



# UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOMEDICINA

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES RELOJ  
Y SU RELACIÓN CON EL SISTEMA CIRCADIANO  
EN PACIENTES CRÍTICOS**

CARLOS ACUÑA FERNÁNDEZ

TESIS DOCTORAL

GRANADA, 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Carlos Acuña Fernández  
ISBN: 978-84-1306-481-9  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/62238>



Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Servicio de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor del Hospital Universitario de Canarias, y en el Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada (Grupo de investigación CTS-101: Comunicación Intercelular).

Durante la realización de este trabajo, el Licenciado Carlos Acuña Fernández se financió por las siguientes fuentes:

#### **I. Contratos laborales y de formación**

-Médico Interno Residente en el Servicio de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor, del Hospital Universitario de Canarias, 2014-2018.

-Médico Facultativo Especialista de Área en el Servicio de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor, del Hospital Universitario de Canarias, 2018-actualidad.

#### **II. Proyectos de investigación**

-Proyecto nº 3885 - Fundación Universidad de Granada). Presupuesto: 25.000,00€

-CB/10/00238 (ISCIII) - Looking for the connection between clock genes and mitochondrial impairment in aging and age-related loss of muscle fibers. CIBERfes. Presupuesto: 3.000,00€

-Pfizer SLU, Madrid - Presupuesto: 5.000,00€

### **III. Publicaciones**

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

-Acuña-Fernandez C, Marin JS, Diaz-Casado ME, Rusanova I, Darias-Delbey B, Pérez-Guillama L, Florido-Ruiz J, Acuna-Castroviejo D. Daily Changes in The Expression of Clock Genes in Sepsis and Their Relation with Sepsis Outcome and Urinary Excretion of 6-Sulfatoximelatonin. Shock 2019; 10.1097/SHK.0000000000001433.

Otras publicaciones relacionadas con la Tesis Doctoral:

-Acuña Castroviejo D, Rahim I, Acuña-Fernández C, Fernández-Ortiz M, Solera Martín J, Sayed RKA, Díaz-Casado ME, Rusanova I, López LC, Escames G. Melatonin, clock genes and mitochondria in sepsis. Cell Mol Life Sci 2017;74(21):3965-3987.

### **IV. Aportaciones a Congresos relacionados con la presente Tesis Doctoral**

-Acuña-Fernández, C. Chronobiology of sepsis. I. relationship between sepsis course and urinary excretion of 6-sulfatoxymelatonin. Euroanaesthesia, Génova (Suiza) 3-5 Junio 2017.

## AGRADECIMIENTOS

Por fin concluye un capítulo (otro más) de mi vida. Ha sido largo y tedioso, si bien es verdad que también ha sido muy ilusionante de principio a fin. No ha sido fácil, también he de añadir, con protocolos, muestras por aquí, muestras por allá, enmiendas... y más muestras por todos lados (como era de esperar). Sin embargo, todo ha sido mucho más llevadero gracias a todos los que me han apoyado y ayudado en este bonito proyecto.

En primer lugar, por supuesto, agradecer a mi director (y padre) Darío Acuña Castroviejo por guiarme, enseñarme y haberme infundido con cariño y perseverancia, esa ilusión y pasión por este “mundillo” de la investigación, y más allá. GRACIAS.

También agradecer a Jorge Solera por ser “otro padre científico”. No sólo ha sido un colaborador de investigación, me ha ilustrado y esclarecido todos los recovecos y cabos sueltos que pudieron quedar sin atar durante todo este trayecto. Habría sido tremendamente más complicado haber concluido esta “obra” sin todos los demás colaboradores. A Luis Pérez Guillama, Beneharo Darías Delbey y a los trabajadores de la Reanimación del Hospital Universitario de Canarias (anestesiastas, enfermeros y auxiliares) que han participado en la toma de muestras, a pesar de las horas intempestivas y la carga de trabajo asistencial durante las guardias de 24 horas.

A María Elena Díaz Casado por su importantísimo papel colaborando en la determinación de la expresión de los genes reloj, así como a Iryna Rusanova por la determinación de los marcadores de estrés oxidativo. Quiero asimismo agradecer a Ana Fernández Ibáñez por la colaboración en la medición de los niveles de citoquinas.

Por otro lado, expresar mi gratitud a todos los miembros del Tribunal de esta tesis por dedicar parte de su tiempo para hacer esto posible.

Como no era de otra manera, dar mil gracias a mi madre María Begoña Fernández Alonso por su amor, sus consejos y “regañetas” (con todo el cariño del mundo) desde la lejanía. Por supuesto también a mi hermano Darío Acuña Fernández y su amada familia (Machú y mis sobrinos Darío y Leo). Además de hermano, puedo decir con orgullo que es mi mejor amigo y compañero a lo largo de este y todos los capítulos de mi vida. MIL GRACIAS.

GRACIAS en mayúsculas también al amor de mi vida Bárbara Juan Bandini, por su amor, su cariño. Por ser también el hombro en el que apoyarme cuando más lo necesitaba. No me puedo olvidar de mis perros Pippo y Whisky, me han dado una alegría y un cariño incondicional todos los días desde que han llegado a mi vida.

A mis amigos, Selena Gala Aguilera García, Manuel González Yanes y otros tantos más que no me atrevo a nombrar por no alargar esto más de lo necesario. Gracias a todos por lo que me habéis enseñado, por las risas y los llantos, las alegrías y las penas. Por esos compañeros de batalla. MUCHAS GRACIAS.

A todos y cada uno de vosotros, que en mayor o menor medida habéis formado parte de mi vida. No son suficientes las palabras de agradecimiento.

GRACIAS.

## ABREVIATURAS

**AANAT:** arialquilamina N-acetiltransferasa

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

**AMK:** N1-acetil-5-metoxikinuramina

**aMT:** melatonina

**aPTT:** Tiempo de Tromboplastina Parcial activada

**ASMT:** N-acetilserotonina O-metiltransferasa

**Bmal1:** receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos

**Clock:** gen circadiano locomotor de salida de ciclos kaput

**COX-2:** ciclooxygenasa de tipo 2

**Cry:** criptocromo

**DBD:** dominio de unión al DNA

**DMSO:** dimetil sulfóxido

**FiO<sub>2</sub>:** Fracción inspirada de Oxígeno

**GPx:** glutathion peroxidasa

**GRd:** glutathion reductasa

**GRR:** repeticiones ricas en glicina

**GSH:** glutathion

**GSSG:** glutathion oxidado

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno

**IFN:** interferón

**IκB:** inhibidor kappaB

**IL:** interleuquina

**iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible



**INR:** ratio internacional normalizado

**ipRGCs:** células ganglionares retinianas intrínsecamente fotosensibles

**Kd:** constante de disociación

**KDa:** kilodaltons

**LBD:** dominio de unión a ligando

**LOO•:** radical peroxilo

**LPS:** lipopolisacárido

**PAS:** presión arterial sistólica.

**PAM:** presión arterial media.

**PaO<sub>2</sub>:** presión arterial de oxígeno

**PS.A:** pacientes sépticos agudos.

**PS.R:** pacientes sépticos recuperados.

**PC:** pacientes controles.

**MAO:** monoamino oxidasa

**MPT:** poro de transición mitocondrial

**MT1 (Mel 1a):** receptor de membrana de melatonina tipo 1

**MT2 (Mel1b):** receptor de membrana de melatonina tipo 1

**MT3:** receptor de melatonina tipo 3

**mtDNA:** DNA mitocondrial

**NAD:** nicotinamida adenina dinucleótico

**NAMPT:** nicotinamida fosforibosil transferasa

**NAS:** N-acetil-serotonina

**NF-κB:** factor de transcripción nuclear kappaB

**NLRP3:** proteína 3 de la familia NLR

**NMNAT:** nicotinamida mononucleótido adenilil transferasa

**NO•:** óxido nítrico

**O<sub>2</sub>•-:** anión superóxido

**OH•:** radical hidroxilo

**ONOO-:** peroxinitritos

**PCO<sub>2</sub>:** presión parcial de dióxido de carbono

**PEEP:** presión positiva al final de la espiración

**Per:** período

**PKA:** proteína quinasa A

**PKC:** proteína quinasa C

**Rev-ErbA (NR1D1):** subfamilia 1 de receptor nuclear, grupo D, miembro 1

**RNS:** especies reactivas de nitrógeno

**ROR:** receptor huérfano relacionado con el receptor del ácido retinoico (RAR)

**RORE:** elemento de respuesta de ROR

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**SAPS:** puntuación fisiológica aguda simplificada

**SDRA:** síndrome de distrés respiratorio

**Sirt1:** sirtuína 1

**SOD:** superóxido dismutasa

**SOFA:** evaluación del fallo orgánico dependiente de la sepsis

**SvcO<sub>2</sub>:** saturación venosa central de oxígeno

**TLRs:** receptores tipo *Toll*

**TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

**TPH:** L-triptófano hidroxilasa

**TRAF6:** factor 6 asociado al receptor del TNF

**$\gamma$ gcs:** gamma-glutamilcisteina sintasa

**UCI:** unidad de cuidados intensivos

**VS:** voluntarios Sanos.

*El tiempo es la cosa más valiosa que una persona puede gastar...*

***Theophrastus***

*Los días pueden ser iguales para un reloj, pero no para un hombre*

***Marcel Proust***



## RESUMEN

La sepsis constituye una disfunción orgánica que pone en peligro la vida, causada por una desmedida respuesta del huésped a una infección. shock séptico son uno de los mayores problemas de salud, afectando a millones de personal alrededor del mundo cada año y matando a 1 de cada 4. Al igual que con el politraumatizado, el infarto agudo de miocardio o el ictus, la temprana identificación y el adecuado manejo en las horas iniciales de la sepsis, se consiguen mejores resultados. La sepsis es una infección generalizada provocada por microorganismos Gram- o Gram+ fundamentalmente, que se diseminan por la sangre y generan una respuesta exagerada del sistema inmunitario, dando lugar a un estado de vasodilatación y shock hipovolémico debido a la masiva producción de óxido nítrico (NO) por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que conlleva a una situación de déficit de perfusión tisular, que puede dar lugar a shock séptico y fallo multiorgánico (1, 2).

El diagnóstico precoz de la sepsis es fundamental para implementar un tratamiento lo más rápido y eficaz posible, incluyendo antibióticos. Además, la terapia de la sepsis incluye reanimación de la hipoperfusión inducida por la sepsis, fluidoterapia, fármacos vasoactivos, corticoides, transfusión, anticoagulantes, sedación y analgesia, control glucémico y de tromboembolismo venoso, así como nutrición adecuada, entre otros (3).

La melatonina es una hormona que se identificó inicialmente como un producto de la glándula pineal y relacionada con el control de los ritmos circadianos, incluyendo el ritmo sueño/vigilia, de neurotransmisores cerebrales, ritmos endocrinos, metabólicos, de división celular, etc. Su uso para el control de los problemas de cronodisrupción hace que se hayan alcanzado consensos internacionales para que sea el primer fármaco de elección en el tratamiento de los trastornos del sueño. Esta melatonina pineal está controlada por el reloj biológico localizado en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo, un conjunto de unas 20.000 neuronas que expresan rítmicamente los llamados genes y proteínas reloj

y están sincronizadas a un periodo de 24 horas por el fotoperiodo. La luz ambiental bloquea la producción de melatonina, mientras que la oscuridad la induce, estableciendo el ritmo circadiano de melatonina con su acrofase por la noche. SU síntesis en la pineal se produce a partir del triptófano, via serotonina, que es transformada a melatonina por dos enzimas, AANAT y ASMT (4, 5).

Pero se conoce también que la melatonina se produce en todos los demás órganos y tejidos de la economía, la llamada melatonina extrapineal. Su síntesis es igual que la pineal, pero no está controlada por el fotoperiodo ni sigue un ritmo circadiano. Por el contrario, se sintetiza en la mitocondria y se produce en función del grado de estrés oxidativo de la célula. Debido a que sus concentraciones son mayores que las de la pineal, ejerce potentes funciones antioxidantes, antiinflamatorias, y estimulantes de la bioenergética mitocondrial. Numerosos estudios experimentales y en diferentes modelos de enfermedad incluyendo sepsis, han demostrado que la melatonina modula la respuesta de la inmunidad innata, frenando la activación de NF- $\kappa$ B y su unión al ADN, lo que bloquea la producción de factores proinflamatorios como las citoquinas. Además, la melatonina frena también la segunda vía de activación de la inmunidad innata, el inflamasoma NLRP3, lo que evita la maduración de las citoquinas inducidas por NF- $\kappa$ B, principalmente la IL-1 $\beta$ . En tercer lugar, el daño oxidativo mitocondrial desencadenado por la respuesta inmunitaria de NF- $\kappa$ B libera radicales libres que activan el inflamasoma NLRP3 en el citosol; la melatonina reduce dichos radicales libres, mejora y protege la mitocondria, impidiendo la activación del inflamasoma. Todas estas funciones de la melatonina, cronobiótica y protector celular, son la base de su uso en pacientes de sepsis, habiéndose realizado recientemente un ensayo clínico con éxito (6-8).

