho, la expresión basal de *sod1*, y especialmente *gpx* y *grd*, fueron significativamente mayores con respecto a los ratones *wild-type* (**Figura 34 E-G**). Sin embargo, mientras la actividad basal de

SOD1 y catalasa fue más alta en ratones $ROR\alpha^{sg/sg}$, la GPx muestra una menor actividad en comparación con los ratones *wild-type*, sin observarse cambios significativos en la actividad basal de la GRd entre ambas cepas de ratón (**Figura 33 E-H**). Además, los ratones $ROR\alpha^{sg/sg}$ sufren profundas alteraciones en la síntesis y reciclaje del glutation (GSH) al mostrar una menor expresión de la gamma-glutamylcisteína sintasa (*γgcs*) que en los ratones *wild-type*, mientras que la expresión de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*g6pd*) no varía entre ambas cepas (**Figura 34 H**). En estas condiciones, los ratones $ROR\alpha^{sg/sg}$ sólo disponen de una catalasa efectiva para hacer frente a la formación basal de H_2O_2 . En estos ratones la sepsis provoca una menor expresión de *g6pd*, mientras que la expresión y actividad de las diferentes enzimas antioxidantes analizadas no varía. La administración de melatonina sólo incrementa la actividad de la catalasa en los ratones $ROR\alpha^{sg/sg}$ por encima de los valores control, mientras que no produce ningún efecto en la actividad y expresión de las restantes enzimas antioxidantes (**Figura 33 E-H; Figura 34 E-H**). A nivel mitocondrial, el consumo de oxígeno se reduce significativamente en la sepsis en ratones $ROR\alpha^{sg/sg}$; sin embargo, esta reducción es menor a la observada en ratones *wild-type* (**Figura 33 I, J**). El tratamiento con melatonina no es capaz de restablecer la expresión de *hif1a* incrementada en ratones $ROR\alpha^{sg/sg}$ sépticos y, en consecuencia, la recuperación del consumo de oxígeno mitocondrial no alcanza los valores del grupo control (**Figura 33 J**). Por tanto, la delección en el gen *rora* impide a la melatonina restaurar el estado redox citosólico y mitocondrial profundamente alterado durante la respuesta inflamatoria asociada a la sepsis.

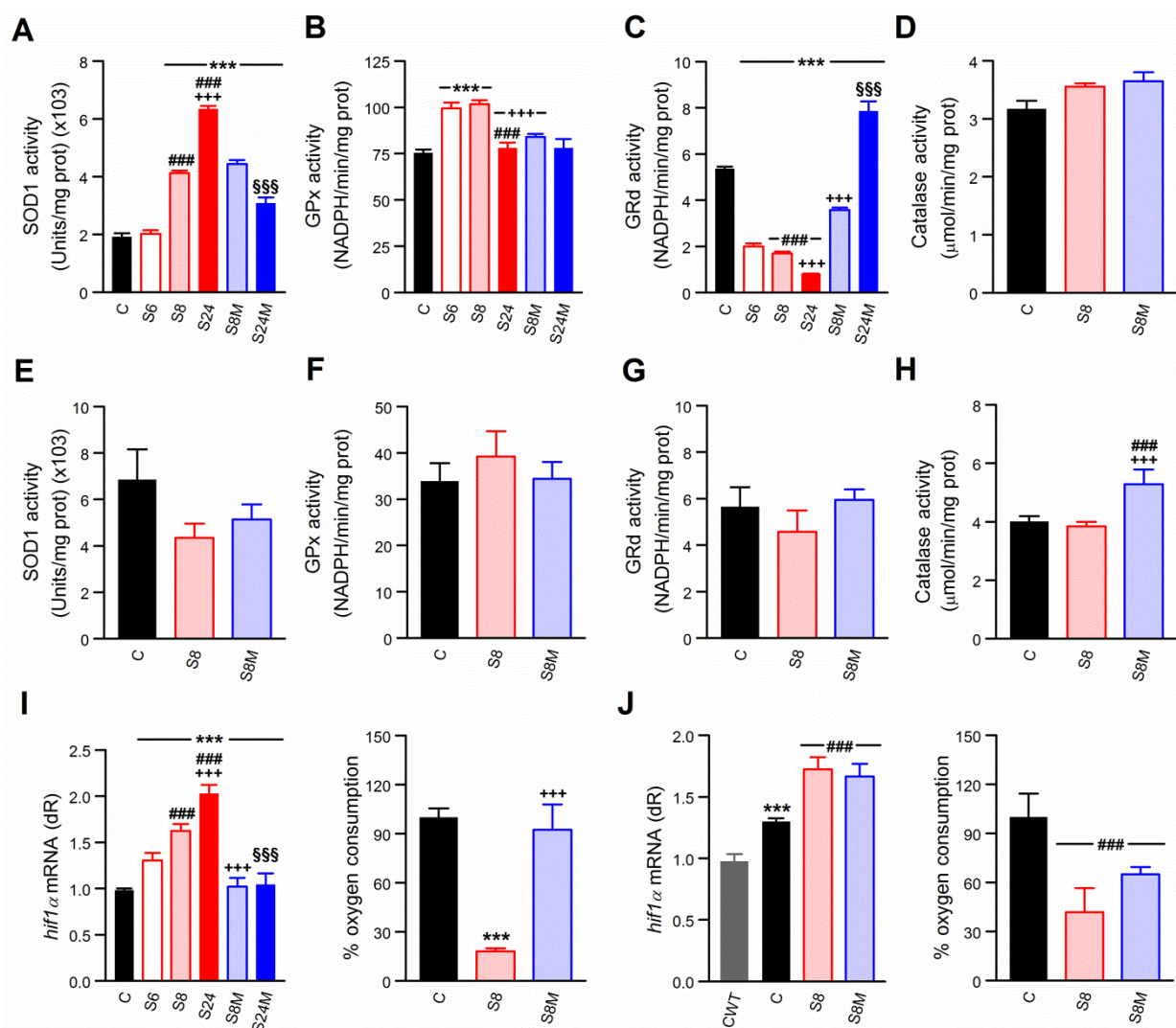


Figura 33. ROR α cumple un papel esencial en la acción antioxidante de la melatonina. Actividades enzimáticas de la SOD1, GPx, GRd y catalasa en ratones *wild-type* (A-D) y ROR $\alpha^{sg/sg}$ (E-H). Expresión de *hif1 α* y consumo de oxígeno mitocondrial en ratones *wild-type* (I) y ROR $\alpha^{sg/sg}$ (J). Los experimentos se realizaron en corazón de ratones *wild-type* o ROR $\alpha^{sg/sg}$ sépticos con o sin tratamiento con melatonina. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (SEM), con n= 7-8 animales por grupo experimental. dR, cuantificación relativa. (A-D, I) C, control *wild-type*; S6, sepsis 6 horas; S8, sepsis 8 horas; S24, sepsis 24 horas; S8M, sepsis 8 horas más tratamiento con melatonina; S24M, sepsis 24 horas más tratamiento con melatonina. *** P < 0.001 vs C; ### P < 0.001 vs S6; +++ P < 0.001 vs S8; §§§ P < 0.001 vs S24. (E-H, J) CWT, control *wild-type*; C, control ROR $\alpha^{sg/sg}$; S8, sepsis 8 horas ROR $\alpha^{sg/sg}$; S8M, sepsis 8 horas más melatonina ROR $\alpha^{sg/sg}$. *** P < 0.001 vs CWT; ### P < 0.001 vs C; +++ P < 0.001 vs S8

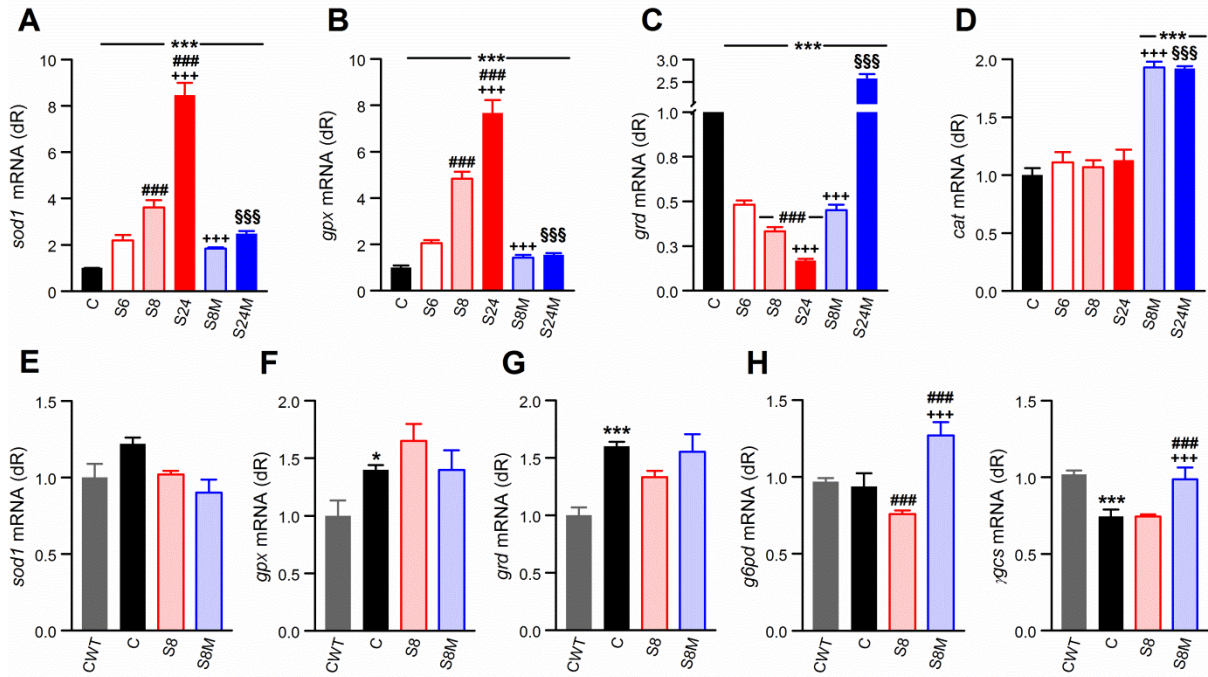


Figura 34. La melatonina regula la expresión de enzimas antioxidantes en ratones *wild-type* pero no en ratones $ROR\alpha^{sg/sg}$. Cambios inducidos por la respuesta inflamatoria y el tratamiento con melatonina sobre la expresión de los enzimas antioxidantes en ratones *wild-type* (A-D) y $ROR\alpha^{sg/sg}$ (E-H). Los experimentos se realizaron en corazón de ratones *wild-type* o $ROR\alpha^{sg/sg}$ sépticos con o sin tratamiento con melatonina. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (SEM), con $n=4-6$ animales por grupo experimental. dR, cuantificación relativa. (A-D) C, control *wild-type*; S6, sepsis 6 horas; S8, sepsis 8 horas; S24, sepsis 24 horas; S8M, sepsis 8 horas más tratamiento con melatonina; S24M, sepsis 24 horas más tratamiento con melatonina. $***P < 0.001$ vs C; $### P < 0.001$ vs S6; $+++P < 0.001$ vs S8; $§§§P < 0.001$ vs S24. (E-H) CWT, control *wild-type*; C, control $ROR\alpha^{sg/sg}$; S8, sepsis 8 horas $ROR\alpha^{sg/sg}$; S8M, sepsis 8 horas más melatonina $ROR\alpha^{sg/sg}$. $*P < 0.05$ y $***P < 0.001$ vs CWT; $### P < 0.001$ vs C; $+++P < 0.001$ vs S8