Ya que la melatonina está controlada por los genes reloj, se ha estudiado la relación de dichos genes con la inmunidad innata. Se sabe hoy día que el adecuado balance de

*bmal1*, uno de los genes reloj, es fundamental para mantener controlada la inmunidad, y en la sepsis se reduce la expresión de este gen, lo que favorece la activación de la inmunidad la cual, través de citoquinas inflamatorias, altera más el reloj, estableciéndose un círculo vicioso que acelera la progresión de la enfermedad (9).

El presente estudio se diseñó para evaluar la relación entre el ritmo de expresión de los genes reloj, los niveles de melatonina, y el grado de respuesta inflamatoria en pacientes sépticos, comparados con pacientes quirúrgicos no sépticos y sujetos sanos. Se estudiaron otras variables como marcadores de daño oxidativo e inflamatorio, niveles de citoquinas pro- y antiinflamatorias, así como niveles de procalcitonina, protrombina, hemograma y bioquímica rutinaria con marcadores de daño hepático, renal y metabólico.

Nuestros resultados indican la existencia de una alteración significativa de la expresión de los genes reloj en sangre periférica de los pacientes de sepsis, que fue menor que la encontrada en pacientes no sépticos. De manera similar el grado de estrés oxidativo e inflamatorio fue mayor en la sepsis que en no sépticos. Parámetros de evolución de la sepsis, como procalcitonina, también mostraron cambios paralelos a los anteriores. Se observó un aumento de los niveles urinarios de la 6-sulfatoximelatonina, mayor en sepsis, que se correlaciona con los marcadores anteriores. En general, se puede concluir que cuanto mayor es el proceso inflamatorio, mayor es la alteración de los genes reloj, principalmente *bmal1*, mientras que los niveles de melatonina se correlacionan negativamente con la inflamación, siendo considerado el aumento de melatonina como una respuesta del organismo para intentar controlar la inflamación y restablecer el ritmo de expresión de los genes reloj.

En resumen, podemos decir que la alteración de la expresión de *bmal1* está directamente relacionada con la gravedad de la sepsis, y la melatonina se presenta como un fármaco de elección para el co-tratamiento de la sepsis no solo por sus propiedades



antiinflamatorias y antioxidantes, si no también por su capacidad para regular el normal funcionamiento de los genes reloj.

## **Bibliografía**

1. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):762-74.
2. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801-10.
3. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Critical care medicine*. 2017;45(3):486-552.
4. Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol*. 1991;79(1-3):C153-8.
5. Arendt J, Deacon S, English J, Hampton S, Morgan L. Melatonin and adjustment to phase shift. *J Sleep Res*. 1995;4(S2):74-9.
6. Venegas C, Garcia JA, Escames G, Ortiz F, Lopez A, Doerrier C, et al. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res*. 2012;52(2):217-27.
7. Garcia JA, Volt H, Venegas C, Doerrier C, Escames G, Lopez LC, et al. Disruption of the NF-kappa B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor-alpha and blocks the septic response in mice. *FASEB J*. 2015;29(9):3863-75.
8. Acuna-Castroviejo D, Rahim I, Acuna-Fernandez C, Fernandez-Ortiz M, Solera-Marin J, Sayed RKA, et al. Melatonin, clock genes and mitochondria in sepsis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2017;74(21):3965-87.
9. Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, O'Neill LA. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity*. 2014;40(2):178-86.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>1. SEPSIS.....</b>	<b>3</b>
1.1. Cribado de la sepsis.....	3
1.2. Diagnóstico.....	4
1.3. Terapia de la sepsis.....	7
1.3.1. <i>Terapia antimicrobiana</i> .....	7
1.3.2. <i>Resucitación inicial</i> .....	11
1.3.3. <i>Control de recursos</i> .....	12
1.3.4. <i>Fluidoterapia</i> .....	13
1.3.5. <i>Medicamentos vasoactivos</i> .....	13
1.3.6. <i>Corticoides</i> .....	15
1.3.7. <i>Productos sanguíneos</i> .....	16
1.3.8. <i>Anticoagulantes</i> .....	16
1.3.9. <i>Ventilación mecánica</i> .....	17
1.3.10. <i>Sedación y analgesia</i> .....	18
1.3.11. <i>Control glucémico</i> .....	18
1.3.12. <i>Terapia de reemplazo renal</i> .....	19
1.3.13. <i>Profilaxis de tromboembolismo venoso</i> .....	19
1.3.14. <i>Profilaxis de úlceras de estrés</i> .....	20
1.13.214. <i>Nutrición</i> .....	20
<b>2. MELATONINA.....</b>	<b>22</b>
2.1. Síntesis.....	23
2.2. Mecanismos de acción.....	25

2.2.1. Unión a receptores.....	25
2.2.2. Interacción con proteínas citosólicas.....	30
2.2.3. Función antioxidante.....	31
2.2.4. Acción a nivel mitocondrial.....	32
2.3. Actividad antiinflamatoria: melatonina en la sepsis.....	33
<b>3. GENES RELOJ, MELATONINA Y SEPSIS.....</b>	<b>36</b>
3.1. Reloj biológico y genes reloj.....	36
3.2. Genes reloj y sistema inmunitario.....	38
3.3. La inflamación a su vez altera el reloj molecular.....	42
3.4. Melatonina, genes reloj e inflamación.....	43
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
1. Sujetos de estudio.....	53
2. Obtención y preparación de muestras.....	56
3. Determinación de la expresión de los genes reloj.....	58
4. Determinación de las citoquinas plasmáticas.....	61
5. Medida de la oxidación de lípidos de membrana.....	62
6. Medida de la oxidación de proteínas en plasma.....	63
7. Determinación de la excreción urinaria de la 6-SM.....	65
8. Análisis Bioquímico y hematológico.....	66
9. Análisis estadístico.....	67
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
1. Expresión de los genes reloj.....	72
2. Niveles plasmáticos de citoquinas pro- y antiinflamatorias.....	73
3. Daño oxidativo a lípidos y proteínas en plasma.....	75

4. Excreción urinaria de 6-SM.....	76
5. Análisis de correlación entre 6-SM y marcadores de inflamación.....	77
6. Datos hematológicos y bioquímicos.....	78
7. Puntuación clínica de los pacientes.....	79
8. Análisis de correlación entre 6-SM y marcadores de evolución clínica.....	80
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>83</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>91</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXOS: Trabajos publicados de la Tesis Doctoral.....</b>	<b>129</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Síntesis de melatonina.....	23
<b>Figura 2.</b> Esquema del funcionamiento del reloj biológico.....	38
<b>Figura 3.</b> Interacción entre el reloj central y la respuesta del sistema inmunitario.....	9
<b>Figura 4.</b> Ritmo circadiano del sistema inmunitario.....	40
<b>Figura 5.</b> Interacción genes reloj-NF-kB para regular la actividad de la inmunidad.....	42
<b>Figura 6.</b> Ejemplo de curvas de amplificación obtenidas por PCR.....	60
<b>Figura 7.</b> Curva estándar para la determinación de LPO.....	63
<b>Figura 8.</b> Expresión diurna de los genes reloj.....	72
<b>Figura 9.</b> Cambios en los niveles plasmáticos de citoquinas pro- y anti-inflamatorias.....	74
<b>Figura 10.</b> Niveles plasmáticos de LPO y AOPP.....	75
<b>Figura 11.</b> Excreción urinaria de 6-sulfatoximelatonina.....	76
<b>Figura 12.</b> Correlación entre la excreción urinaria de 6-SM y los marcadores de inflamación y estrés oxidativo.....	77
<b>13.</b> Correlación entre la excreción urinaria de 6-SM y los índices de evolución clínica.....	81

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Lista de las secuencias de los cebadores para los genes reloj.....	60
<b>Tabla 2.</b> Distribución de la placa para la medida de LPO.....	65
<b>Tabla 3.</b> Procedimiento para el ELISA de 6-sulfatoximetatonina.....	66
<b>Tabla 4.</b> Datos hematológicos y bioquímicos de los grupos estudiados.....	79
<b>Tabla 5.</b> Datos clínicos de los sujetos de estudio.....	80

## **INTRODUCCIÓN**



## **1. SEPSIS**

La sepsis se define como una disfunción orgánica que pone en peligro la vida, causada por una desmedida respuesta del huésped a una infección (1-3). Hablamos de shock si le sumamos la disfunción circulatoria y metabólica/celular asociada con mayor riesgo de mortalidad. Por otro lado, el shock séptico se define como la hipotensión persistente inducida por la sepsis, a pesar de una adecuada resucitación con fluidoterapia.

La sepsis y el shock séptico son uno de los mayores problemas de salud, afectando a millones de personal alrededor del mundo cada año y matando a 1 de cada 4 o más (4-6). Al igual que en el caso del paciente politraumatizado, el infarto agudo de miocardio o el ictus, con la temprana identificación y el adecuado manejo en las horas iniciales de la sepsis, se consiguen mejores resultados.

Aunque la incidencia de sepsis y shock séptico ha permanecido sin cambios durante los últimos 10 años, la implementación de las guías "Surviving Sepsis Campaign" ha permitido un descenso notable en la mortalidad. La menor severidad de los pacientes en la UCI y la reducción de la mortalidad en las etapas iniciales dependen de un diagnóstico rápido, mejor manejo inicial del paciente, y un tratamiento antibiótico precoz (7).

### **1.1. Cribado de la sepsis**

Para el despistaje de la sepsis, ha quedado demostrado que los sistemas hospitalarios deben tener un programa de mejoría en el manejo de la sepsis, incluyendo programas de cribado de sepsis para los pacientes críticos o en alto riesgo.

Estos programas están asociados con índices de mejoría de los pacientes. Para ello deberían tener una representación multidisciplinar (medicina, enfermería, farmacia,



fisioterapia, dietética y administración) apostando por el desarrollo e implementación de las principales disciplinas implicadas.

Para que un programa de este calibre tenga éxito, se deberían incluir protocolos de desarrollo e implementación, medidas objetivadas evaluables, recogida de datos y la puesta en marcha de estrategias de reflexión para facilitar una mejora continua (8).

Los programas para la mejoría de la sepsis deben dirigirse hacia la temprana identificación de la sepsis mediante un adecuado cribaje y la optimización en el manejo de los pacientes una vez son identificados como sépticos. La falta de un reconocimiento rápido y eficaz impide la realización de una terapia oportuna, teniendo en cuenta que el cribaje de la sepsis está asociado con un tratamiento precoz. Se ha podido comprobar que un adecuado cribaje de esta patología está asociada con un descenso de la mortalidad (9, 10). La implementación de un protocolo de recomendaciones ha sido la piedra angular de la actuación de los programas dirigidos a la mejora en el manejo de la sepsis.

Un meta análisis de 50 estudios observacionales demostró que dichas estrategias se asociaron con una reducción significativa de la mortalidad (11). El estudio más grande hasta la fecha examinó la relación entre las recomendaciones de la SSC (Surviving Sepsis Campaign) y la mortalidad. Se examinó un total de 29.470 pacientes de 218 hospitales en los Estados Unidos, Europa, y Sudamérica durante un año (12). Se observó una mortalidad más baja en hospitales con mayor concordancia con la SSC.

## **1.2 Diagnóstico**

Para hablar del diagnóstico, se han establecido unos criterios partiendo de una infección causada por un microorganismo (bacteria, hongos o virus, siendo más frecuente en nuestro

medio la infección bacteriana), documentada o sospechada, y una o más de las siguientes variables:

<b><u>Variables generales</u></b>	<b><u>Variables inflamatorias</u></b>
Fiebre (>38.3 ° C) o Hipotermia (< 36 ° C).	Leucocitosis (Recuento de células blancas >12.000 $\mu\text{L}^{-1}$ ) o Leucopenia (recuento de células blancas <4000 $\mu\text{L}^{-1}$ ).
Frecuencia cardíaca >90 latidos por minuto o mayor de dos desviaciones estándar por encima del valor normal par la edad.	Recuento normal de células blancas con más del 10% de formas inmaduras.
Taquipnea.	Valores de PCR superiores a dos desviaciones estándar con respecto a la normalidad.
Hiperglucemia (glucosa en plasma >140 mg/dL o 7.7 mmol/L) en ausencia de diabetes.	
Alteración del estado mental.	Valores de procalcitonina superiores a dos desviaciones estándar con respecto a la normalidad.
Edema significativo o balance de fluidos positivo (>20 ml/kg en 24h).	
<b><u>Variables Hemodinámicas y de perfusión tisular</u></b>	<b><u>Variables de disfunción orgánica</u></b>
Hipotensión arterial (PAS <90 mmHg, PAM <70 mmHg, o descenso de la PAS > 40 mmHg en adultos o menos de dos desviaciones estándar por debajo del valor normal para la edad).	Hipoxemia arterial ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$ ). Trastornos de la coagulación (INR >1.5 o un aPTT >60 segundos).
Hiperlactatemia (>1 mmol/L).	Oliguria aguda (índice urinario < 0.5 ml/kg/h durante al menos dos horas, a pesar de una adecuada fluidoterapia). Incremento de la creatinina >0.5 mg/dL o 44.2 $\mu\text{mol/L}$ .
Disminución del relleno capilar.	Íleo (ausencia de ruidos intestinales). Hiperbilirrubinemia (bilirrubina total plasmática >4 mg/dL o 70 $\mu\text{mol/L}$ ).