DISCUSIÓN

En este estudio se demuestra, por primera vez, que en miocardio de ratones sépticos la interconexión entre la vía de señalización de NF- κ B y el inflamasoma NLRP3 no sólo induce una respuesta inflamatoria desproporcionada a la invasión microbiana, sino que además constituye una explicación fiable del fallo observado en las terapias anti-inflamatorias clásicas (Escames et al., 2012; Galley, 2010). Estudios anteriores confirman que el tratamiento con melatonina mejora el resultado clínico de la sepsis tanto en pacientes como en modelos animales experimentales (Escames et al., 2007; Gitto et al., 2001; Ortiz et al., 2014), si bien se desconocen en detalle los mecanismos moleculares que median estos efectos terapéuticos de la melatonina. En este trabajo hemos estudiado las posibles dianas moleculares con un papel importante en la activación durante la sepsis de las vías de NF- κ B y el inflamasoma NLRP3, centrando nuestro interés en la participación del receptor nuclear ROR α en las acciones anti-inflamatorias y antioxidantes de la melatonina (**Figura 35**).

Los resultados obtenidos muestran que la translocación nuclear de NF- κ B y su capacidad de unión al DNA tienen lugar de forma transitoria durante la sepsis, característica que es compatible con el carácter inducible de este factor de transcripción así como con la necesidad de ser funcional sólo durante periodos de tiempo definidos a la hora de regular la respuesta inmune innata y adaptativa frente al proceso infeccioso (Renner and Schmitz, 2009). De hecho, la máxima inducción de NF- κ B se observa a las 8 horas de inducir el proceso séptico, restableciéndose los valores basales a las 24 horas de la sepsis, momentos antes de que el ratón muera como consecuencia de la patología (Escames et al., 2007). Sin embargo, las consecuencias de esta activación, en términos de expresión de mediadores pro-inflamatorios como TNF- α , iNOS, COX-2, IFN- γ o pro-IL-1 β , se mantienen elevadas durante todo el proceso séptico. Una consideración destacable de nuestro estudio es que, durante la sepsis, los niveles de expresión de las enzimas pro-inflamatorias COX-2 e iNOS son más altos

en comparación con la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, situación que refleja la convergencia de múltiples vías de señalización sobre los promotores génicos de dichas enzimas (Schroder et al., 2006).

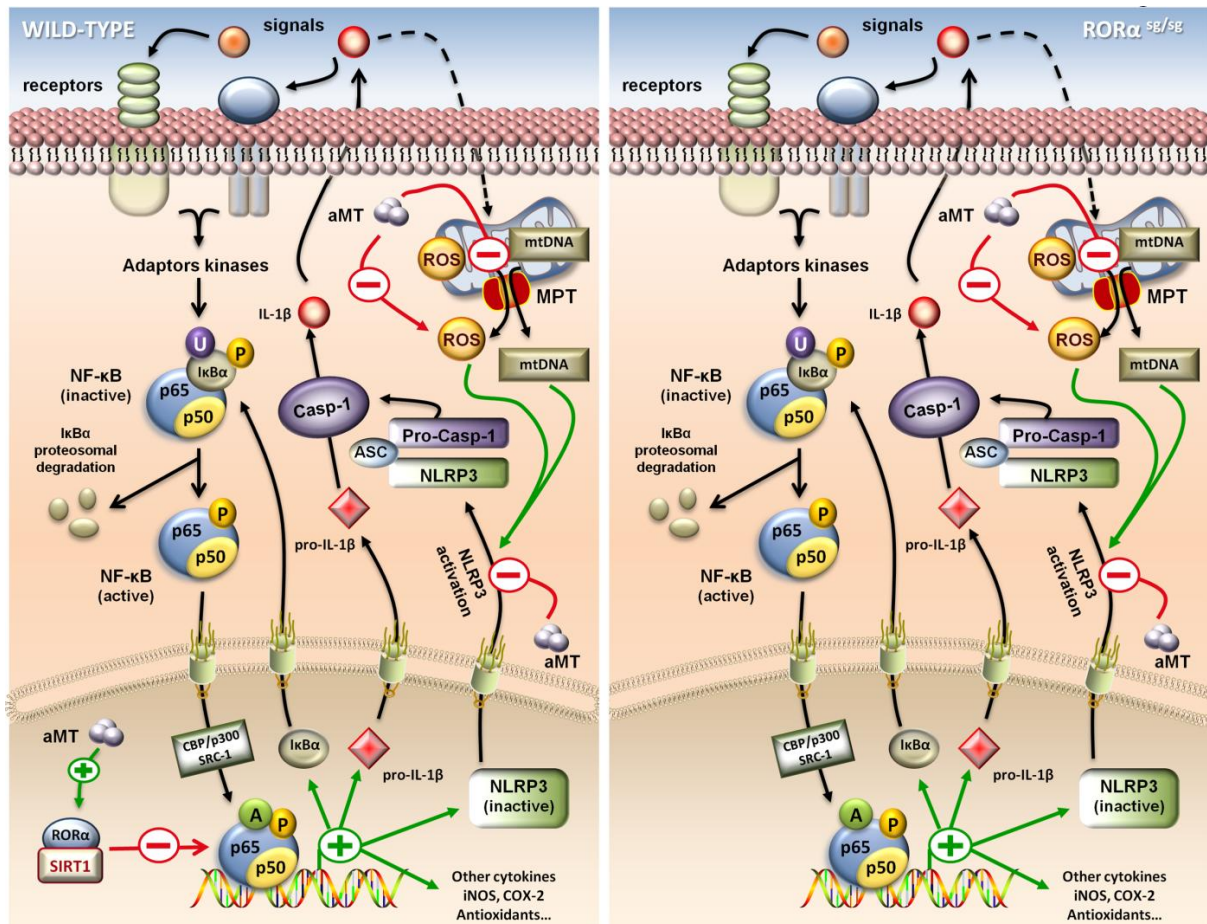


Figura 35. Terapia anti-inflamatoria basada en el tratamiento con melatonina: dianas moleculares sobre la respuesta inflamatoria dependiente de NF-κB e inflammasoma NLRP3. El reconocimiento de las señales inflamatorias por sus receptores específicos induce la activación de una serie de proteínas quinasas que, en última instancia, desencadenan la ubiquitinización y degradación del inhibidor IκBα. En consecuencia, NF-κB se transloca al núcleo e induce la transcripción de numerosos genes diana, entre los que se incluyen citoquinas y enzimas de carácter pro-inflamatorio, su propio inhibidor IκBα y la proteína NLRP3. Además, estas señales y mediadores pro-inflamatorios provocan daño mitocondrial con la consiguiente producción de ROS, daño en el mtDNA y apertura del poro MPT. Una vez liberados al citosol, ROS y mtDNA activan al inflammasoma NLRP3 y, por tanto, a la maduración de IL-1β dependiente de la caspasa-1. La melatonina inhibe, mediante mecanismos dependientes de RORα, la respuesta inflamatoria dependiente de NF-κB al potenciar la deacetilación

de p65 mediada por Sirt1. Además, la melatonina previene la activación de NLRP3 y la consecuente maduración de IL-1 β , si bien esta acción no requiere la participación del receptor nuclear ROR α .

Junto con la vía de señalización de NF- κ B, el inflamasoma NLRP3 participa activamente en la respuesta inmune innata que se pone en marcha frente al proceso infeccioso, por lo que no es de extrañar que su activación presente el mismo patrón temporal mencionado para NF- κ B. De hecho, los máximos niveles de expresión de *nlrp3* se detectan a las 8 horas de la sepsis, coincidiendo con la máxima capacidad de unión de NF- κ B al DNA, lo que confirma que la expresión de *nlrp3* está sometida al control transcripcional de NF- κ B (Bauernfeind et al., 2009). No obstante, y de forma similar a lo observado para otros mediadores dependientes de NF- κ B, el contenido proteico de NLRP3 sigue aumentando significativamente durante todo el proceso séptico. Una vez expresado, numerosas señales relacionadas con el proceso inflamatorio, entre las que se incluyen la producción de ROS, liberación al citosol de mtDNA y disfunción mitocondrial (Escames et al., 2012; Nakahira et al., 2011; Zhou et al., 2011), inducen el ensamblaje y posterior activación del inflamasoma NLRP3, lo que lleva al aumento en la maduración de la IL-1 β dependiente de caspasa-1 observado durante las 24 horas de la sepsis. En definitiva, nuestras observaciones indican que, a pesar de la inducción transitoria y temprana de NF- κ B y la consiguiente expresión de *nlrp3* en miocardio de ratones *wild-type*, las consecuencias de esta activación en términos de producción de mediadores pro-inflamatorios e IL-1 β madura están presentes durante todo el proceso séptico. Esta situación, por tanto, va a agravar la severidad y duración de la respuesta inflamatoria desencadenada frente a la infección, lo que justifica la alta mortalidad y morbilidad asociadas al fallo miocárdico durante la sepsis (Hunter and Doddi, 2010; Vincent et al., 2014).

La sepsis no sólo induce la fosforilación y degradación proteosómica del inhibidor I κ B α , provocando la translocación nuclear de NF- κ B y la expresión de sus genes diana, sino

también afecta a la función mitocondrial debido al consumo masivo de NAD⁺ por múltiples mecanismos que se ponen en marcha durante la inflamación, como la producción masiva de TNF- α o la actividad deacetilasa de la Sirt1 dependiente de NAD⁺, lo que provoca, en última instancia, un descenso notable en la producción de ATP por parte de la mitocondria (Gomes et al., 2013; Yoshino et al., 2011). Esta situación descrita tiene lugar de forma paralela a la inducción de la iNOS y el consecuente aumento en la producción de NO \cdot que inhibe de forma progresiva a los complejos de la cadena de transporte electrónico. Además, la inhibición de la transferencia electrónica trae como consecuencia la formación de O₂ \cdot^- que, al reaccionar con el NO \cdot , desencadena la formación de ONOO $^-$, los cuales dañan irreversiblemente todos los complejos respiratorios (Escames et al., 2006; Escames et al., 2007; Ortiz et al., 2014). Bajo estas condiciones, la mitocondria entra en un estado oxidativo que determina la apertura del poro MPT con la consiguiente liberación de ROS, ATP y mtDNA al citosol. Nuestros datos confirman el estado hipóxico del miocardio debido a la elevada expresión de *hif1a* y el descenso notable en el consumo de oxígeno por parte de la mitocondria, lo que sugiere la incapacidad por parte de las respuestas antioxidantes dependientes de NF- κ B para frenar el estado hiperoxidativo asociado al proceso séptico. En definitiva, estas señales oxidativas de origen mitocondrial mencionadas anteriormente van a promover el ensamblaje y activación del inflammasoma NLRP3 (Escames et al., 2012; Nakahira et al., 2011; Zhou et al., 2011), estableciéndose de esta forma una clara conexión entre las vías de señalización de NF- κ B y NLRP3 con la disfunción mitocondrial durante la sepsis.

Considerando los datos expuestos a lo largo de esta discusión, la búsqueda de una terapia antiséptica exitosa debería incluir estrategias que no sólo inhiban la conexión entre NF- κ B y NLRP3 sino que presenten igualmente efectos antioxidantes, especialmente a nivel mitocondrial (Galley, 2010). En nuestro laboratorio hemos demostrado previamente que la melatonina es capaz de contrarrestar el fallo cardíaco e incrementar la supervivencia en

modelo murino de sepsis inducida por CLP (Escames et al., 2007; Ortiz et al., 2014). Nuestro estudio muestra, además, que la administración de melatonina contrarresta la activación de NF- κ B inducida por la sepsis en ratones, sin que este efecto se deba a la eliminación del estímulo bacteriano, fallo en los eventos citosólicos que desencadenan la activación de NF- κ B o cambios en la expresión de HAT/HDACs como *src-1*, *hdac3* o *cbp/p300*, las cuales regulan la actividad transcripcional de NF- κ B (Rahman et al., 2004). De acuerdo con nuestros datos, la melatonina potencia la deacetilación de p65 mediada por la deacetilasa Sirt1 como principal mecanismo implicado en la represión transcripcional de NF- κ B. Nuestros resultados confirman que el tratamiento con melatonina mejora el estado redox celular al normalizar las actividades y expresión de los enzimas antioxidantes al mismo tiempo que restaura el estado normóxico del miocardio. Esta preservación de la función mitocondrial frena los procesos apoptóticos y la liberación de ROS al citosol y, en consecuencia, la melatonina contrarresta la activación del inflammasoma NLRP3, lo que reduce significativamente la actividad de la caspasa-1 y los niveles de IL-1 β madura.

Estudios previos muestran que el receptor nuclear ROR α cumple un papel protector durante la respuesta inflamatoria (Delerive et al., 2001; Stapleton et al., 2005), al mismo tiempo que la melatonina posee la capacidad para unirse a ROR α e inducir su actividad transcripcional a fin de modular el ritmo circadiano (Acuña-Castroviejo et al., 1994; Wiesenberg et al., 1995). Asimismo, la expresión de los genes diana de ROR α , *bmal1* y *clock*, es regulada por el represor transcripcional circadiano Rev-Erba (Preitner et al., 2002) y la Sirt1, una deacetilasa dependiente de NAD⁺ capaz de reprimir la actividad transcripcional de NF- κ B y cuya actividad parece estar controlada por la melatonina (Nakahata et al., 2009; Yang et al., 2015; Yeung et al., 2004). En este sentido, los ratones *wild-type* sépticos no ven alterada la expresión de los genes reloj, a pesar de presentar unos niveles nucleares elevados

de Sirt1 y una depleción profunda en los niveles celulares de NAD⁺. Un hecho interesante es que los niveles de p65 acetilado en su residuo Lys310 se mantienen elevados a las 8 horas de la sepsis, lo que nos sugiere que el consumo de NAD⁺ no se relaciona con una mayor actividad deacetilasa de la Sirt1 sino con mecanismos relacionados con el daño inflamatorio. Nuestros datos confirman que la administración de melatonina induce la actividad transcripcional de ROR α y, por tanto, la expresión de *bmal1* y *clock*, efecto que se asocia con una mayor expresión de la Sirt1 y una completa restauración de los niveles celulares de NAD⁺. En conjunto, estos datos sugieren que la inflamación y el estrés oxidativo impiden que la Sirt1 utilice de una forma eficaz el NAD⁺ para deacetilar e inhibir consecuentemente a NF- κ B. Por tanto, la melatonina restaura la conexión normal entre ROR α /CLOCK/BMAL1/Sirt1, lo que tiene como última consecuencia la deacetilación mediada por la Sirt1 de p65 y la consiguiente represión de su actividad transcripcional. Con el objetivo de estudiar más en detalle la relación entre ROR α y melatonina, analizamos la respuesta inflamatoria y antioxidante en ratones ROR $\alpha^{sg/sg}$ a las 8 horas de inducir la sepsis con o sin tratamiento con melatonina. Esta deleción en *rora* no sólo va a provocar una profunda alteración de la maquinaria de los genes reloj, sino que además causa una activación potente de las vías de señalización de NF- κ B y NLRP3 durante la sepsis. Por tanto, estos datos confirman la idea previa de que los ratones ROR $\alpha^{sg/sg}$ muestran una hiperproducción de citoquinas pro-inflamatorias y mayor susceptibilidad al proceso inflamatorio (Delerive et al., 2001; Stapleton et al., 2005). Otra consideración importante de nuestro estudio es que, por primera vez, se demuestra no sólo que la melatonina requiere ROR α para inducir la actividad deacetilasa de la Sirt1 e inhibir en consecuencia la actividad transcripcional de NF- κ B, sino también que la melatonina inhibe la activación del inflamasoma NLRP3 por las ROS de origen mitocondrial a través de mecanismos independientes del receptor nuclear ROR α .

Considerando los datos expuestos a lo largo de esta discusión, tanto el núcleo como la mitocondria emergen como las principales dianas intracelulares sobre las cuales la melatonina muestra sus efectos antisépticos, al ser capaz no sólo de modificar la expresión génica sino al mismo tiempo proteger a la mitocondria del daño oxidativo asociado al proceso inflamatorio. Con respecto al tipo celular, los datos descritos en la bibliografía ponen de manifiesto la participación de NF- κ B como un elemento regulador clave en la respuesta inflamatoria en cardiomiocitos (Zhang et al., 2014). Por tanto, nuestros resultados sugieren que este tipo celular es una diana potencial para la acción anti-inflamatoria de la melatonina al inhibir en ellos la respuesta pro-inflamatoria asociada a la sepsis, sumándose así a otras células inmunitarias y tejidos en los cuales la melatonina muestra igualmente una potente inhibición de la respuesta inflamatoria dependiente de NF- κ B (Crespo et al., 1999; Gilad et al., 1998)

Finalmente, los datos de este estudio revelan la existencia de un modelo constituido por dos señales totalmente necesarias para una respuesta completa frente al patógeno: una primera señal, dependiente de NF- κ B, necesaria para la producción de mediadores pro-inflamatorios, la síntesis de NLRP3 y la producción de pro-IL-1 β , y una segunda señal, asociada a la generación de ROS por parte de la mitocondria, responsable de activar al inflamasoma NLRP3 y la consecuente maduración de IL-1 β . Por tanto, la conexión entre NF- κ B y NLRP3 patente en este modelo explicaría la respuesta inflamatoria desproporcionada que tiene lugar durante la sepsis en miocardio de ratón. En definitiva, la melatonina emerge como un fármaco capaz de bloquear la conexión entre las dos principales vías de la respuesta inmune innata, lo que justificaría su uso como estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, si bien sería necesario ajustar las dosis empleadas en este estudio a pacientes humanos a través de la estimación de dosis equivalente humana propuesta por Reagan-Shaw y colaboradores (Venegas et al., 2012).

CONCLUSSIONS

1. According to its inducible nature, the nuclear translocation of NF- κ B and its DNA binding capacity took place in a time-dependent manner, reaching maximal levels at 8 hours after cecal puncture. Nevertheless, the inflammatory response depending on the NF- κ B pathway remains elevated throughout the whole sepsis process.
2. The NLRP3 inflammasome activation showed the same temporal pattern than that of NF- κ B, with *nlrp3* maximal expression occurring at 8 hours after sepsis induction. As with NF- κ B, the consequences of NLRP3 activation, in terms of IL-1 β maturation, were upregulated throughout the whole sepsis process.
3. The setting up of the NF- κ B/NLRP3 innate immune pathways and the mitochondrial impairment, the latter required to NLRP3 inflammasome activation, yield a severe and lasting inflammatory response against infection, which is associated with the elevated mortality and morbidity in septic patients.
4. Melatonin administration counteracted the activation of both NF- κ B and NLRP3 inflammasome during sepsis, promoting Sirt1-dependent p65 deacetylation, restoring the cellular redox equilibrium, and preserving mitochondrial homeostasis.
5. The effects of melatonin to antagonize the NF- κ B pathway activation during sepsis required a functional transcriptional factor ROR α , which is also necessary to enhance the endogenous antioxidant system by melatonin, severely damaged during sepsis.