Y, para hablar de sepsis severa:

Hipoperfusión inducida por la sepsis o disfunción orgánica (cualquiera de las siguientes debe ser causada por la infección)
Hipotensión inducida por la sepsis.
Lactato por encima de valores de laboratorio normales.
Índice urinario < 0.5 ml/kg/h durante más de dos horas a pesar de una adecuada fluidoterapia. Creatinina > 2.0 mg/dL.
Daño pulmonar agudo con PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> < 200 en ausencia de neumonía o foco infeccioso pulmonar.
Bilirrubina > 2mg/dL.
Recuento plaquetario < 100.000 $\mu\text{L}^{-1}$

La esterilización de los cultivos puede ocurrir en pocos minutos u horas tras la administración de la primera dosis del antibiótico adecuado (13, 14); así que, priorizando la obtención de cultivos a la administración de antimicrobianos se consigue más precisión en la identificación del patógeno. El aislamiento de un organismo u organismos infeccioso(s) permite la retirada paulatina de la terapia antimicrobiana al principio y después una vez obtenidas las sensibilidades a las mismas. La reducción de escalas antimicrobianas constituye un pilar en los programas administrativos y está relacionada con la menor aparición de resistencias de los microorganismos, menores efectos adversos y costes (15). Varios estudios retrospectivos han sugerido que la priorización de la obtención de cultivos a la terapia antimicrobiana está asociada a un mejor pronóstico (16). Igualmente, diversos estudios sugieren que su suspensión progresiva se asocia a un aumento de la supervivencia (17, 18). El deseo de priorizar la obtención de cultivos al inicio de la terapia antimicrobiana debe ser equiparado y sopesado en relación al riesgo de mortalidad por el retraso en el tratamiento en los pacientes críticos con sospecha de sepsis o shock séptico que están en riesgo significativo de muerte (19, 20).

Se recomienda priorizar la obtención de hemocultivos a la terapia antimicrobiana. En caso contrario, el riesgo/beneficio prima la rápida administración de antimicrobianos. Por lo tanto, en pacientes con sospecha de sepsis o shock séptico, los cultivos microbiológicos de rutina deberían ser obtenidos de todos los posibles focos de infección antes del inicio de los antimicrobianos siempre y cuando no impliquen un retraso substancial en el inicio del tratamiento. Dichas muestras pueden incluir sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, heridas, secreciones respiratorias y otros fluidos corporales si bien, a veces, hay que incluir muestras que tengan que ser obtenidas por medios invasivos tales como la broncoscopia o la cirugía abierta. La decisión con respecto a qué sitios se requieren para cultivar tiene que ser sopesada cuidadosamente por el “equipo terapéutico”. El hecho de tomar cultivos de todos los sitios potencialmente cultivables podría resultar desalentador (a menos que el foco de la sepsis no sea clínicamente aparente), porque esta práctica puede llevar al uso indebido de antimicrobianos (21). Si la historia o la exploración física indican claramente un sitio anatómico específico de infección, el cultivo de otros sitios es generalmente innecesario. Se recomienda de forma general, una espera de 45 minutos aproximadamente entre la toma de cultivos y el inicio de antimicrobianos.

### **1.3 Terapia de la sepsis**

#### ***1.3.1 Terapia antimicrobiana***

En cuanto al tratamiento antimicrobiano, con un nivel de evidencia moderado, se recomienda que la administración de antimicrobianos por vía endovenosa sea iniciada tan pronto como sea posible tras identificar el estado de sepsis o shock séptico. La rapidez de la administración es fundamental para la obtención de los efectos beneficiosos de los

antimicrobianos apropiados. En presencia de sepsis, cada hora de retraso en su administración está asociada con un importante aumento de la mortalidad (19, 22). Además, algunos estudios muestran otros efectos adversos, como fallo renal agudo (23), lesión pulmonar (24), y fallo multiorgánico (25) con dicho retraso.

Con igual nivel de evidencia, se recomienda la terapia empírica de amplio espectro con uno o más antimicrobianos que cubran la mayoría de los patógenos en este tipo de pacientes (incluyendo bacterias, hongos e incluso cobertura antiviral). Con todo ello, una vez se identifique el patógeno y sus sensibilidades establecidas y/o mejoría clínica acompañante, se aconseja la progresiva reducción de dicha cobertura antimicrobiana.

El inicio de la terapia antimicrobiana apropiada (con actividad frente al patógeno o patógenos causantes) es una de las facetas más importantes en el manejo de las infecciones potencialmente mortales en pacientes con sepsis o shock séptico. El error en este aspecto conlleva a un aumento significativo en la morbimortalidad de estos pacientes (26-28). Además, la selección de un régimen antimicrobiano empírico en sepsis/shock séptico es uno de los determinantes centrales en el pronóstico. Algunos factores que deben ser tenidos en cuenta para determinar dicho régimen en cada uno de los centros médicos y para cada paciente, incluyen:

- a) El lugar anatómico de infección con respecto al perfil típico patogénico y a las propiedades de los antimicrobianos para penetrar en esos lugares.
- b) La prevalencia de los patógenos dentro de una comunidad u hospital.
- c) Los patrones de resistencia de aquellos patógenos prevalentes.

d) La presencia de defectos inmunes específicos como la neutropenia, esplenectomía, infección por VIH pobremente controlada y defectos de las inmunoglobulinas, complemento o leucocitos congénitos o bien adquiridos.

e) La edad y las comorbilidades de los pacientes incluyendo patologías crónicas (ej., diabetes) y disfunciones orgánicas crónicas como la insuficiencia renal o hepática, así como la presencia de dispositivos invasivos (catéteres venosos centrales) que pudieran comprometer la defensa a la infección.

Debido a que la vasta mayoría de pacientes con sepsis severa o shock séptico tienen una o más formas de inmunodeficiencia, el régimen inicial empírico debería ser lo suficientemente amplio para cubrir la mayoría de patógenos aislados en las infecciones nosocomiales. En la mayor parte de los casos, se usan los carbapenémicos de amplio espectro (Meropenem, Imipenem/Cilastina o Doripenem) en combinación con Penicilina/ $\beta$ -lactamasa de amplio espectro (Piperacilina/Tazobactam o Ticarcilina/clavulánico). La adición de un agente para gram negativo al régimen empírico está recomendado en los pacientes críticos con alto riesgo de infección por microorganismo multirresistente (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, etc), con el fin de aumentar la probabilidad de efectividad de al menos un agente administrado (29). Si existe riesgo de MRSA (*Meticilin Resistent Staphiloccocus Aureus*) se puede emplear Vancomicina, Teicoplanina o algún otro agente antimicrobiano. Si, por otro lado, existe gran riesgo de infección por especies de *Legionella*, convendría añadir un macrólido o fluorquinolona. El clínico también debe considerar la posibilidad de patógenos tipo *Cándida* cuando se decide la pauta terapéutica inicial.

Una vez identificado el patógeno, debe procederse al ajuste del tratamiento reduciendo antibioterapia empírica hasta el agente más efectivo. Sin embargo, uno de cada tres pacientes con sepsis no tiene un patógeno causal identificado (30). Dados los riesgos sociales e individuales de continuar con una terapia antimicrobiana innecesaria, se recomienda fervientemente el ajuste de los antimicrobianos en función de la mejoría clínica incluso si los cultivos son negativos.

Tampoco se recomienda la profilaxis antimicrobiana en estados de inflamación sistémica sin origen infeccioso como por ejemplo en grandes quemados o pancreatitis severa. Para procedimientos específicos invasivos puede ser recomendable añadir una pauta corta de profilaxis. Adicionalmente, si hay gran sospecha de sepsis o shock séptico concomitante en pacientes con un estado inflamatorio severo sin origen infeccioso, la terapia antimicrobiana estaría indicada. Evidentemente, la dosis de antimicrobianos debe ajustarse y optimizarse a los principios farmacodinámicos y farmacocinéticos en este tipo de pacientes.

En cuanto a medidas para controlar la duración de la terapia antimicrobiana en los pacientes sépticos, no hay gran evidencia de ninguno en concreto, si bien se emplea en muchas ocasiones la determinación de los niveles de procalcitonina en estos pacientes. La medida de la procalcitonina sérica es comúnmente utilizada en muchas partes del mundo para ayudar en el diagnóstico de infección aguda y para definir la duración de la terapia antimicrobiana. Varios metaanálisis sugieren que la procalcitonina también puede usarse para ayudar a la diferenciación en la presentación de condiciones infecciosas y no infecciosas (31-33).

### **1.3.2. Resucitación inicial**

Como ya sabemos, la sepsis y el shock séptico son emergencias médicas, así que se recomienda que el tratamiento y reanimación se lleven a cabo inmediatamente. En la reanimación de la hipoperfusión inducida por sepsis, se debe empezar al menos con una dosis de cristaloides de 30 mL/kg intravenoso, dentro de las primeras 3 horas (34-36). Siguiendo a la fluidoterapia inicial, los líquidos adicionales deben calcularse en función del estado hemodinámico y respiratorio (frecuencia cardíaca, tensión arterial, saturación de oxígeno arterial y venosa, frecuencia respiratoria, temperatura, diuresis y otras variables). También debemos determinar el tipo de shock si el examen clínico no ayuda a esclarecer el diagnóstico.

Para medir la respuesta a la fluidoterapia, se prefieren las variables dinámicas sobre las estáticas. Además, debemos centrarnos en un objetivo inicial de presión arterial media de 65 mm Hg en pacientes con shock séptico que requieran vasopresores y normalizar el ácido láctico cuando éste se encuentre elevado como marcador de hipoperfusión tisular.

La resucitación temprana efectiva con fluidos es crucial para la estabilización de la hipoperfusión tisular inducida por la sepsis o el shock séptico. Esta hipoperfusión se puede manifestar mediante la disfunción orgánica aguda y/o el descenso de la presión arterial media y la elevación de los niveles de ácido láctico sérico, así que, uno de los principales y más importantes principios para entender el manejo de estos pacientes es la necesidad de realizar una evaluación inicial detallada seguida de una reevaluación de la respuesta al tratamiento. Esta evaluación debería empezar con un examen clínico completo y una valoración de las variables fisiológicas que describan el estado clínico del paciente ya



mencionadas anteriormente. En los últimos años, la ecocardiografía ha llegado a ser útil para valorar las causas de las alteraciones hemodinámicas (37).

Por otro lado, el uso de la presión venosa central aislada (PVC) para guiar la resucitación con fluidos ya no está justificada (37), debido a la limitación para predecir una respuesta a fluidos cuando la PVC se encuentra dentro de los rangos de normalidad (8-12 mm Hg) (38). Las medidas dinámicas para valorar si un paciente requiere fluidoterapia adicional han demostrado mayor precisión diagnóstica en predecir si esos pacientes son probables respondedores a la carga de volumen. Estas técnicas incluyen la elevación de piernas, los cambios en el volumen sistólico con la administración de líquido, o las variaciones en la presión sistólica, la presión del pulso o los cambios en el volumen sistólico inducidos por la presión intratorácica en ventilación mecánica (39).

### **1.3.3. Control de recursos**

Se recomienda el examen anatómico específico diagnóstico de la infección requiriendo un control exhaustivo del entorno, así como la identificación y exclusión de factores de riesgo y la retirada rápida de accesos intravasculares que pudieran ser una fuente de patógenos en la sepsis/shock séptico después de haber obtenido otros accesos.

La experiencia clínica sugiere que, sin un adecuado control del foco, algunas formas de presentación más severas (sepsis o shock séptico) no se estabilizarán o mejorarán a pesar de una rápida resucitación y provisión de antimicrobianos adecuados. De hecho, la priorización de esfuerzos en la estabilización médica en lugar de en el control del foco para los pacientes más severos, particularmente aquellos con shock séptico, no está generalmente aconsejada (40). Deben valorarse los distintos riesgos/beneficios de cada

método de control del foco, priorizando los menos invasivos y dejando los procedimientos quirúrgicos mayores como última medida.