6. Melatonin, however, inhibits the NLRP3 inflammasome activation by mechanisms independent of ROR α ; and these mechanisms may be related to the reduction of the cellular oxidative stress.

7. Overall, the data here showed supports melatonin as the best therapeutic strategy against inflammatory diseases because it is the first molecule able to disrupt the NF- κ B/NLRP3 inflammasome/mitochondria connection, thus disabling the exaggerated innate immune response and restoring mitochondria bioenergetics.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña-Castroviejo, D., G. Escames, C. Venegas, ME Diaz-Casado, E. Lima-Cabello, LC López, S. Rosales-Corral, DX Tan, RJ Reiter. 2014. Extrapineal melatonin: sources, regulation and Potential functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 16:2997-3025
- Acuna-Castroviejo, D., G.Escames, M.I.Rodriguez, and L.C.Lopez. 2007. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci.* 12:947-963.
- Acuña-Castroviejo, D., L.C.López, G.Escames, A.López, J.A.García, and R.J.Reiter. 2011. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 11:221-240.
- Acuña-Castroviejo, D., M.Martín, M.Macías, G.Escames, J.León, H.Khaldy, and R.J.Reiter. 2001. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J. Pineal Res.* 30:65-74.
- Acuna-Castroviejo, D., M.I.Pablos, A.Menendez-Pelaez, and R.J.Reiter. 1993. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 82:253-256.
- Acuña-Castroviejo, D., R.J.Reiter, A.Menendez-Pelaez, M.I.Pablos, and A.Burgos. 1994. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J. Pineal Res.* 16:100-112.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-126.
- Agostini, L., F.Martinon, K.Burns, M.F.McDermott, P.N.Hawkins, and J.Tschopp. 2004. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity.* 20:319-325.
- Akashi, M., and T.Takumi. 2005. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:441-448.
- Akira, S., K.Takeda, and T.Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2:675-680.
- Albrecht, U. 2002. Invited review: regulation of mammalian circadian clock genes. *J Appl. Physiol* 92:1348-1355.
- Alkalay, I., A.Yaron, A.Hatzubai, A.Orian, A.Ciechanover, and Y.Ben-Neriah. 1995. Stimulation-dependent I kappa B alpha

phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:10599-10603.

Alonso R. *Fisiologia humana*. McGraw-Gill Interamericana, 891-901. 1999.

Andrabi, S.A., I.Sayeed, D.Siemen, G.Wolf, and T.F.Horn. 2004. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J*. 18:869-871.

Andre, E., F.Conquet, M.Steinmayr, S.C.Stratton, V.Porciatti, and M.Becker-Andre. 1998a. Disruption of retinoid-related orphan receptor beta changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice. *EMBO J* 17:3867-3877.

Andre, E., K.Gawlas, and M.Becker-Andre. 1998b. A novel isoform of the orphan nuclear receptor RORbeta is specifically expressed in pineal gland and retina. *Gene* 216:277-283.

Antolin, I., J.C.Mayo, R.M.Sainz, M.L.del Brio, F.Herrera, V.Martin, and C.Rodriguez. 2002. Protective effect of melatonin in a chronic experimental

model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 943:163-173.

Arendt, J. *Melatonin and the mammalian pineal gland*. Chapman Hall, 201-285. 1995. London.

Ref Type: Edited Book

Arenzana-Seisdedos, F., J.Thompson, M.S.Rodriguez, F.Bachelerie, D.Thomas, and R.T.Hay. 1995. Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol. Cell Biol.* 15:2689-2696.

Arenzana-Seisdedos, F., P.Turpin, M.Rodriguez, D.Thomas, R.T.Hay, J.L.Virelizier, and C.Dargemont. 1997. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 3):369-378.

Arnalich, F., E.Garcia-Palomero, J.Lopez, M.Jimenez, R.Madero, J.Renart, J.J.Vazquez, and C.Montiel. 2000. Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect. Immun.* 68:1942-1945.

- Barton, G.M. 2008. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J. Clin. Invest* 118:413-420.
- Bauernfeind, F., A.Ablasser, E.Bartok, S.Kim, J.Schmid-Burgk, T.Cavlar, and V.Hornung. 2011. Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell Mol. Life Sci.* 68:765-783.
- Becker-Andre, M., E.Andre, and J.F.DeLamarter. 1993. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194:1371-1379.
- Becker-Andre, M., I.Wiesenberg, N.Schaeren-Wiemers, E.Andre, M.Missbach, J.H.Saurat, and C.Carlberg. 1994. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol. Chem.* 269:28531-28534.
- Bell, J.K., G.E.Mullen, C.A.Leifer, A.Mazzoni, D.R.Davies, and D.M.Segal. 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* 24:528-533.
- Benitez-King, G. 2006. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res.* 40:1-9.
- Benitez-King, G., and F.Anton-Tay. 1993. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 49:635-641.
- Benitez-King, G., A.Rios, A.Martinez, and F.Anton-Tay. 1996. In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim. Biophys. Acta* 1290:191-196.
- Bettahi, I., D.Pozo, C.Osuna, R.J.Reiter, D.Acuna-Castroviejo, and J.M.Guerrero. 1996. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res.* 20:205-210.
- Betts, J.C., and G.J.Nabel. 1996. Differential regulation of NF-kappaB2(p100) processing and control by amino-terminal sequences. *Mol. Cell Biol.* 16:6363-6371.
- Beutler, B. 2004. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430:257-263.
- Bohrer, H., F.Qiu, T.Zimmermann, Y.Zhang, T.Jllmer, D.Mannel, B.W.Bottiger, D.M.Stern, R.Waldherr, H.D.Saeger, R.Ziegler, A.Bierhaus, E.Martin, and P.P.Nawroth. 1997. Role of

NFkappaB in the mortality of sepsis. *J. Clin. Invest* 100:972-985.

Bone, R.C., R.A.Balk, F.B.Cerra, R.P.Dellinger, A.M.Fein, W.A.Knaus, R.M.Schein, and W.J.Sibbald. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101:1644-1655.

Brown, G.C. 2001. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1504:46-57.

Burns, K., J.Clatworthy, L.Martin, F.Martinon, C.Plumpton, B.Maschera, A.Lewis, K.Ray, J.Tschopp, and F.Volpe. 2000. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat. Cell Biol.* 2:346-351.

Burns, K., S.Janssens, B.Brissoni, N.Olivos, R.Beyaert, and J.Tschopp. 2003. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J. Exp. Med.* 197:263-268.

Burris, T.P. 2008. Nuclear hormone receptors for heme: REV-ERBalpha and REV-ERBbeta are ligand-regulated components of the mammalian clock. *Mol. Endocrinol.* 22:1509-1520.

Cagnoli, C.M., C.Atabay, E.Kharlamova, and H.Manev. 1995. Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res.* 18:222-226.

Callahan, L.A., and G.S.Supinski. 2005. Sepsis induces diaphragm electron transport chain dysfunction and protein depletion. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 172:861-868.

Cardinali, D.P., and F.Freire. 1975. Melatonin effects on brain. Interaction with microtubule protein, inhibition of fast axoplasmic flow and induction of crystalloid and tubular formations in the hypothalamus. *Mol. Cell Endocrinol.* 2:317-330.

Carlberg, C., H.R.Hooft van, J.K.Staple, J.F.DeLamarter, and M.Becker-Andre. 1994. RZR, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol. Endocrinol.* 8:757-770.

- Carrillo-Vico, A., J.M.Guerrero, P.J.Lardone, and R.J.Reiter. 2005. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*. 27:189-200.
- Chen, L., W.Fischle, E.Verdin, and W.C.Greene. 2001. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science* 293:1653-1657.
- Chiao, P.J., S.Miyamoto, and I.M.Verma. 1994. Autoregulation of I kappa B alpha activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:28-32.
- Crespo, E., M.Macías, D.Pozo, G.Escames, M.Martín, F.Vives, J.M.Guerrero, and D.Acuña-Castroviejo. 1999. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J*. 13:1537-1546.
- Cruz, C.M., A.Rinna, H.J.Forman, A.L.Ventura, P.M.Persechini, and D.M.Ojcius. 2007. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem*. 282:2871-2879.
- Curtis, A.M., M.M.Bellet, P.Sassone-Corsi, and L.A.O'Neill. 2014. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity*. 40:178-186.
- d'Emmanuele, d., V, S.Marzocco, P.R.Di, G.Autore, A.Pinto, S.Cuzzocrea, and R.Sorrentino. 2004. Melatonin prevents lipopolysaccharide-induced hyporeactivity in rat. *J. Pineal Res*. 36:146-154.
- da, S.C.-M., L.Pinato, E.K.Tamura, C.E.Carvalho-Sousa, and R.P.Markus. 2012. Glia-pinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). *PLoS. One*. 7:e40142.
- Das, K.C., and C.W.White. 1997. Activation of NF-kappaB by antineoplastic agents. Role of protein kinase C. *J. Biol. Chem*. 272:14914-14920.
- Decker, J.F., and W.B.Quay. 1982. Stimulatory effects of melatonin on ependymal epithelium of choroid plexuses in golden hamsters. *J. Neural Transm*. 55:53-67.
- Deliverie, P., D.Monte, G.Dubois, F.Trottein, J.Fruchart-Najib, J.Mariani, J.C.Fruchart, and B.Staels. 2001. The

orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep.* 2:42-48.

Delhase, M., M.Hayakawa, Y.Chen, and M.Karin. 1999. Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 284:309-313.

Delves, P.J., and I.M.Roitt. 2000a. The immune system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343:37-49.

Delves, P.J., and I.M.Roitt. 2000b. The immune system. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343:108-117.