#### **1.3.4. Fluidoterapia**

Los cristaloides son la primera línea para resucitación inicial y reemplazo intravascular subsiguiente en pacientes sépticos y en shock séptico. Además, se sugiere la adición de albúmina cuando se requieren mayores cantidades de cristaloides, aunque con menor evidencia. No se recomienda el uso de coloides de tipo almidón ni gelatinas para el reemplazo intravascular de volumen en estos pacientes.

#### **1.3.5. Medicamentos vasoactivos**

Como fármaco vasopresor de primera elección se recomienda la noradrenalina para alcanzar el objetivo de una presión arterial media (PAM). Para protección renal en estos casos, se puede utilizar la dopamina a dosis bajas con un alto grado de evidencia.

Los efectos fisiológicos de los vasopresores y la combinación de inotropos/vasopresores en el shock séptico están ampliamente descritos en las revisiones de la literatura (41-45). La noradrenalina aumenta la PAM debido a su efecto vasoconstrictor, con ligeros cambios menores en la frecuencia y el gasto cardíaco en comparación a la dopamina. Esta última eleva la PAM y el índice cardíaco debido, sobre todo, a un aumento del volumen sistólico y la frecuencia cardíaca. La noradrenalina es más potente que la dopamina y puede ser más efectiva para revertir la hipotensión en pacientes con shock séptico. La dopamina puede ser particularmente útil en pacientes con compromiso de la función sistólica pero causa mayor taquicardia y puede ser mas

aritmogénica que la noradrenalina (46). Además, también puede influir en el sistema endocrino a través del eje hipotálamo-hipofisario y tener efectos inmunosupresores (47).

Se han reportado niveles bajos de vasopresina durante el estado de shock. Por ello, dosis bajas de vasopresina puede ser efectiva para alcanzar niveles adecuados de PAM en pacientes refractarios a los otros vasopresores y puede tener beneficios potenciales fisiológicos (48-50). Al igual ocurre con la terlipresina pero durante mayor tiempo de acción (51). Varios estudios han demostrado que las concentraciones de vasopresina están elevadas al principio del shock séptico, pero descienden a un rango normal en la mayoría de pacientes entre las 24 y 48 horas de la continuación del shock (52). Este hallazgo ha sido nombrado “la deficiencia relativa de vasopresina” porque, en presencia de hipotensión, sería esperable encontrar niveles elevados de vasopresina. Otro fármaco vasopresor como la fenilefrina (agonista puro  $\alpha$ -adenérgico) aún carece de evidencia suficiente en estos casos para valorar su efecto beneficioso.

La disfunción miocárdica consecuyente con la infección ocurre en un amplio sector de pacientes con shock séptico; sin embargo, el índice cardíaco suele estar preservado debido a la dilatación ventricular, taquicardia y reducción de la resistencia vascular periférica (53). Algunos de estos pacientes pueden tener disminuida la reserva cardíaca y no ser capaces de alcanzar un índice cardíaco adecuado para aportar el suficiente oxígeno. El reconocimiento de esto último puede ser todo un reto. Se prefieren las medidas concomitantes del índice cardíaco más allá de una medida de perfusión adecuada.

En las situaciones en las que se sospecha un índice cardíaco bajo con el consiguiente aporte de oxígeno bajo, siempre y cuando sea en presencia de una adecuada PAM y precarga, el fármaco de primera elección es la dobutamina. Los datos que apoyan a la dobutamina son principalmente fisiológicos, con una mejoría hemodinámica y de los índices

de perfusión, que pueden incluir la mejoría clínica, descenso de los niveles de lactato y mejoría de la saturación venosa central (SvcO<sub>2</sub>).

Aunque hay sólo algunos estudios, se han propuesto alternativas a los agentes inotrópicos para incrementar el índice cardíaco en situaciones específicas. Es el caso de los inhibidores de la fosfodiesterasa que actúan aumentando el AMP cíclico y producen efectos inotrópicos independientes de los receptos beta adrenérgicos. Algunos estudios demuestran que la milrinona puede aumentar el índice cardíaco. Por otro lado, el levosimendán eleva la respuesta del miocito a los niveles de calcio y también abre los canales de potasio ATP-dependientes, dando al fármaco propiedades inotrópicas y vasodilatadoras. Dado el potencial papel del control de los niveles anormales de calcio y la depresión de la función miocárdica inducida por la sepsis, se ha propuesto el uso del levosimendán en el shock séptico. Sin embargo, debido al elevado coste en comparación a la dobutamina, esta última permanece como primera opción en dichos pacientes (3).

Por último, se recomienda que todos los pacientes que reciban fármacos vasopresores tengan un catéter arterial, siempre y cuando los recursos lo permitan, ya que, en los estados de shock, la estimación de la presión arterial mediante manguito, especialmente en los sistemas automatizados, puede ser inadecuada. El uso de una cánula arterial proporciona mayor precisión y una medida más reproducible de la presión arterial.

### **1.3.6. Corticoides**

Con un nivel de evidencia bajo, se sugiere usar hidrocortisona IV para tratamiento de shock séptico en los pacientes que no responden a una adecuada fluidoterapia y con fármacos vasoactivos a dosis de 200 mg/día. Los esteroides podrían estar indicados cuando haya historia de terapia con corticoides previos o disfunción adrenal (54).

### **1.3.7. Productos sanguíneos**

Con un nivel alto de evidencia, se recomienda la administración de concentrado de hematíes solamente cuando la concentración de hemoglobina esté por debajo de 7 g/dL, en adultos y en ausencia de otras circunstancias extenuantes como isquemia miocárdica, hipoxemia severa o hemorragia aguda. No se recomienda el uso de eritropoyetina para el tratamiento de la anemia asociada a la sepsis (55), así como tampoco se aconseja el uso profiláctico de plasma fresco congelado en ausencia de sangrado activo o procedimientos invasivos planificados.

Tampoco existe demasiada evidencia con respecto a la transfusión profiláctica de plaquetas cuando el recuento sea  $<10000/\text{mm}^3$  en ausencia de sangrado aparente y cuando el recuento es  $>20000/\text{mm}^3$  si el paciente tiene un riesgo significativo de sangrado. Mantener un recuento plaquetario  $>50000/\text{mm}^3$  está aconsejado en caso de sangrado activo, cirugía o procedimientos invasivos (56).

No se ha encontrado evidencia beneficiosa en el empleo de inmunoglobulinas y son pocos los estudios acerca del empleo de técnicas de purificación sanguínea, con algún meta-análisis acerca de la hemoadsorción con polimixina B para limpiar de endotoxinas la sangre (57).

### **1.3.8. Anticoagulantes**

No se recomienda el empleo de antitrombina así como de trombomodulina o heparina para el tratamiento de la sepsis o shock séptico en los casos de coagulación intravascular diseminada (58).

### **1.3.9. Ventilación mecánica**

Existe un alto nivel de evidencia y recomendación en el uso de volumen tidal (VT) de 6 mL/kg de peso corporal estimado comparado con los 12 mL/Kg en adultos con síndrome de distress respiratorio (SRDA) inducido por la sepsis, así como la limitación en la presión plateau por debajo de 30 cm H<sub>2</sub>O (7). Estas recomendaciones están basadas en la definición de Berlín de 2012 del Distress Respiratorio y su clasificación en leve, moderado y severo (PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> ≤300, ≤200, y ≤100 mm Hg, respectivamente) (59).

Con algo menos nivel de evidencia, se recomiendan estrategias de ventilación mecánica con niveles de PEEP (presión positiva al final de la espiración) por encima de 5 cm H<sub>2</sub>O para evitar el colapso de las unidades alveolares, así como de la utilización de maniobras de reclutamiento en aquellos pacientes con SDRA asociado a sepsis (siempre y cuando no conduzcan al deterioro clínico del paciente).

Igualmente, dentro de la estrategias y modalidades de ventilación mecánica en estos casos, se aconseja, con un adecuado nivel de evidencia, la ventilación en posición decúbito prono en aquellos pacientes con una PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio <150. En estos casos, el uso del decúbito prono en comparación a la posición en supino dentro de las primeras 36 horas de intubación y realizadas durante >16 horas, mostraron un aumento de supervivencia (60). Además, cabe destacar también el empleo de la ventilación con alta frecuencia oscilatoria en los casos moderados-severos.

Para facilitar la ventilación mecánica, se sugiere el empleo de bloqueantes neuromusculares en los casos de SDRA con PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> <150, ya que mejoran la complianza de la pared torácica, previene el desacoplamiento respiratorio y reduce las presiones pico de la vía aérea. En cuanto a la fluidoterapia en estos casos, se recomienda una estrategia conservadora siempre y cuando no haya evidencia de hipoperfusión tisular.

Con menor nivel de evidencia, el uso de volúmenes tidal de ventilación bajos (4-6mL/kg) en pacientes bajo cirugía abdominal, incluyendo los sépticos, han demostrado tener menor incidencia de fracaso respiratorio, resultando en una reducción de episodios de sepsis postoperatoria (61). Por otro lado, la elevación del cabecero a 30-45° ha demostrado la reducción del riesgo de broncoaspiración así como del desarrollo de neumonía asociada a ventilación mecánica (62).

Por último, para la extubación de los pacientes en ventilación mecánica, resulta beneficioso la utilización de “protocolos de extubación” así como de test de respiración espontánea o con bajo soporte respiratorio, antes de la misma (63, 64).

#### **1.3.10. Sedación y analgesia**

En los pacientes con ventilación mecánica, se recomienda minimizar la sedación ya que reduce la duración de la misma, así como una temprana movilización (65, 66). Además, el uso de fármacos de acción corta como el propofol y la dexmedetomidina consiguen mejores resultados que las benzodiacepinas en estos casos (67-69).

#### **1.3.11. Control glucémico**

Se recomienda mantener niveles de glucosa comprendidos entre 180 mg/dL y 110 mg/dL mediante el empleo de protocolos (70). Se debe realizar un control de los niveles glucémicos cada hora o dos horas hasta estabilización de los mismos, así como de las dosis de insulina; además, interpretar con cautela los niveles de glucemia obtenidos por punción de capilar, ya que podrían ser distintos de los niveles plasmáticos reales de glucosa (71).

### **1.3.12. Terapia de reemplazo renal**

La terapia de reemplazo renal, bien sea de tipo continuo o intermitente, se aconseja en los casos de sepsis y fallo renal agudo a pesar de que en numerosos estudios no se hayan encontrado diferencias en cuanto a mortalidad (72-74). La terapia de tipo continuo está aconsejada para facilitar el balance de la fluidoterapia en pacientes sépticos inestables, aunque con muy poco nivel de evidencia (75).

Por otro lado, no se aconseja el uso de terapia de reemplazo renal en pacientes sépticos y con fallo renal agudo en el que solamente haya una elevación de creatinina u oliguria sin otras indicaciones definitivas para diálisis.

Además, no se recomienda añadir bicarbonato de sodio para mejorar el estado hemodinámico o disminuir los requerimientos de vasopresores cuando tengan acidosis láctica con  $\text{pH} > 7.15$  por hipoperfusión ya que se ha relacionado con casos de sobrecarga de líquidos, incremento de lactato y  $\text{PCO}_2$  y un descenso en el calcio iónico sérico.

### **1.1.13 Profilaxis de tromboembolismo venoso**

Teniendo en cuenta que los pacientes ingresados en una Unidad de Cuidados Intensivos están en riesgo de trombosis venosa profunda así como de tromboembolismo pulmonar, y que este riesgo es mayor en pacientes sépticos o con shock séptico, se aconseja la profilaxis farmacológica (heparina no fraccionada y heparina de bajo peso molecular) si no hay contraindicación (76). En cuanto al tipo de heparina, se ha demostrado en un meta-análisis de Alhazzani et al (76) que el uso de heparina de bajo peso molecular reducía más el riesgo de tromboembolismo pulmonar con respecto a la heparina no fraccionada.

Si es cierto que hay que tener en cuenta la función renal en estos pacientes sometidos a profilaxis tromboembólica y de trombosis venosa con heparina. Además, los



resultados de una revisión sistemática de 11 estudios en la base de datos Cochrane han demostrado una mayor efectividad con la combinación de profilaxis farmacológica con mecánica (compresión neumática intermitente o medias de compresión graduadas) en la prevención de fenómenos tromboembólicos (77). En aquellos casos en los que la profilaxis farmacológica esté contraindicada, se aconseja el empleo de medidas mecánicas, aunque con menor nivel de evidencia.

#### **1.3.14. Profilaxis de úlceras de estrés**

Las úlceras de estrés se desarrollan en el tracto gastrointestinal de los pacientes críticos y pueden estar asociadas con una morbilidad importante. Si bien los mecanismos implicados no están del todo claros, parece que están relacionados con la disrupción de los mecanismos protectores del ácido gástrico, la hipoperfusión de la mucosa gástrica, un incremento de la producción ácida y un daño oxidativo del tracto digestivo (78). Además, unos de los predictores clínicos de riesgo de sangrado gastrointestinal en los pacientes críticos son la ventilación mecánica >48h y la coagulopatía. Por ello, se recomienda en estos casos la profilaxis de úlceras de estrés con inhibidores de la bomba de protones o antagonistas del receptor de histamina-2 (79). En aquellos casos en los que no existan factores de riesgo de sangrado gastrointestinal no se recomienda la profilaxis de úlceras de estrés.

#### **1.3.15. Nutrición**

En general, la nutrición parenteral es mejor que la enteral cuando los pacientes están desnutridos debido a la intolerancia gastrointestinal, lo cual pudiera ser beneficioso en los primeros días en la Unidad de Cuidados Intensivos. Sin embargo, es más invasiva y está

asociada a más complicaciones, entre otras, el riesgo de infección. Por ello, en los pacientes sépticos, se prefiere la nutrición enteral, ya que supuestamente se consiguen beneficios más fisiológicos que con la parenteral (80).

Además, ciertos estudios han demostrado que no es aconsejable iniciar la nutrición parenteral, bien sola o en asociación con alimentos enterales en la primera semana en estos pacientes, cuando la nutrición enteral no fuera factible, aunque se puede iniciar glucosa IV o complejos nutricionales (81, 82).

Se ha podido ver también que la temprana administración de nutrición enteral en los pacientes sépticos tiene unas ventajas potencialmente beneficiosas en cuando a la integridad nutricional, prevención de cambios de permeabilidad intestinal, y modulación de las respuestas metabólicas que reducen la resistencia a la insulina. Sin embargo, no se han podido ver diferencias significativas en términos de mortalidad (83). Tampoco se ha visto mejoría con el empleo de suplementos como ácidos grasos Omega-3 (84).

En cuanto a la monitorización del volumen gástrico residual, no se recomienda su medida de forma sistematizada. Sin embargo, podría ser recomendable siempre y cuando los pacientes presenten intolerancia a la alimentación o que se encuentren en verdadero peligro de aspiración (85, 86). En estos casos, sin haber mucha evidencia, se recomienda el uso de procinéticos o la colocación de sonda de alimentación postpilórica para evitar el riesgo de aspiración

## 2. MELATONINA

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina (aMT), fue descrita inicialmente por McCord y Allen (87), aunque sin darle ese nombre, y aislada por primera vez por Lerner en el año 1958 (88). En 1959 se identificó la estructura química de esta indolamina, y se propuso el nombre de melatonina (89). Químicamente, esta molécula conforma un cristal orgánico, de aspecto blanco, con un peso molecular de 232.38 Da, cuyo punto de fusión se encuentra entre 116-118 °C, con poca hidrosolubilidad y soluble en etanol y DMSO.

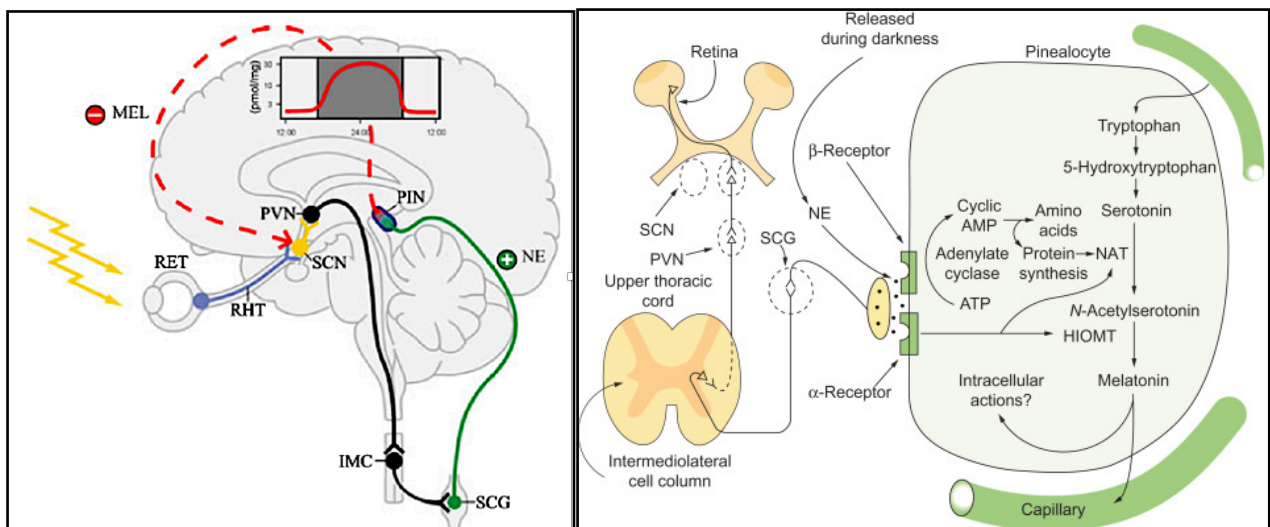
La melatonina ha estado presente a lo largo de la evolución, ya desde organismos muy primitivos como cianobacterias, algas unicelulares, y parásitos como *Tripanosoma cruzi*, hasta organismos actuales, incluyendo todos los seres vivos, animales y plantas (90-92). Además, se distribuye generalmente través de todo el organismo. Debido a esto, se piensa que su existencia viene determinada, entre otros factores, por un mecanismo compensador para amortiguar el efecto nocivo del oxígeno (por la producción de radicales libres), que han ido utilizando los distintos organismos a través de los mecanismos de adaptación.

La melatonina quedó enmarcada primeramente como un sistema de regulación de los ritmos circadianos y reproductores. Sin embargo, a posteriori se comprobó que, además, posee un potente mecanismo de depuración de los radicales libres (93), así como inductor de los enzimas de la defensa antioxidante endógena a través de su interacción con receptores nucleares para la melatonina en distintos órganos periféricos (94-96). También se demostró la interacción de la melatonina con diversas proteínas citosólicas relacionadas con el calcio tales como la proteína quinasa C, la calmodulina (97-99) y la calreticulina (100), así como su papel en la conservación de la homeostasis mitocondrial (96).

## 2.1. Síntesis

El lugar inicial donde se descubrió la síntesis de melatonina en los mamíferos fue en la glándula pineal que, conectada con el núcleo supraquiasmático, posee los enzimas necesarios para su síntesis a partir del triptófano vía serotonina, y cuya actividad se veía condicionada por los ciclos luz-oscuridad (101). Por ello, dicha síntesis proporciona una señal, la melatonina, que actúa como mensajero que codifica la duración de la oscuridad (102).

Partiendo del triptófano (aminoácido obtenido de la circulación por el pinealocito a través de un sistema de transporte activo), la síntesis de melatonina tiene lugar en una serie de pasos sucesivos (**Figura 1**).



**Figura 1.** Síntesis de melatonina. Izquierda, mecanismo nervioso de control de la producción de melatonina.

Derecha, mecanismo bioquímico de síntesis de la melatonina.

Dicho aminoácido se convierte primeramente en 5-hidroxitriptamina o serotonina al sufrir un proceso de hidroxilación y subsecuente descarboxilación por medio de la L-triptófano hidroxilasa (TPH) y la 5- hidroxitriptófano descarboxilasa, respectivamente. Una

vez sintetizada y a través de una desaminación gracias a la acción de la monoamino oxidasa (MAO) o a la acetilación de la arilquilamina N-acetiltransferasa (AANAT), se origina, como consecuencia, la N-acetil-5- hidroxitriptamina o N-acetil-serotonina (NAS). Para terminar, la NAS sufre una metilación mediada por la N-acetilserotonina-O-metiltransferasa (ASMT) generando la molécula de 5-hidroxitriptamina o melatonina (103).

Por un lado se identificó a la AANAT como la enzima que limitaba este procedimiento de síntesis pero, al expresar el mismo ritmo circadiano que la melatonina e inhibirse similarmente su actividad con la luz, estudios recientes demuestran que la síntesis de melatonina no se ve afectada tanto por el descenso o aumento mantenido en la actividad de la AANAT, lo que indica que la enzima reguladora de la biosíntesis de esta hormona podría ser la ASMT (104).

Además de la síntesis anteriormente descrita a nivel pineal, se ha podido identificar que dicha síntesis se produce en casi todos los órganos y tejidos del organismo, así como en células no endocrinas como eosinófilos, plaquetas, células endoteliales y células natural killer (105-107). Igualmente, existe variación en los niveles de melatonina 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 (106). Lo mismo ocurre con la variación circadiana de los receptores de melatonina, tanto en membrana como nucleares (108). A diferencia de la melatonina pineal, la cual se libera rápidamente al sistema vascular, la melatonina extrapineal o producida en los tejidos permanece en el interior celular y no sale a la circulación, lo que indica que su acción biológica puede ser diferente a la de origen pineal (106, 107).

## 2.2. Mecanismos de acción

Aunque por las características lipofílicas de la melatonina se había considerado que podía atravesar las membranas celulares con facilidad, gracias a los trabajos de Venegas y cols (106) sabemos hoy en día que no es cierta tal afirmación. Tanto la membrana plasmática como la nuclear y mitocondrial, presentan mecanismos de regulación para la entrada de la melatonina, evitando de esta forma un exceso de concentración de melatonina en el interior de la célula. Este mecanismo de regulación puede ser fundamental para el correcto funcionamiento de la célula, debido al importante efecto reductor que tiene la melatonina. Además, debido a la identificación de diferentes dianas celulares, se sugiere que sus acciones pueden estar reguladas por una serie de mecanismos. Dichos mecanismos son:

- 1) Unión a receptores de membrana y nucleares.
- 2) Interacción con proteínas citosólicas.
- 3) Antioxidante de acción directa e indirecta.
- 4) Antiinflamatorio.
- 5) Acción a nivel mitocondrial.

### 2.2.1. Unión a receptores

Como receptores de membrana, se han podido identificar dos acoplados a proteínas G, como son MT1 (Mel 1a) y MT2 (Mel 1b) que, aunque son homólogos en un 60% de su secuencia de aminoácidos, poseen amplias diferencias (109). El receptor MT2 posee menor afinidad ( $K_d = 160 \text{ pmol/L}$ ) para el radioligando  $^{125}\text{I}$ -melatonina con respecto a la mostrada por MT1 ( $K_d = 20\text{-}40 \text{ pmol/L}$ ) (110).

Ambos receptores parecen expresarse por todo el cuerpo, aunque la distribución de MT2 parece estar más limitada al cerebro. No obstante, la expresión de estos receptores depende de muchos factores externos e internos, como la especie, el tejido, la luz ambiental, el estado endocrino y el estado del desarrollo en que se encuentre el individuo (111). La interacción de la melatonina con cada uno de estos receptores produce distintas manifestaciones: mientras que los MT1 asociados a proteínas  $G_1$  generan la inactivación de la adenilato ciclasa y activación de la fosfolipasa  $C\beta$ , MT2, por otra parte, inhibe la vía de la guanilato ciclasa soluble (112).

Posteriormente se ha podido identificar otro receptor de membrana presente en hámsters, llamado MT3 (113), caracterizándose posteriormente como una quinona reductasa 2. Este subtipo de receptor de melatonina, sin embargo, no se ha localizado en la especie humana.

Por último, hay que tener en cuenta que las respuestas mediadas por la melatonina son muy complejas y variadas, ya que dependen de diversos factores como la hora del ritmo circadiano, la duración de la exposición, la mayor o menor presencia de melatonina endógena y la sensibilidad del receptor a la melatonina.

En cuanto a la interacción con los receptores nucleares, el primer indicio se obtuvo al encontrarse una elevada concentración de la hormona asociada a la cromatina (114). Más tarde, Menéndez-Peláez y cols (115, 116) demostraron la presencia de melatonina en el núcleo y, mediante el empleo de la  $^{125}I$ -iodomelatonina, Acuña-Castroviejo y cols (1993-1994) demostraron su unión específica a la fracción proteica del núcleo de hígado de rata (117, 118), implicando con ello, la existencia de receptores nucleares para la melatonina.

En 1994 Becker-Andre y cols (119) pudieron demostrar una acción genómica de la melatonina por medio de los receptores nucleares ROR, un subtipo de receptores nucleares o factores de transcripción dependientes de ligando que otorgan a los organismos la capacidad para controlar la expresión génica en respuesta a un amplio rango de factores tanto ambientales como fisiológicos y de desarrollo. Sin embargo, existe controversia actual acerca de si los factores de transcripción ROR son verdaderos receptores nucleares de melatonina, a pesar de que se han aportado evidencias significativas de que esto es así (120, 121), y recientemente se han presentado datos experimentales que lo sustentan (122).