DiDonato, J.A., M.Hayakawa, D.M.Rothwarf, E.Zandi, and M.Karin. 1997. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388:548-554.

Doerrier, C., J.A.Garcia, H.Volt, M.E.Diaz-Casado, E.Lima-Cabello, F.Ortiz, M.Luna-Sanchez, G.Escames, L.C.Lopez, and D.Acuna-Castroviejo. 2015. Identification of mitochondrial deficits and melatonin targets in liver of septic mice by high-resolution respirometry. *Life Sci.* 121:158-165.

Dostert, C., G.Guarda, J.F.Romero, P.Menu, O.Gross, A.Tardivel, M.L.Suva, J.C.Stehle, M.Kopf, I.Stamenkovic, G.Corradin, and J.Tschopp. 2009. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS. One.* 4:e6510.

Dostert, C., V.Petrilli, B.R.Van, C.Steele, B.T.Mossman, and J.Tschopp. 2008. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320:674-677.

Drayton, D.L., S.Liao, R.H.Mounzer, and N.H.Ruddle. 2006. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat. Immunol.* 7:344-353.

Dubocovich, M.L., and J.S.Takahashi. 1987. Use of 2-[125I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84:3916-3920.

Dunne, A. 2011. Inflammasome activation: from inflammatory disease to infection. *Biochem. Soc. Trans.* 39:669-673.

Ebisawa, T., S.Karne, M.R.Lerner, and S.M.Reppert. 1994. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from

- Xenopus dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:6133-6137.
- El, M.R., G.M.El, M.C.Seeds, C.E.McCall, S.C.Dreskin, and M.R.Nicolls. 2007. Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol. Lett.* 111:36-44.
- Erren, T.C., R.J.Reiter, and C.Piekarski. 2003. Light, timing of biological rhythms, and chronodisruption in man. *Naturwissenschaften* 90:485-494.
- Escames, G., J.León, M.Macías, H.Khaldy, and D.Acuña-Castroviejo. 2003. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J.* 17:932-934.
- Escames, G., L.C.Lopez, J.A.Garcia, L.Garcia-Corzo, F.Ortiz, and D.Acuna-Castroviejo. 2012. Mitochondrial DNA and inflammatory diseases. *Hum. Genet.* 131:161-173.
- Escames, G., L.C.López, F.Ortiz, A.López, J.A.García, E.Ros, and D.Acuña-Castroviejo. 2007b. Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J.* 274:2135-2147.
- Escames, G., L.C.López, V.Tapias, P.Utrilla, R.J.Reiter, A.B.Hitos, J.León, M.I.Rodríguez, and D.Acuña-Castroviejo. 2006. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J. Pineal Res.* 40:71-78.
- Evans, R.M. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.
- Fan, J., R.D.Ye, and A.B.Malik. 2001. Transcriptional mechanisms of acute lung injury. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 281:L1037-L1050.
- Feige, J.N., and J.Auwerx. 2008. Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20:303-309.
- Fenton, M.J., and D.T.Golenbock. 1998. LPS-binding proteins and receptors. *J. Leukoc. Biol.* 64:25-32.
- Fink, S.L., and B.T.Cookson. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 73:1907-1916.

- Flajnik, M.F., and M.Kasahara. 2010. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat. Rev. Genet.* 11:47-59.
- Fridovich, I. 1974. Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol.* 41:35-97.
- Fujihara, M., M.Muroi, K.Tanamoto, T.Suzuki, H.Azuma, and H.Ikeda. 2003. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol. Ther.* 100:171-194.
- Gachon, F., E.Nagoshi, S.A.Brown, J.Ripperger, and U.Schibler. 2004. The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma* 113:103-112.
- Galli, M., G.F.Van, and O.Leo. 2011. Sirtuins and inflammation: Friends or foes? *Biochem. Pharmacol.* 81:569-576.
- Garcia, J.J., R.J.Reiter, J.Pie, G.G.Ortiz, J.Cabrera, R.M.Sainz, and D.Acuna-Castroviejo. 1999. Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31:609-616.
- Ghosh, S., M.J.May, and E.B.Kopp. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:225-260.
- Giguere, V. 1999. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev.* 20:689-725.
- Giguere, V., B.Beatty, J.Squire, N.G.Copeland, and N.A.Jenkins. 1995. The orphan nuclear receptor ROR alpha (RORA) maps to a conserved region of homology on human chromosome 15q21-q22 and mouse chromosome 9. *Genomics* 28:596-598.
- Giguere, V., M.Tini, G.Flock, E.Ong, R.M.Evans, and G.Otulakowski. 1994. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev.* 8:538-553.
- Gilmore, T.D. 1990. NF-kappa B, KBF1, dorsal, and related matters. *Cell* 62:841-843.
- Gilmore, T.D. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25:6680-6684.

- Girardin, S.E., and D.J.Philpott. 2004. Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity. *Eur. J. Immunol.* 34:1777-1782.
- Gitto, E., M.Karbownik, R.J.Reiter, D.X.Tan, S.Cuzzocrea, P.Chiurazzi, S.Cordaro, G.Corona, G.Trimarchi, and I.Barberi. 2001. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr. Res.* 50:756-760.
- Grimm, S., and P.A.Baeuerle. 1993. The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem. J.* 290 (Pt 2):297-308.
- Halle, A., V.Hornung, G.C.Petzold, C.R.Stewart, B.G.Monks, T.Reinheckel, K.A.Fitzgerald, E.Latz, K.J.Moore, and D.T.Golenbock. 2008. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol.* 9:857-865.
- Hamilton, B.A., W.N.Frankel, A.W.Kerrebrock, T.L.Hawkins, W.FitzHugh, K.Kusumi, L.B.Russell, K.L.Mueller, B.van, V, B.W.Birren, L.Kruglyak, and E.S.Lander. 1996. Disruption of the nuclear hormone receptor RORalpha in staggerer mice. *Nature* 379:736-739.
- Hardeland, R. 1997. New actions of melatonin and their relevance to biometeorology. *Int. J. Biometeorol.* 41:47-57.
- Hardeland, R. 2008. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol. Life Sci.* 65:2001-2018.
- Hardeland, R., and B.Poeggeler. 2003. Non-vertebrate melatonin. *J. Pineal Res.* 34:233-241.
- Hardeland, R., R.J.Reiter, B.Poeggeler, and D.X.Tan. 1993. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17:347-357.
- Hayden, M.S., and S.Ghosh. 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132:344-362.
- He, Y.W., M.L.Deftos, E.W.Ojala, and M.J.Bevan. 1998. RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity.* 9:797-806.

- Henson, P.M. 2005. Dampening inflammation. *Nat. Immunol.* 6:1179-1181.
- Hirose, T., R.J.Smith, and A.M.Jetten. 1994. ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205:1976-1983.
- Hontelez, S., A.Sanecka, M.G.Netea, A.B.van Spriel, and G.J.Adema. 2012. Molecular view on PRR cross-talk in antifungal immunity. *Cell Microbiol.* 14:467-474.
- Hornung, V., F.Bauernfeind, A.Halle, E.O.Samstad, H.Kono, K.L.Rock, K.A.Fitzgerald, and E.Latz. 2008. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 9:847-856.
- Horton, J.W. 2003. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology* 189:75-88.
- Hotchkiss, R.S., G.Monneret, and D.Payen. 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 13:862-874.
- Inigo, J., J.M.Sendra, R.Diaz, C.Bouza, and A.Sarria-Santamera. 2006. [Epidemiology and costs of severe sepsis in Madrid. A hospital discharge study]. *Med. Intensiva.* 30:197-203.
- Inohara, Chamailard, C.McDonald, and G.Nunez. 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.* 74:355-383.
- Ishii, K.J., S.Koyama, A.Nakagawa, C.Coban, and S.Akira. 2008. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host. Microbe* 3:352-363.
- Iwasaki, A., and R.Medzhitov. 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327:291-295.
- Janeway, C.A., Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54 Pt 1:1-13.
- Janssen-Heininger, Y.M., M.E.Poynter, and P.A.Baeuerle. 2000. Recent advances

towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic. Biol. Med.* 28:1317-1327.

Janssens, S., and R.Beyaert. 2003. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol. Cell* 11:293-302.

Jaskot, R.H., E.G.Charlet, E.C.Grose, M.A.Grady, and J.H.Roycroft. 1983. An automated analysis of glutathione peroxidase, S-transferase, and reductase activity in animal tissue. *J. Anal. Toxicol.* 7:86-88.

Jetten, A.M. 2009. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* 7:e003.

Jetten, A.M., S.Kurebayashi, and E.Ueda. 2001. The ROR nuclear orphan receptor subfamily: critical regulators of multiple biological processes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 69:205-247.

Jiang, Z., J.Ninomiya-Tsuji, Y.Qian, K.Matsumoto, and X.Li. 2002. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling

complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol. Cell Biol.* 22:7158-7167.

Jounai, N., K.Kobiyama, F.Takeshita, and K.J.Ishii. 2012. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2:168.

Kaisho, T., O.Takeuchi, T.Kawai, K.Hoshino, and S.Akira. 2001. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J. Immunol.* 166:5688-5694.

Karin, M., and Y.Ben-Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18:621-663.

Keller, M., A.Ruegg, S.Werner, and H.D.Beer. 2008. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132:818-831.

Krause, D.N., and M.L.Dubocovich. 1991. Melatonin receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31:549-568.