El grupo de receptores pertenecientes a la familia ROR/RZR (del inglés retinoid-related orphan receptor/retinoid Z receptor) se divide en tres subtipos, ROR $\alpha$  (123, 124); ROR $\beta$  (95), and ROR $\gamma$  (125), localizados en los cromosomas 15q22.2, 9q21.13 y 1q21.3, respectivamente (126). Debido a las variantes existentes de splicing, cada gen posee varias isoformas, las cuales se diferencian sólo en su extremo amino terminal (127, 128). En humanos, se han encontrado 4 isoformas de ROR $\alpha$  (ROR $\alpha$  1-4), mientras que en ratón solo se describieron las isoformas 1 y 4. De las dos isoformas que genera ROR $\beta$ , en humanos sólo se expresa la 1 (128), y en ambas especies se expresan las dos isoformas generadas por ROR $\gamma$  (125, 129, 130). Cada una de ellas, se expresan de manera específica y están implicadas en el control de distintos procesos. ROR $\alpha$  se expresa en prácticamente todos los tejidos periféricos (131), ROR $\beta$  en cerebro y retina (128), y ROR $\gamma$  en tejido adiposo, músculo esquelético, hígado, riñón y sistema inmune (125, 129, 131).

Además, 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 permanecen 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) (126, 132). 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 ocurre debido a la existencia de una respuesta de ROR (RORE), el cual es una secuencia consenso (AGGTCA) precedida de una secuencia de 6 pares de bases rica en AT (95, 126). 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 (126, 131).

Después de unirse al DNA por medio de su elemento respuesta, ROR media el control de numerosos procesos como el desarrollo embrionario, diferenciación y proliferación celular, los ritmos circadianos, la respuesta del sistema inmune y el metabolismo celular.

Con respecto a la regulación del ritmo circadiano, el papel que establece ROR con Rev-Erb $\alpha$ , también denominado NR1D1 (del inglés nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1), a través de la unión al elemento de respuesta a ROR (RORE) va a ser fundamental (124, 133). En este aspecto, la unión de ROR a RORE genera la expresión de los activadores heterodiméricos BMAL1 (brain and muscle ARNT-Like 1, también llamado ARNTL, del inglés aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like) y CLOCK (del inglés circadian locomotor output cycles kaput). Este último fue primeramente identificado en 1994 por Takahashi y cols (134) y, junto con BMAL1, inducen la expresión de PER (del inglés period), identificado a su vez en 1984 por Rosbash y cols (135), y CRY (del inglés cryptochrome). Los heterodímeros formados por estas dos últimas proteínas interactúan con BMAL1/CLOCK, regulando de forma negativa su actividad transcripcional. Asimismo, BMAL1/CLOCK son capaces de activar a REV-ERB $\alpha$ , frenando, por consiguiente, la transcripción de los genes controlados por ROR (136-138). Posteriormente, se ha visto que

la sirtuina 1 (Sirt1, del inglés silent mating type information regulation 2 homolog 1), una deacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup>, tiene gran importancia en la regulación del ritmo circadiano junto con ROR (139). La actividad deacetilasa de la Sirt1 implica el consumo de NAD<sup>+</sup>, generando la formación de nicotinamida que será reciclada por medio de dos reacciones enzimáticas catalizadas por la 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 mononucleótido de nicotinamida (NMN, del inglés nicotinamide mononucleotide). Además, debido a la interacción de Sirt1 con CLOCK y BMAL1, regula su propia actividad debido a que induce la expresión de NAMPT, lo que implica que dicha enzima esté controlada de manera circadiana (139). Diversos estudios sugieren, igualmente, que la Sirt1 puede degradar a la proteína PER y facilitar así la expresión de BMAL1 y CLOCK, función que extiende la interacción entre Sirt1 y el ritmo circadiano.

Cabe destacar, finalmente, el papel de ROR $\alpha$  en la regulación de la respuesta inmune; en este sentido, Steinhilber y cols (140) 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. Igualmente, Delerive y cols (141) demostraron la función de ROR $\alpha$ 1 como regulador negativo de la respuesta inflamatoria al producir una inhibición de la expresión de mediadores pro-inflamatorios como IL-6, IL-8 y COX-2, todo ello debido a la presencia de elementos de respuesta a ROR $\alpha$  en el promotor del gen *ikb $\alpha$* , lo que interfiere negativamente en las vías de señalización dependientes de NF- $\kappa$ B. Más tarde, se confirmaron estos hechos al observar que los ratones mutantes naturales para ROR $\alpha$

presentaban un mayor grado de reacción inflamatoria inducida por LPS, en cuanto a niveles de neutrófilos y expresión de mediadores pro-inflamatorios, en comparación con los ratones controles, si bien este hecho no estaba relacionado con una represión o falta de inducción de la expresión de IKB $\alpha$  en los ratones mutantes (142). Además, estas propiedades anti-inflamatorias de ROR $\alpha$  pueden indicar otra vía de conexión entre éste y la deacetilasa Sirt1 ya que ésta es capaz de deacetilar residuos de lisina en posición 310 de NF-kB, frenando de esta manera su actividad transcripcional (143).

### **2.2.2. Interacción con proteínas citosólicas.**

La capacidad de unión de la melatonina a proteínas es bien conocida, y hasta un 70% de sus niveles en plasma están unidos a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina (144). A nivel intracelular, este comportamiento se mantiene y la melatonina se une a dos importantes proteínas de este compartimento, calmodulina y calreticulina. La unión de la melatonina a la calmodulina tiene importantes connotaciones funcionales. (97-99). Por un lado, la regulación del citoesqueleto y la inhibición de la actividad de la kinasa II, así como la maduración dendrítica y neurogénesis en el hipocampo del ratón (145, 146). Por otro lado, la unión melatonina-calmodulina inhibe la activación de la nNOS, que es calcio-calmodulina dependiente (99), aunque este efecto también es dependiente de su metabolito N-acetil-5-metoxiquinurenamina (147). Por su parte, la melatonina se une también con alta afinidad a la calreticulina, otra proteína citosólica ligadora de calcio, que se une a los receptores esteroideos en el núcleo para expulsarlos al citosol, regulando así su efecto genómico (100). Por tanto, algunas de las importantes funciones de la melatonina a nivel celular y regulación hormonal no requieren un receptor si no su interacción con estas proteínas, lo que habla aún más de la diversificación de las acciones de la melatonina a lo largo de la filogenia.

### **2.2.3. Función antioxidante**

Tanto la melatonina como algunos de sus metabolitos, AFMK (N1-acetil-5-metoxiquinuramina) y AMK (N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina) pueden depurar directamente ROS/RNS gracias a su capacidad para ceder electrones (148-152). Al ser rica en electrones, la indolamina puede ir cediéndolos al grupo hidroxilo ( $\text{OH}\bullet$ ) de manera sucesiva generando otras moléculas como la 3-hidroximelatonina o el metabolito activo AFMK (149). Tanto la 3-hidroximelatonina cíclica como el AFMK muestran una alta capacidad antioxidante, aumentando por tanto el valor de la melatonina como potente depurador de radicales libres (153, 154).

De la misma manera, la melatonina es capaz de reaccionar no sólo con radicales de oxígeno, sino también con radicales de nitrógeno como los peroxinitritos ( $\text{ONNO}\cdot$ ) (155) o con los radicales peróxido ( $\text{LOO}\cdot$ ), 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 radicales peróxidos.

Además de la capacidad intrínseca de la melatonina de poder depurar radicales libres, estimula la actividad y expresión de otros mecanismos antioxidantes (156). En primer lugar, la melatonina estimula el ciclo del glutatión (GSH), regulando así el balance glutatión oxidado (GSSG)/glutatión (GSH) (157). Por otro parte, la melatonina aumenta la producción de GSH estimulando la  $\gamma$ -glutamylcisteina sintasa, enzima limitante en la ruta de biosíntesis de este compuesto (158), y la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), produciendo el NADPH requerido por la GRd (159). También se ha podido describir el papel de la melatonina sobre otras enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (160, 161).

Bien sea de manera directa y/o indirecta, la melatonina cumple un importante papel antioxidante y mantiene el equilibrio del estado redox celular, fundamentalmente a nivel mitocondrial al ser ésta la principal fábrica de ROS/RNS, protegiendo así el DNA y otras macromoléculas. Además, gracias a las características del grupo N-acetilo de la melatonina, posee sinergismo en el papel antioxidante de otras moléculas naturales tales como las vitaminas C y E (162).

#### **2.2.4. Acción a nivel mitocondrial**

Gracias a sus características (lipo e hidrofílicas), se pensaba que la melatonina podía atravesar membranas biológicas con relativa facilidad; sin embargo, aunque efectivamente puede traspasar dichas membranas, éstas contienen mecanismos muy estrictos de regulación, de manera que permiten la entrada de cantidades relativamente pequeñas de melatonina. Esta melatonina que entra en la célula se suma a la que ésta produce, y alcanza niveles elevados dentro de ella pero saturándose los compartimentos nuclear y mitocondrial a dosis de 40 mg/kg, cuando la melatonina se administra exógenamente (106). La mitocondria es la principal generadora de ROS en las células, por lo que podría parecer razonable que para la protección contra dichos radicales se acumule la melatonina a ese nivel. Sin embargo, además de este papel, se ha podido comprobar que la melatonina interacciona con la cadena de transporte electrónico, aumentando la actividad de los complejos respiratorios, sobre todo en aquellas mitocondrias dañadas (163-165), tanto por el envejecimiento como la sepsis o las patologías neurodegenerativas (166-171), y protege también el ADN mitocondrial (172). Dado el potencial redox de la melatonina (0,94 V) (149), cabría pensar que esta molécula no sólo estimula la actividad de los complejos, sino que también podría ser capaz de donar electrones por si misma aumentando el flujo electrónico.

De la misma manera, la melatonina posee otros efectos sobre la fisiología mitocondrial, entre los que cabe mencionar el incremento de la biogénesis mitocondrial tras su administración crónica y de producción de ATP (173, 174), la estabilización de la membrana mitocondrial interna (175), la prevención de los procesos de apoptosis al modular la homeostasis del calcio y el potencial de membrana mitocondrial (176), así como inhibir el poro de transición mitocondrial (177). Todo ello hace ver el probable efecto terapéutico de la melatonina para todas aquellas patologías en las que la función mitocondrial se vea alterada de manera que se comprometa la supervivencia celular.

### **2.3. Actividad antiinflamatoria: 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 (178, 179), si no 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 (180). 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 (181).

La melatonina posee unas propiedades antiinflamatorias muy potentes, que la convierten en un fármaco de elección ante determinadas patologías inflamatorias, principalmente aquellas que subyacen a la activación de la inmunidad innata como es la sepsis y las enfermedades neurodegenerativas.

La primera evidencia de estas propiedades antiinflamatorias de la melatonina vinieron del estudio de Crespo y cols en 1999 (182). Estos autores demostraron que la administración de melatonina a ratas con sepsis inducida por lipopolisacáridos (LPS) bacterianos disminuye la expresión de la iNOS de una forma dosis-dependiente, recuperando al animal del fallo multiorgánico. Además, la melatonina protegió totalmente los principales órganos incluyendo hígado, riñón y corazón del fallo séptico. Poco después, y para caracterizar mejor el efecto de la melatonina, Escames y cols observaron en 2003 (166) que la principal toxicidad de la sepsis proviene de la inducción de una óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) mitocondrial, que era responsable de los elevados niveles de óxido nítrico a este nivel, causante de la disfunción de la cadena de transporte electrónico, déficit de ATP y aumento el daño oxidativo, dando lugar al fracaso mitocondrial y muerte celular. Posteriormente estos autores demostraron que esa iNOS está codificada por el mismo gen que la iNOS citosólica, lo que implicaba la entrada de la iNOS desde el citosol a la mitocondria durante la sepsis (168, 183). Utilizando este mismo modelo, otros autores demostraron que la melatonina podía prevenir el fallo circulatorio debido al daño endotelial y vascular en ratas sépticas (inducida por LPS) (184, 185). Con todo ello, se ha podido comprobar una disminución significativa de la mortalidad asociada a la sepsis tras la administración terapéutica de melatonina (186) llevando a proponer a la melatonina como medicación de elección en la sepsis (187).

Más adelante se completaron los estudios que demostraban las vías moleculares usadas por la melatonina frente a la sepsis. Por un lado, usando ratones controles y deficientes en  $ROR\alpha$  (el receptor nuclear de melatonina), García y cols (122) demostraron que el efecto de la melatonina se producía por la inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B a través de la activación de la Sirt1, que deacetila NF- $\kappa$ B impidiendo su unión al ADN y, por tanto, bloquea su efecto para inducir la expresión de moléculas proinflamatorias. Pero a su vez, estos autores demostraron que, durante la activación de la respuesta inflamatoria en la sepsis, el estrés oxidativo producido por NF- $\kappa$ B daña la mitocondria, lo que genera la apertura del poro de transición y liberación al citosol de especies reactivas de oxígeno (ROS) y ADNmt, entre otros factores. Esas moléculas inducen al inflamasoma NLRP3, que a su vez activa una procaspasa 1 que actúa sobre las procitoquinas inflamatorias producidas por el NF- $\kappa$ B, como la IL-1 $\beta$ , activándola, lo que ocasiona una respuesta mucho más exagerada de la inmunidad innata. La melatonina también bloquea el inflamasoma NLRP3, al proteger la mitocondria frente al daño oxidativo inducido por la inflamación, cerrando el poro de transición y evitando así la salida de factores inductores del inflamasoma. La melatonina se comporta, por tanto, como el mejor antiinflamatorio frente a la sepsis por esa doble acción frente a la inflamación, que ninguna otra molécula puede ejercer. Pero, además, el efecto de la melatonina sobre la Sirt1 se demostró por los mismos autores que se debe a que la melatonina se une a  $ROR\alpha$ , para inducir su unión al RORE de *bmal1*, lo que proporciona una señal para que se induzca la expresión de NAMPT y síntesis de NAD<sup>+</sup>, el substrato de Sirt1 gracias a lo cual ésta se activa y puede deacetilar NF- $\kappa$ B (122, 188).

Tras la extensiva evidencia obtenida en modelos animales de sepsis, se realizó el primer estudio en humanos con la administración oral de melatonina en niños neonatos con sepsis (189). La melatonina, a dosis de 10 mg/kg separadas por un intervalo de una hora, se



administró por vía oral dentro de las 12 horas posteriores al diagnóstico de la enfermedad. En estos pacientes, se produjo un descenso del estrés oxidativo relacionado con el proceso séptico a través de la estabilización de la respuesta inflamatoria tras la administración de melatonina. 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.

Más recientemente, se realizó otro ensayo clínico con melatonina, esta vez mediante una formulación inyectable administrada endovenosamente a dosis de 60 mg/día/5 días en pacientes sépticos postquirúrgicos (nº EudraCT: 2008-006782-83). Los resultados demostraron la capacidad antiséptica de la melatonina, reduciendo la estancia hospitalaria de los pacientes en un 43%, y reduciendo la mortalidad del 27% en el grupo placebo a 0% en el grupo tratado con melatonina (manuscrito en preparación).

### **3. GENES RELOJ, MELATONINA Y SEPSIS**

#### **3.1 Reloj biológico y genes reloj**

Como sabemos, los ritmos circadianos organizan y coordinan los sistemas fisiológicos con respecto al entorno en ciclos de 24h. Las señales o estímulos del entorno del organismo que ajustan los ritmos endógenos incluyen la luz-oscuridad, la alimentación y el ejercicio físico. Gracias a este sistema circadiano, el organismo posee la capacidad de adaptación y predictibilidad, biológicamente hablando, manteniendo la homeostasis (190-192).

Estos ritmos circadianos están generados por “relojes” presentes en la mayoría de los tejidos y células (193). A nivel molecular, los relojes circadianos están constituidos por los llamados genes reloj, siendo fundamentalmente *bmal1*, *clock*, *cry (1 y 2)*, y *per (1, 2 3)*. Estos genes están implicados en bucles de retroalimentación transcripcional-transduccional

(194). Otros bucles de retroalimentación adicionales añaden mayor complejidad y fuerza al bucle básico. Estos circuitos adicionales están implicados en la transcripción de otros factores tales como los receptores nucleares huérfanos (REV-ERB $\alpha$  o NR1D1, *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1* y  $\beta$ ; ROR $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) (194, 195). Este bucle comienza durante el día cuando dos factores de transcripción, CLOCK y BMAL1 se heterodimerizan, se translocan al núcleo, e inician la transcripción de genes que contiene una secuencia reguladora *cis* E-box (5-CACGTG-3) o E-box (5-CACGTT-3), entre los que se encuentran los genes *per* y *cry*. Estos genes codifican las proteínas PER y CRY que, conforme se van sintetizando, se heterodimerizan y junto con otras proteínas como la casein quinasa CK1 $\epsilon$ , que regula la vida media de PER, se translocan al núcleo donde se acumulan y reprimen la transcripción inhibiendo directamente CLOCK/BMAL1 (195). En consecuencia, el complejo CLOCK/BMAL1 constituye el componente positivo del bucle, mientras que el complejo PER/CRY es el componente negativo. El complejo PER/CRY es degradado a través del proteosoma, lo que libera la inhibición de CLOCK/BMAL1, que puede entonces iniciar un nuevo ciclo de transcripción. Este bucle de retroalimentación constituye el llamado mecanismo central de oscilación del reloj (**Figura 2**). Otros bucles de retroalimentación adicionales añaden mayor complejidad y robustez al bucle básico. Los otros factores (REV-ERB y ROR) se activan por el heterodímero CLOCK/BMAL1. ROR $\alpha$  a su vez activa BMAL1 y REV-ERB lo inhibe, reforzando el bucle circadiano. Es importante señalar aquí que la melatonina se une a ROR $\alpha$ , lo que permite su efecto regulador sobre el reloj biológico (122). Recientemente se ha descubierto una nueva proteína, CHRONO, que funciona actuando como un componente principal del reloj circadiano y cuya sobreexpresión frena la actividad CLOCK/BMAL1 (196).

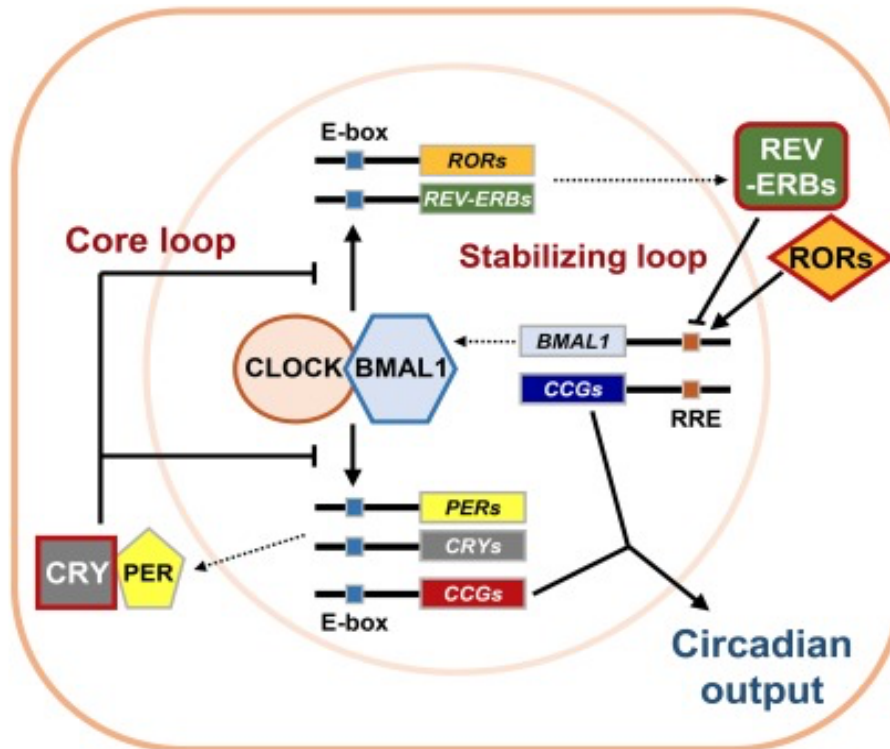


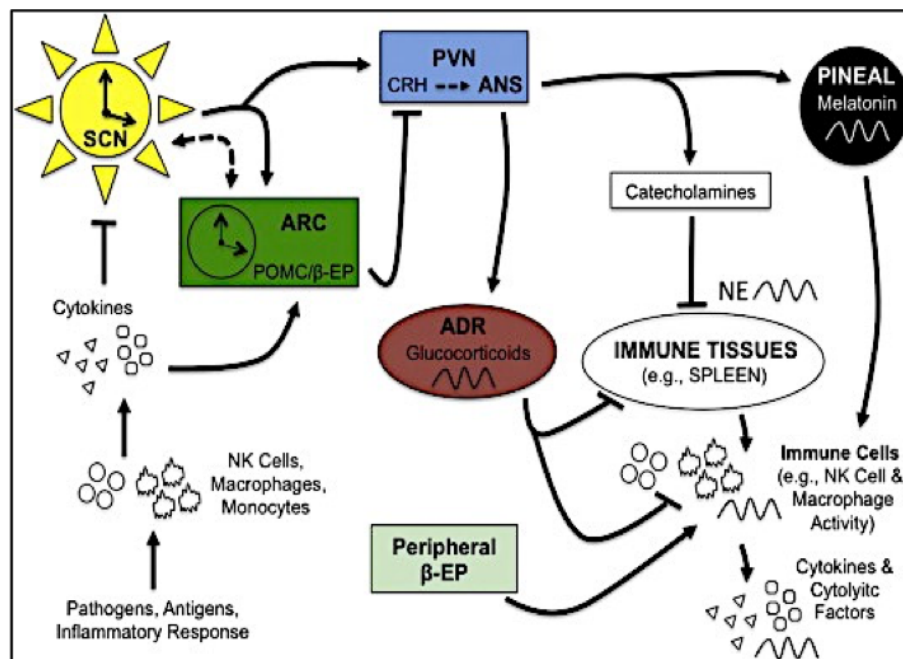
Figura 2. Esquema del funcionamiento del reloj biológico.

En resumen, el reloj molecular está constituido por los genes: *clock*, *bmal1*; los genes que controlan el período del ritmo, *per1*, *per2* y *per3*; los criptocromos *cry1* y *cry2*; y *rors* y *rev-erbas*, que codifican las proteínas correspondientes. Cerrando este bucle, la melatonina actúa como un mecanismo de ajuste genético de todo el reloj.

### 3.2. Genes reloj y sistema inmunitario

Dibner y cols en 2010 describieron el marcapasos central, localizado en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo anterior, que coordina los ritmos de los relojes periféricos a través de una serie de señales neuronales, humorales y conductuales (197). A pesar de la autonomía de dichos relojes, sin los núcleos supraquiasmáticos, los ritmos celulares o tisulares a nivel individual se desorganizarían (198). Muchas de las señales que

comunican el reloj central con los relojes periféricos, están mediadas por el sistema inmunitario (glucocorticoides y citoquinas). Esto sugiere que las respuestas inmunitarias interfieren con la regulación circadiana del reloj. Al mismo tiempo, la ritmicidad de los mediadores del sistema inmune es propensa a influir en la misma respuesta del sistema inmunitario (199) (**Figura 3**).



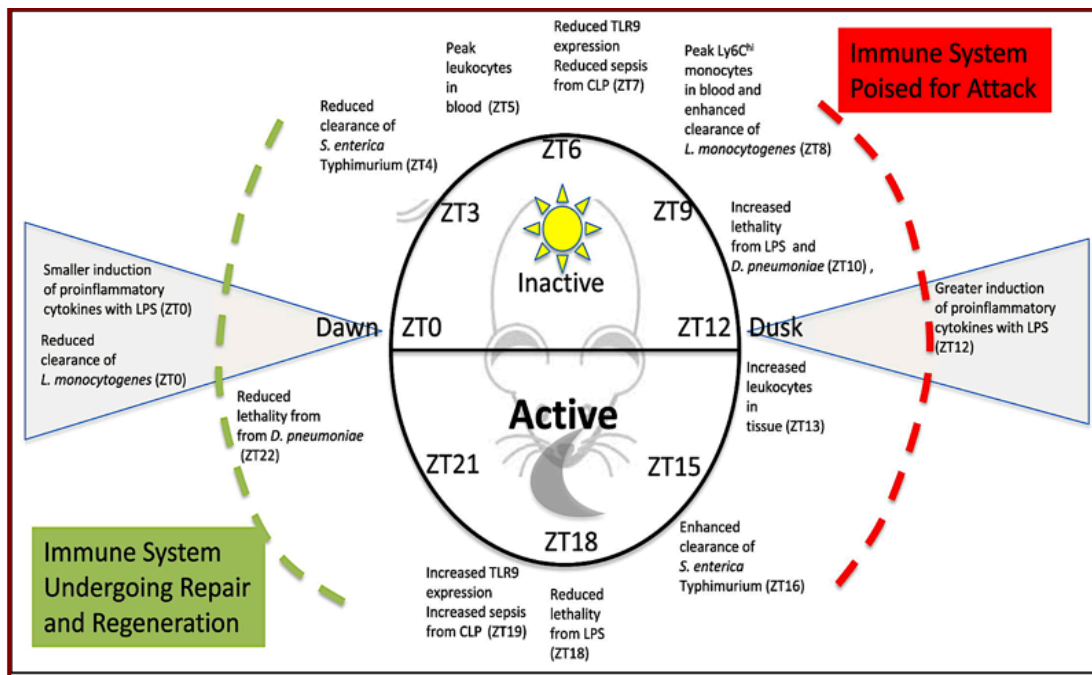
**Figura 3.** Interacción entre el reloj central y la respuesta del sistema inmunitario.