Kubota, T., and R.Koike. 2010. Cryopyrin-associated periodic syndromes:

- background and therapeutics. *Mod. Rheumatol.* 20:213-221.
- Kumar, H., T.Kawai, and S.Akira. 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388:621-625.
- Kunsch, C., S.M.Ruben, and C.A.Rosen. 1992. Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* 12:4412-4421.
- Kvetnoy, I.M., I.E.Ingel, T.V.Kvetnaia, N.K.Malinovskaya, S.I.Rapoport, N.T.Raikhlin, A.V.Trofimov, and V.V.Yuzhakov. 2002. Gastrointestinal melatonin: cellular identification and biological role. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 23:121-132.
- Lamkanfi, M., J.L.Mueller, A.C.Vitari, S.Misaghi, A.Fedorova, K.Deshayes, W.P.Lee, H.M.Hoffman, and V.M.Dixit. 2009. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J. Cell Biol.* 187:61-70.
- Lanone, S., A.Mebazaa, C.Heymes, D.Henin, J.J.Poderoso, Y.Panis, C.Zedda, T.Billiar, D.Payen, M.Aubier, and J.Boczkowski. 2000. Muscular contractile failure in septic patients: role of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 162:2308-2315.
- Lardone, P.J., J.M.Guerrero, J.M.Fernandez-Santos, A.Rubio, I.Martin-Lacave, and A.Carrillo-Vico. 2011. Melatonin synthesized by T lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor. *J Pineal Res.* 51:454-462.
- Larsen, S., R.Kraunsoe, M.Gram, E.Gnaiger, J.W.Helge, and F.Dela. 2014. The best approach: homogenization or manual permeabilization of human skeletal muscle fibers for respirometry? *Anal. Biochem.* 446:64-68.
- Lau, P., R.L.Fitzsimmons, S.Raichur, S.C.Wang, A.Lechtken, and G.E.Muscat. 2008. The orphan nuclear receptor, RORalpha, regulates gene expression that controls lipid metabolism: staggerer (SG/SG) mice are resistant to diet-induced obesity. *J. Biol. Chem.* 283:18411-18421.
- Lawrence, R.A., and R.F.Burk. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:952-958.

- Lawrence, R.A., and R.F.Burk. 1978. Species, tissue and subcellular distribution of non Se-dependent glutathione peroxidase activity. *J. Nutr.* 108:211-215.
- Lee, M.S., and Y.J.Kim. 2007. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu. Rev. Biochem.* 76:447-480.
- Lemaitre, B., E.Nicolas, L.Michaut, J.M.Reichhart, and J.A.Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
- Leon, J., D.Acuna-Castroviejo, G.Escames, D.X.Tan, and R.J.Reiter. 2005. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J. Pineal Res.* 38:1-9.
- Leon, J., D.Acuna-Castroviejo, R.M.Sainz, J.C.Mayo, D.X.Tan, and R.J.Reiter. 2004. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci.* 75:765-790.
- Leon, J., M.Macias, G.Escames, E.Camacho, H.Khaldy, M.Martin, A.Espinosa, M.A.Gallo, and D.Acuna-Castroviejo. 2000. Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. *Mol. Pharmacol.* 58:967-975.
- Lerner AB, Case JD, and Heinzelman RV. 1959. Structure of melatonin. *J. A. Chem Soc* 81:6084-6085.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, and Mori W. 1958. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. A. Chem Soc* 80:2587-2592.
- Levy, M.M., M.P.Fink, J.C.Marshall, E.Abraham, D.Angus, D.Cook, J.Cohen, S.M.Opal, J.L.Vincent, and G.Ramsay. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 29:530-538.
- Lightfield, K.L., J.Persson, S.W.Brubaker, C.E.Witte, M.J.von, E.A.Dunipace, T.Henry, Y.H.Sun, D.Cado, W.F.Dietrich, D.M.Monack, R.M.Tsolis, and R.E.Vance. 2008. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat. Immunol.* 9:1171-1178.
- Lin, Y.C., K.Brown, and U.Siebenlist. 1995. Activation of NF-kappa B requires proteolysis of the inhibitor I kappa B-alpha: signal-induced phosphorylation of I

kappa B-alpha alone does not release active NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:552-556.

Lipton, S.A., Y.B.Choi, Z.H.Pan, S.Z.Lei, H.S.Chen, N.J.Sucher, J.Loscalzo, D.J.Singel, and J.S.Stamler. 1993. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364:626-632.

Liu, S.F., and A.B.Malik. 2006. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 290:L622-L645.

Liu, T., and J.Borjigin. 2005. N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J. Pineal Res.* 39:91-96.

López, A., J.A.García, G.Escames, C.Venegas, F.Ortiz, L.C.López, and D.Acuña-Castroviejo. 2009. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J. Pineal Res.* 46:188-198.

Lopez, L.C., G.Escames, F.Ortiz, E.Ros, and D.Acuña-Castroviejo. 2006a.

Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 27:623-630.

Lopez, L.C., G.Escames, V.Tapias, P.Utrilla, J.Leon, and D.Acuña-Castroviejo. 2006b. Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice: its relation with mitochondrial dysfunction and prevention by melatonin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38:267-278.

LOWRY, O.H., N.J.ROSEBROUGH, A.L.FARR, and R.J.RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

Macias, M., G.Escames, J.Leon, A.Coto, Y.Sbihi, A.Osuna, and D.Acuña-Castroviejo. 2003. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur. J Biochem.* 270:832-840.

Macias, M., M.N.Rodriguez-Cabezas, R.J.Reiter, A.Osuna, and D.Acuña-Castroviejo. 1999. Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res.* 27:86-94.

Maestroni, G.J. 1996. Melatonin as a therapeutic agent in experimental endotoxic shock. *J. Pineal Res.* 20:84-89.

Malek, S., Y.Chen, T.Huxford, and G.Ghosh. 2001. IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. *J. Biol. Chem.* 276:45225-45235.

Malmesat, T., D.Breuille, P.Capitan, P.P.Mirand, and C.Obled. 2000. Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *J. Nutr.* 130:1239-1246.

Mamontova, A., S.Seguret-Mace, B.Esposito, C.Chaniale, M.Bouly, N.Delhaye-Bouchaud, G.Luc, B.Staels, N.Duverger, J.Mariani, and A.Tedgui. 1998. Severe atherosclerosis and hypoalphalipoproteinemia in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor RORalpha. *Circulation* 98:2738-2743.

Mariathasan, S., D.S.Weiss, K.Newton, J.McBride, K.O'Rourke, M.Roose-Girma, W.P.Lee, Y.Weinrauch, D.M.Monack, and V.M.Dixit. 2006. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440:228-232.

Martín, M., M.Macías, G.Escames, J.León, and D.Acuña-Castroviejo. 2000. Melatonin but not vitamins C and E maintains

glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* 14:1677-1679.

Martinon, F., K.Burns, and J.Tschopp. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* 10:417-426.

Martinon, F., A.Mayor, and J.Tschopp. 2009. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* 27:229-265.

Martinon, F., and J.Tschopp. 2005. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.* 26:447-454.

Martinon, F., and J.Tschopp. 2007. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death. Differ.* 14:10-22.

Matot, I., and C.L.Sprung. 2001. Definition of sepsis. *Intensive Care Med.* 27 Suppl 1:S3-S9.

Matzinger, P. 1998. An innate sense of danger. *Semin. Immunol.* 10:399-415.

Matzinger, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296:301-305.

- Mayo, J.C., R.M.Sainz, I.Antoli, F.Herrera, V.Martin, and C.Rodriguez. 2002. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol. Life Sci.* 59:1706-1713.
- McCord CO, and Allen EP. 1917. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J. Exp. Zool.* 23:207.
- Medvedev, A., Z.H.Yan, T.Hirose, V.Giguere, and A.M.Jetten. 1996. Cloning of a cDNA encoding the murine orphan receptor RZR/ROR gamma and characterization of its response element. *Gene* 181:199-206.
- Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1:135-145.
- Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819-826.
- Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428-435.
- Medzhitov, R., and C.A.Janeway, Jr. 1997a. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9:4-9.
- Medzhitov, R., and C.A.Janeway, Jr. 1997b. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91:295-298.
- Medzhitov, R., P.Preston-Hurlburt, and C.A.Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
- Miao, E.A., and J.V.Rajan. 2011. Salmonella and Caspase-1: A complex Interplay of Detection and Evasion. *Front Microbiol.* 2:85.
- Misra, H.P., and I.Fridovich. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247:3170-3175.
- Moore, C.B., D.T.Bergstralh, J.A.Duncan, Y.Lei, T.E.Morrison, A.G.Zimmermann, M.A.Accavitti-Loper, V.J.Madden, L.Sun, Z.Ye, J.D.Lich, M.T.Heise, Z.Chen, and J.P.Ting. 2008. NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature* 451:573-577.

- Moras, D., and H.Gronemeyer. 1998. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:384-391.
- Moreno, C., and A.Sanchez-Ibarrola. 2003. [Toll type receptors: molecular bases of the relationship between innate and adaptation responses of the immune system]. *Rev. Med. Univ Navarra* 47:29-33.
- Mundigler, G., G.Delle-Karth, M.Koreny, M.Zehetgruber, P.Steindl-Munda, W.Marktl, L.Ferti, and P.Siostrzonek. 2002. Impaired circadian rhythm of melatonin secretion in sedated critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 30:536-540.
- Nagai, Y., S.Akashi, M.Nagafuku, M.Ogata, Y.Iwakura, S.Akira, T.Kitamura, A.Kosugi, M.Kimoto, and K.Miyake. 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* 3:667-672.
- Nakahira, K., J.A.Haspel, V.A.Rathinam, S.J.Lee, T.Dolinay, H.C.Lam, J.A.Englert, M.Rabinovitch, M.Cernadas, H.P.Kim, K.A.Fitzgerald, S.W.Ryter, and A.M.Choi. 2011. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* 12:222-230.
- Nakajima, Y., M.Ikeda, T.Kimura, S.Honma, Y.Ohmiya, and K.Honma. 2004. Bidirectional role of orphan nuclear receptor RORalpha in clock gene transcriptions demonstrated by a novel reporter assay system. *FEBS Lett.* 565:122-126.
- Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-852.
- Natoli, G., and S.Chiocca. 2008. Nuclear ubiquitin ligases, NF-kappaB degradation, and the control of inflammation. *Sci. Signal.* 1:e1.
- Nemeth, I., and D.Boda. 2001. Xanthine oxidase activity and blood glutathione redox ratio in infants and children with septic shock syndrome. *Intensive Care Med.* 27:216-221.
- Neven, B., A.M.Prieur, and M.P.Quartier dit. 2008. Cryopyrinopathies: update on pathogenesis and treatment. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 4:481-489.
- Nosjean, O., M.Ferro, F.Coge, P.Beauverger, J.M.Henlin, F.Lefoulon, J.L.Fauchere, P.Delagrance, E.Canet, and

- J.A.Boutin. 2000. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.* 275:31311-31317.
- Nosjean, O., J.P.Nicolas, F.Klupsch, P.Delagrangé, E.Canet, and J.A.Boutin. 2001. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem. Pharmacol.* 61:1369-1379.
- Oeckinghaus, A., M.S.Hayden, and S.Ghosh. 2011. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat. Immunol.* 12:695-708.
- Ortiz, F., J.A.García, D.Acuña-Castroviejo, C.Doerrier, A.López, C.Venegas, H.Volt, M.Luna-Sánchez, L.C.López, and G.Escames. 2014. The beneficial effects of melatonin against heart mitochondrial impairment during sepsis: inhibition of iNOS and preservation of nNOS. *J. Pineal Res.* 56:71-81.
- Paredes, S.D., A.Korkmaz, L.C.Manchester, D.X.Tan, and R.J.Reiter. 2009. Phytomelatonin: a review. *J. Exp. Bot.* 60:57-69.
- Parkin, J., and B.Cohen. 2001. An overview of the immune system. *Lancet* 357:1777-1789.
- Perras, B., V.Kurowski, and C.Dodt. 2006. Nocturnal melatonin concentration is correlated with illness severity in patients with septic disease. *Intensive Care Med.* 32:624-625.
- Petrilli, V., C.Dostert, D.A.Muruve, and J.Tschopp. 2007a. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 19:615-622.
- Petrilli, V., S.Papin, C.Dostert, A.Mayor, F.Martinon, and J.Tschopp. 2007b. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death. Differ.* 14:1583-1589.
- Pichlmair, A., and Reis e Sousa. 2007. Innate recognition of viruses. *Immunity.* 27:370-383.
- Pintor, J., T.Pelaez, C.H.Hoyle, and A.Peral. 2003. Ocular hypotensive effects of melatonin receptor agonists in the rabbit: further evidence for an MT3 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 138:831-836.

Poeggeler, B., S.Saarela, R.J.Reiter, D.X.Tan, L.D.Chen, L.C.Manchester, and L.R.Barlow-Walden. 1994. Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 738:419-420.

Poltorak, A., X.He, I.Smirnova, M.Y.Liu, H.C.Van, X.Du, D.Birdwell, E.Alejos, M.Silva, C.Galanos, M.Freudenberg, P.Ricciardi-Castagnoli, B.Layton, and B.Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.

Proell, M., S.J.Riedl, J.H.Fritz, A.M.Rojas, and R.Schwarzenbacher. 2008. The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences. *PLoS. One.* 3:e2119.

Reiter, R.J. 1991. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol. Cell Endocrinol.* 79:C153-C158.

Reiter, R.J., D.X.Tan, L.C.Manchester, S.Lopez-Burillo, R.M.Sainz, and J.C.Mayo. 2003a. Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv. Exp. Med. Biol.* 527:539-548.

Reiter, R.J., D.X.Tan, J.C.Mayo, R.M.Sainz, J.Leon, and Z.Czarnocki. 2003b. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim. Pol.* 50:1129-1146.

Renner, F., and M.L.Schmitz. 2009. Autoregulatory feedback loops terminating the NF-kappaB response. *Trends Biochem. Sci.* 34:128-135.

Reppert, S.M., C.Godson, C.D.Mahle, D.R.Weaver, S.A.Slaugenhaupt, and J.F.Gusella. 1995. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:8734-8738.

Reppert, S.M., D.R.Weaver, and T.Ebisawa. 1994. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13:1177-1185.

Reynolds, F.D., R.Dauchy, D.Blask, P.A.Dietz, D.Lynch, and R.Zuckerman. 2003. The pineal gland hormone melatonin improves survival in a rat model of sepsis/shock induced by zymosan A. *Surgery* 134:474-479.

- Rittirsch, D., M.S.Huber-Lang, M.A.Flierl, and P.A.Ward. 2009. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat. Protoc.* 4:31-36.
- Ronco, C., C.Tetta, F.Mariano, M.L.Wratten, M.Bonello, V.Bordoni, X.Cardona, P.Inguaggiato, L.Pilotto, V.D'Intini, and R.Bellomo. 2003. Interpreting the mechanisms of continuous renal replacement therapy in sepsis: the peak concentration hypothesis. *Artif. Organs* 27:792-801.
- Schmitz, M.L., and P.A.Baeuerle. 1991. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO J.* 10:3805-3817.
- Seki, E., H.Tsutsui, H.Nakano, N.Tsuji, K.Hoshino, O.Adachi, K.Adachi, S.Futatsugi, K.Kuida, O.Takeuchi, H.Okamura, J.Fujimoto, S.Akira, and K.Nakanishi. 2001. Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta. *J. Immunol.* 166:2651-2657.
- Sen, R., and D.Baltimore. 1986. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47:921-928.
- Sen, R., and D.Baltimore. 2006. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986. 46: 705-716. *J. Immunol.* 177:7485-7496.
- Shao, W., G.Yeretssian, K.Doiron, S.N.Hussain, and M.Saleh. 2007. The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. *J. Biol. Chem.* 282:36321-36329.
- Simonian, M.H. 2002. Spectrophotometric determination of protein concentration. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Appendix 3:Appendix.
- Smirnov, A.N. 2001. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Mosc.)* 66:19-26.
- Sourdeval, M., C.Lemaire, A.Deniaud, L.Taysse, S.Daulon, P.Breton, C.Brenner, E.Boisvieux-Ulrich, and F.Marano. 2006. Inhibition of caspase-dependent mitochondrial permeability transition protects airway epithelial cells against mustard-induced apoptosis. *Apoptosis.* 11:1545-1559.

Stapleton, C.M., M.Jaradat, D.Dixon, H.S.Kang, S.C.Kim, G.Liao, M.A.Carey, J.Cristiano, M.P.Moorman, and A.M.Jetten. 2005. Enhanced susceptibility of staggerer (ROR α sg/sg) mice to lipopolysaccharide-induced lung inflammation. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 289:L144-L152.

Stein, D., S.Roth, E.Vogelsang, and C.Nusslein-Volhard. 1991. The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell* 65:725-735.

Steinhilber, D., M.Brungs, O.Werz, I.Wiesenberg, C.Danielsson, J.P.Kahlen, S.Nayeri, M.Schrader, and C.Carlberg. 1995. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol. Chem* 270:7037-7040.

Suliman, H.B., M.S.Carraway, and C.A.Piantadosi. 2003. Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 167:570-579.

Suliman, H.B., K.E.Welty-Wolf, M.S.Carraway, D.A.Schwartz, J.W.Hollingsworth, and C.A.Piantadosi. 2005. Toll-like receptor 4 mediates

mitochondrial DNA damage and biogenic responses after heat-inactivated *E. coli*. *FASEB J.* 19:1531-1533.

Szmuskowicz AW and Heinzelman RV. 1960. Synthesis of N-acetilmethoxytryptamine. *J Org Chem* 25:287.

Tada, H., S.Aiba, K.Shibata, T.Ohteki, and H.Takada. 2005. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect. Immun.* 73:7967-7976.

Takaesu, G., S.Kishida, A.Hiyama, K.Yamaguchi, H.Shibuya, K.Irie, J.Ninomiya-Tsuji, and K.Matsumoto. 2000. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol. Cell* 5:649-658.

Takayama, K., D.H.Mitchell, Z.Z.Din, P.Mukerjee, C.Li, and D.L.Coleman. 1994. Monomeric Re lipopolysaccharide from *Escherichia coli* is more active than the aggregated form in the *Limulus* amoebocyte lysate assay and in inducing Egr-1 mRNA in murine peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 269:2241-2244.

- Takeda, K., and S.Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17:1-14.
- Tan, D.X., L.C.Manchester, R.J.Reiter, and B.F.Plummer. 1999. Cyclic 3-hydroxymelatonin: a melatonin metabolite generated as a result of hydroxyl radical scavenging. *Biol. Signals Recept.* 8:70-74.
- Tan, D.X., L.C.Manchester, R.J.Reiter, B.F.Plummer, J.Limson, S.T.Weintraub, and W.Qi. 2000a. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic. Biol. Med.* 29:1177-1185.
- Tan, D.X., L.C.Manchester, R.J.Reiter, W.B.Qi, M.Karbownik, and J.R.Calvo. 2000b. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol. Signals Recept.* 9:137-159.
- Tattoli, I., L.A.Carneiro, M.Jehanno, J.G.Magalhaes, Y.Shu, D.J.Philpott, D.Arnoult, and S.E.Girardin. 2008. NLRX1 is a mitochondrial NOD-like receptor that amplifies NF-kappaB and JNK pathways by inducing reactive oxygen species production. *EMBO Rep.* 9:293-300.
- Tattoli, I., L.H.Travassos, L.A.Carneiro, J.G.Magalhaes, and S.E.Girardin. 2007. The Nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation. *Semin. Immunopathol.* 29:289-301.
- Ting, J.P., R.C.Lovering, E.S.Alnemri, J.Bertin, J.M.Boss, B.K.Davis, R.A.Flavell, S.E.Girardin, A.Godzik, J.A.Harton, H.M.Hoffman, J.P.Hugot, N.Inohara, A.Mackenzie, L.J.Maltais, G.Nunez, Y.Ogura, L.A.Otten, D.Philpott, J.C.Reed, W.Reith, S.Schreiber, V.Steimle, and P.A.Ward. 2008. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity.* 28:285-287.
- Tsai, S.Y., T.E.O'Brien, and J.A.McNulty. 2001. Microglia play a role in mediating the effects of cytokines on the structure and function of the rat pineal gland. *Cell Tissue Res.* 303:423-431.
- Tschopp, J., F.Martinon, and K.Burns. 2003. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:95-104.
- Uematsu, S., and S.Akira. 2007. Toll-like receptors and Type I interferons. *J. Biol. Chem.* 282:15319-15323.

- Ulloa, L., M.Brunner, L.Ramos, and E.A.Deitch. 2009. Scientific and clinical challenges in sepsis. *Curr. Pharm. Des* 15:1918-1935.
- Urata, Y., S.Honma, S.Goto, S.Todoroki, T.Iida, S.Cho, K.Honma, and T.Kondo. 1999. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 27:838-847.
- Vanecek, J. 1998. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev.* 78:687-721.
- Venegas, C., J.A.García, G.Escames, F.Ortiz, A.López, C.Doerrier, L.García-Corzo, L.C.López, R.J.Reiter, and D.Acuña-Castroviejo. 2012. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J. Pineal Res.* 52:217-227.
- Verceles, A.C., L.Silhan, M.Terrin, G.Netzer, C.Shanholtz, and S.M.Scharf. 2012. Circadian rhythm disruption in severe sepsis: the effect of ambient light on urinary 6-sulfatoxymelatonin secretion. *Intensive Care Med.* 38:804-810.
- Verma, I.M., J.K.Stevenson, E.M.Schwarz, A.D.Van, and S.Miyamoto. 1995. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* 9:2723-2735.
- Viriyakosol, S., T.Kirkland, K.Soldau, and P.Tobias. 2000. MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J. Endotoxin. Res.* 6:489-491.
- von, G.C., J.H.Stehle, and D.R.Weaver. 2002. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 309:151-162.
- Wah, D.A., J.A.Hirsch, L.F.Dorner, I.Schildkraut, and A.K.Aggarwal. 1997. Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA. *Nature* 388:97-100.
- Wang, C., L.Deng, M.Hong, G.R.Akkaraju, J.Inoue, and Z.J.Chen. 2001. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412:346-351.
- Webster, N.R., and J.F.Nunn. 1988. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br. J. Anaesth.* 60:98-108.
- Weitzberg, E. 2005. L-arginine transport and sepsis. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 49:434-436.

- West, A.P., A.A.Koblansky, and S.Ghosh. 2006. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:409-437.
- Wheeler, D.S., B.Zingarelli, W.J.Wheeler, and H.R.Wong. 2009. Novel pharmacologic approaches to the management of sepsis: targeting the host inflammatory response. *Recent Pat Inflamm. Allergy Drug Discov.* 3:96-112.
- Whiteside, S.T., and A.Israel. 1997. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin. Cancer Biol.* 8:75-82.
- Wichmann, M.W., J.M.Haisken, A.Ayala, and I.H.Chaudry. 1996. Melatonin administration following hemorrhagic shock decreases mortality from subsequent septic challenge. *J. Surg. Res.* 65:109-114.
- Wichterman, K.A., A.E.Baue, and I.H.Chaudry. 1980. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J. Surg. Res.* 29:189-201.
- Withyachumnarnkul, B., M.Limpanawattanakul, and W.Trakulrungrasi. 1986. Retention of radioactive substances in the hypothalamus, anterior pituitary, and reproductive organs of male rats after 3H-melatonin administration. *Life Sci.* 38:1757-1765.
- Wu, C.C., C.W.Chiao, G.Hsiao, A.Chen, and M.H.Yen. 2001. Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. *J. Pineal Res.* 30:147-156.
- Yamamoto, M., S.Sato, H.Hemmi, K.Hoshino, T.Kaisho, H.Sanjo, O.Takeuchi, M.Sugiyama, M.Okabe, K.Takeda, and S.Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643.
- Yeung, F., J.E.Hoberg, C.S.Ramsey, M.D.Keller, D.R.Jones, R.A.Frye, and M.W.Mayo. 2004. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 23:2369-2380.
- Zhang, G., and S.Ghosh. 2002. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J. Biol. Chem.* 277:7059-7065.
- Zhang, H., G.L.Squadrito, R.Uppu, and W.A.Pryor. 1999. Reaction of peroxynitrite with melatonin: A mechanistic study. *Chem. Res. Toxicol.* 12:526-534.

Zhou, L.Z., A.P.Johnson, and T.A.Rando. 2001. NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* 31:1405-1416.

Zhou, R., A.S.Yazdi, P.Menu, and J.Tschopp. 2011. A role for mitochondria

in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469:221-225.

Zingarelli, B. 2005. Nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med.* 33:S414-S416.

ANEXOS

Anexo 1. Lista de primers usados en los análisis de expresión génica por RT-PCR

Gene Symbol	Gene Description	Forward primer	Reverse primer
<i>gpx1</i>	Glutathione peroxidase type I	CAAATGAGCCCAAAGGAAAC	GGACAGAGTGAGAGGATAGC
<i>gsr</i>	Glutathione reductase type I	ACTTGCGTGAATGTTGGATGTG	GCTCTCGTGAGGAACTGTGG
<i>sod1</i>	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	GCTTCTCGTCTTGCTCTCTCTG	GTTCACCGCTTGCCTTCTGC
<i>tnfa</i>	Tumor necrosis factor alpha	AAGCAAGCAGCCAACCAG	ACAAGCAGGAATGAGAAGAGG
<i>il1b</i>	Interleukin-1beta	TTCAGGCAGGCAGTATCAC	CAGCAGGTTATCATCATCATCC
<i>nfkbia</i>	NF-kappa-B inhibitor alpha	GAGCAAATGGTGAAGGAG	TCTGGAAGTTGAGGAAGG
<i>nampt</i>	nicotinamide phospho ribosyltransferase	AGAGGCACCACTAATCATCAG	CACCAGAACCGAAGGAGAC
<i>clock</i>	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput	GGTGGTGA CTGCCTATCCTAC	CTGCTGTTGTTGTTGCTGTTG
<i>arntl</i>	Brain and muscle ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)-like 1	GAAGACAATGAGCCAGACAAC	CCATAGATTTACCCGTATTTCC

Anexo 1(continuación). Lista de primers usados en los análisis de expresión génica por RT-PCR

Gene Symbol	Gene Description	Forward primer	Reverse primer
<i>cat</i>	Catalase	GTCCGTCCCTGCTGTCTC	GCTCCTTCCACTGCTTCATC
<i>sirt1</i>	Silent mating type information regulation 2 homolog-1	CGTCTTGTCCTCTAGTTCCTG	GCCTCTCCGTATCATCTTCC
<i>nlrp3</i>	NATCH-,LRR- and PYD-containing Protein 3	AGGAGGAAGAAGAAGAGAGGA	AGAGACCACGGCAGAAGC
<i>casp1</i>	Caspase 1	CGTCTTGCCCTCATTATCTG	TCACCTCTTCAACCATCTCC
<i>nr1d1</i>	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	ACACACTCTCTGCTCTTC	GACCTTGACACAAACTGG
<i>gcs</i>	Gamma glutamylcysteine synthetase	TCAGATATTGGATGGAGAGTAG	AACCTTGACAGCGGAATG
<i>g6pd</i>	Glucose 6-phosphate dehydrogenase	GGCGACATCTTCCACCAG	GGCGTTCATAGGCACCAG
<i>hif1a</i>	Hypoxia-inducible factor 1-alpha	AAGGCATCAGCATAAGTGG	AAGTGGCAGACAGGTTAAGG
<i>actb</i>	Beta-actin	GCTGTCCCTGTATGCCTCTG	CGCTCGTTGCCAATAGTGATG

Anexo 2. Lista de genes seleccionados para el análisis de expresión por OpenArray

Functional Category	Gene symbol	GeneBank Accession#	Gene Description
<i>Housekeeping gene</i>			
	<i>hprt1</i>	NM_013556	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1
	<i>pum1</i>	AY027917	Pumilio homolog 1
	<i>psmc4</i>	NM_011874	26S Protease regulatory subunit 6B
<i>Transcriptional regulation</i>			
	<i>cbp/p300</i>	NM_001025432	CREB-binding protein/E1A binding protein p300
	<i>ncoa1</i>	NM_010881	Steroid Receptor Coactivator-1
	<i>hdac3</i>	NM_010411	Histone deacetylase 3
<i>Inflammatory pathway</i>			
	<i>ifng</i>	NM_015978	Interferon-gamma
	<i>asc</i>	AB059327.1	Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD
<i>Melatonin pathway</i>			
	<i>rora</i>	NM_013646	RAR-related orphan receptor alpha

Anexo 3. Lista de anticuerpos usados en el análisis del contenido proteico por Western Blot

Functional Category	Protein Symbol	Protein Name	Epitope antibody	Ref.
<i>NF-κB pathway</i>				
	NF-κB	Nuclear Factor kappaB	Amino acids 1-286 at the N-terminus	sc-8008
	IRAK-1	Interleukin-1 receptor-associated kinase-1	Amino acids 440-712 at the C-terminus	sc-7883
	IRAK-4	Interleukin-1 receptor-associated kinase-4	Near the N-terminus of IRAK-4	sc-34469
	IKKα	IκB kinase alpha	Full length, clone 14A231	Millipore
	IKKβ	IκB kinase beta	Full length, clone 10AG2	Millipore
	IκBα	Inhibitor of kappaB-α	Full length	sc-1643
<i>Inflammatory genes</i>				
	IL-1β	Interleukin-1β	Amino acids 117-269 at the C-terminus	sc-7884
	TNF-α	Tumor necrosis factor alpha	full length native TNFα	sc-52746
	iNOS	Nitric oxide synthase inducible	Near the C-terminus of NOS2	sc-650

Anexo 3 (continuación). Lista de anticuerpos usados en el análisis del contenido proteico por Western Blot

Functional Category	Protein Symbol	Protein Name	Epitope antibody	Ref.
<i>Inflammasome</i>				
	NLRP3	NATCH-,LRR- and PYD-containing Protein 3	Full length	AdipoGen AG-20B-0014
	ASC	Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing CARD	Full length	AdipoGen AG-25B-0006(AL177)
	Casp-1	Caspase-1	N-terminus of caspase-1	sc-622
	Casp-1 p20	Cleaved caspase-1 p20	Neopeptide at Asp296 of Casp-1	sc-22165
<i>Melatonin pathway</i>				
	ROR α	RAR-related orphan receptor alpha	Near the N-terminus of ROR α 1	sc-26377
	Ac-p65	NF-kappaB p65 acetylated at Lys310	residues surrounding Lys310 of NF- κ B	Cell Signaling
	Sirt-1	Silent mating type information regulation 2 homolog-1	Full length	Millipore, Clone 10E4