Así, el reloj, por medio de señales que envía a los núcleos paraventriculares (PVN) y arcuato (ARC) del hipotálamo, controla la inervación simpática del bazo modulando la actividad rítmica de las células NK (Natural Killer) y reclutamiento de neutrófilos en el músculo esquelético. Además, controla la síntesis rítmica de ACTH/cortisol, que a su vez regula la producción de citoquinas. Por otro lado, a través de la conexión entre PVN y pineal, el reloj central regula la producción de melatonina, que colabora en el control rítmico del

sistema inmunitario (200, 201). En resumen, las proteínas CLOCK, BMAL1, ROR $\alpha$ , y REV-ERB $\alpha$  controlan aspectos fundamentales de la respuesta inmune.

En cuanto al estado del sistema inmunitario, se puede encontrar de dos maneras:

1. Estado de anticipación y aumento de la actividad inmune (línea roja de la **Figura 4**).
2. Un período opuesto donde tienen lugar los procesos de reparación y regeneración de dicho sistema inmunitario (línea verde) (**Figura 4**).



**Figura 4.** Ritmo circadiano del sistema inmunitario

En el período de transición hacia la fase activa en el ratón (hacia la noche), el sistema inmunitario está listo para anticiparse al elevado riesgo de infección, pero con ello se produce un alto riesgo de sepsis. Ello se debe a que BMAL1, que es el mediador central del control circadiano de la inmunidad innata, promueve un estado antiinflamatorio. El mecanismo de esta acción se debe a que BMAL1 inhibe la expresión de la quimiocina CCL2, lo que a su vez reduce el número de monocitos inflamatorios en los tejidos inflamados.

BMAL1 a su vez recluta CLOCK y previene que éste acetile y active p65, lo cual, a su vez, reduce la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B, uno de los principales responsables de la activación de la inmunidad innata, llevando a una disminución de iNOS, COX-2, citoquinas proinflamatorias y otros mediadores de la inflamación. Además, BMAL1 aumenta la expresión de ROR $\alpha$ , que puede inhibir aún más NF- $\kappa$ B a través del aumento de su inhibidor I $\kappa$ B y la desacetilación de p65 mediada por la unión de melatonina a ROR (122), explicando también las acciones antiinflamatorias de esta hormona.

En síntesis, BMAL1 funciona como una molécula antiinflamatoria, reprimiendo *ccl2*, principalmente en monocitos. La ausencia de BMAL1 lleva a los macrófagos a producir cantidades elevadas de factores proinflamatorios. A su vez, CLOCK actúa fosforilando y acetilando p65, aumentando la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B y, por tanto, activando la respuesta inflamatoria (202). Probablemente, cuando BMAL1 se une a CLOCK, impide los efectos proinflamatorios de este último. También participan los receptores nucleares ROR $\alpha$  y REV-ERB $\alpha$ , controlando la inmunidad innata (122, 203). Ambos se inducen por BMAL1, y su efecto es opuesto, por cuanto ROR $\alpha$  aumenta a su vez BMAL1, que es antiinflamatorio, mientras que REV-ERB $\alpha$  lo inhibe, favoreciendo la respuesta inflamatoria dependiente de NF- $\kappa$ B. De hecho, en estudios con ratones deficientes en ROR $\alpha$  tienen un estado proinflamatorio muy elevado, y son más sensibles a la sepsis (122, 204). Las otras dos proteínas del reloj, PER y CRY, también modulan la inflamación. PER controla la producción de INF- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ , y su ausencia condiciona una reducción significativa en la producción de estas citoquinas. De las tres proteínas PER conocidas, parece que PER2 es la más importante para el control de la inmunidad, y parece que estimula la inmunidad en parte reprimiendo BMAL1. A su vez, PER2 puede inhibir REV-ERB $\alpha$ . Por otro lado, la ausencia de CRY1 y CRY2

provoca aumento de IL-6, TNF $\alpha$ , e iNOS, reflejando un estado proinflamatorio, que dependería de la activación de NF- $\kappa$ B (200) (Figura 5).

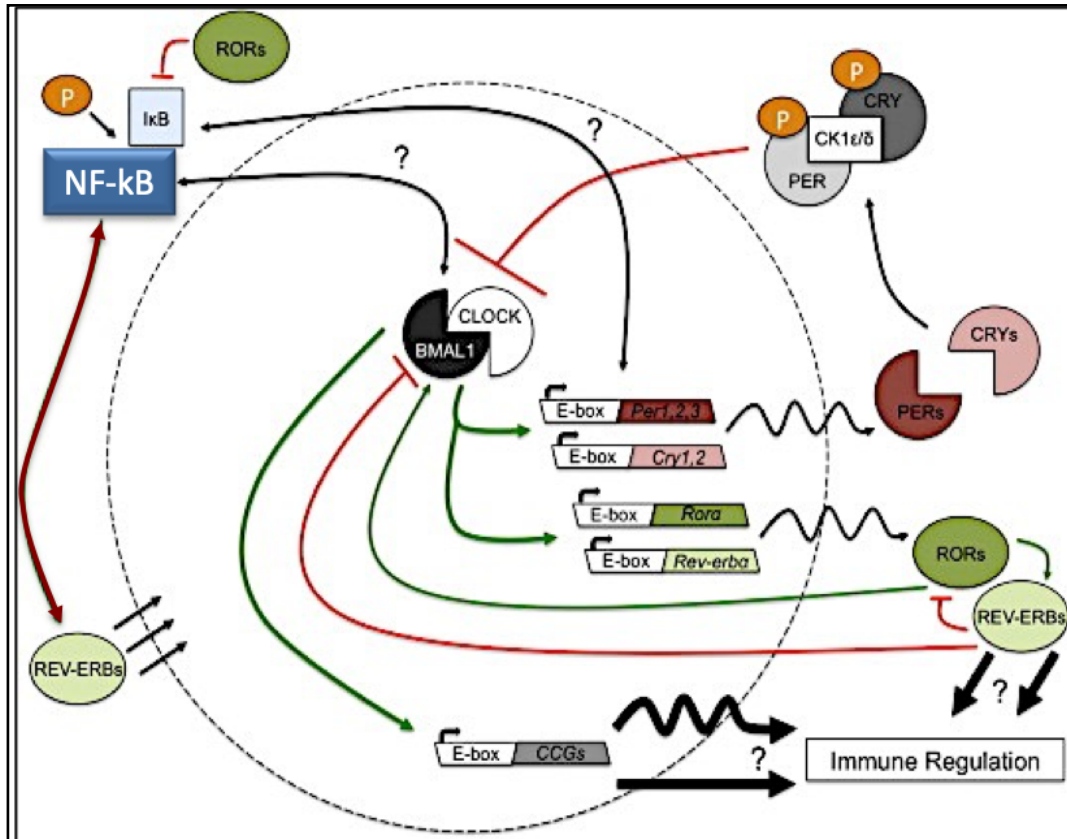


Figura 5. Interacción genes reloj-NF- $\kappa$ B para regular la actividad de la inmunidad innata.

### 3.3. La inflamación a su vez altera el reloj molecular

Si bien el reloj molecular controla la respuesta de la inmunidad innata y la sensibilidad a la sepsis, recíprocamente, la inflamación puede afectar a dicho reloj. En este caso, la alteración de la expresión de los genes reloj por la inflamación afectará a su vez a la expresión de todos los demás genes controlados por ellos, incluyendo genes de control metabólico (205). Estudios en ratones indican que la administración de lipolisacáridos suprime la expresión de los genes reloj (206). El mecanismo de esta supresión no está claro,

aunque tanto TNF- $\alpha$  como IL-1 $\beta$ , así como también NF- $\kappa$ B, que aumentan tras la inflamación, pueden inhibir BMAL1.

El conocimiento e identificación de la función molecular del reloj en inmunomodulación proporciona nuevas perspectivas sobre la patogénesis de enfermedades infecciosas e inflamatorias. Se sabe que los procesos inflamatorios como el asma, artritis reumatoide, y arteriosclerosis, presentan un ritmo circadiano, exacerbándose por la noche y hacia la mañana temprano. De hecho, en humanos, las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 presentan un pico en suero a las 3 y 6 am, respectivamente (207). También existen relaciones directas entre cáncer y ritmos circadiano. Es importante indicar también que la recuperación de ratas a las que se les indujo sepsis por punción cecal, se altera drásticamente cuando el ciclo luz:oscuridad normal de 12:12 horas se cambia a condiciones de iluminación constante (o también de oscuridad constante) (208). Además, la secreción rítmica de melatonina se afecta de manera significativa en pacientes sépticos. Esas observaciones señalan la posibilidad de que la recuperación de pacientes con sepsis puede mejorar significativamente reduciendo la luz nocturna y mejorando la calidad del sueño en las UCIs.

### **3.4 Melatonina, genes reloj e inflamación**

Como se ha mencionado antes, la melatonina tiene efectos inmunomoduladores (209, 210), y la literatura muestra tanto el papel antiinflamatorio como proinflamatorio, dependiendo del tipo de célula y las condiciones. La melatonina influye en los ritmos diurnos de la proliferación leucocitaria, producción de citoquinas y la actividad de las células NK (211, 212). En ciertos modelos, se ha visto que contrarresta la inflamación mediante la reducción en la expresión de óxido nítrico sintasa y ciclooxigenasa -1/2, los niveles de



prostaglandinas E<sub>2</sub> y los niveles de citoquinas proinflamatorias (213). Por otro lado, en estudios experimentales en modelos de ratones con artritis, la administración de melatonina conduce a un descenso en los niveles de proteína CRY1 y mRNA *Cry1* y empeoramiento de los síntomas (214). La relación entre genes reloj, melatonina e inflamación se ha ido afianzando experimentalmente hasta la situación actual, en donde ya existe una base científica que implica que esta interconexión tiene una importancia fundamental para los procesos que cursan con activación de la inmunidad innata como es el caso de la sepsis (122, 215).

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 1. HIPÓTESIS

En primer lugar, hay que decir que, como cualquier otra estructura del organismo, el reloj biológico puede fallar por múltiples causas. Entre ellas, las más frecuentes son: a) alteraciones retinianas (ceguera) que afectan a las células ipRGCs; b) mutaciones de uno o más genes reloj; c) mutaciones de AANAT y/o ASMT, enzimas de síntesis de melatonina; d) determinados fármacos que inhiben la síntesis de melatonina, como benzodiazepinas y análogos, beta-bloqueantes, clonidina, dexametasona, antagonistas del calcio, anti-inflamatorios, vitamina B12, etc., y e) procesos que causan estrés oxidativo e inflamatorio.

Unas de las primeras manifestaciones del mal funcionamiento del reloj son los trastornos endocrinos (alteración de la melatonina y el cortisol) y las alteraciones del ciclo sueño/vigilia. Estas alteraciones conllevan insomnio o hipersomnia, además de alteraciones en la calidad de vida y otras disfunciones endógenas. En pacientes críticos estos trastornos son muy frecuentes por varios motivos, que incluyen: a) estancia en las UCIs normalmente con luz encendida las 24 horas; b) medicación que altera la expresión de los genes reloj y/o la producción de melatonina; c) la propia enfermedad del paciente que afecta a su función circadiana. Aunque sabemos de la existencia de las alteraciones del ritmo circadiano de melatonina en estos pacientes, y se han realizado estudios conducentes a administrar melatonina para corregirlos, no se conoce en la actualidad cómo diagnosticar, examinar y tratar a estos pacientes.

El uso de la melatonina para el control de los procesos inflamatorios derivados de la activación de la inmunidad innata en la sepsis ha sido estudiado de manera continuada en los últimos años. En modelos animales de shock séptico y fallo multiorgánico, tanto en ratas inyectadas con lipopolisacáridos bacterianos como en ratones a los que se le practica punción cecal, la administración de melatonina previno el fallo multiorgánico, recuperó a

los animales del estado séptico, y aumentó su supervivencia (165-168). Estos estudios han permitido la autorización de un ensayo clínico en fase II para el uso de la melatonina en pacientes sépticos que ya ha finalizado en el hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

Según lo que hemos visto hasta ahora, la alteración del reloj biológico en pacientes críticos puede tener una causa primaria, ser consecuencia del proceso inflamatorio o ambos. **La principal finalidad de este proyecto es la identificación de la alteración en la expresión de los genes de regulación del reloj biológico que permitirá tener una información de gran importancia para conocer mejor los mecanismos que subyacen al estado séptico y que, probablemente, puedan estar detrás del paso de este estado a el shock séptico y fallo multiorgánico.** Este conocimiento permitirá una mejor aproximación para reparar ese reloj biológico y, secundariamente, reducir el estado inflamatorio.

El estudio de los genes reloj y del funcionamiento del propio reloj no necesita ninguna intervención mayor en el paciente. La identificación de la existencia de un reloj en todas las células el organismo, la identificación de la expresión circadiana de los genes reloj en dichas células y tejidos (42), permite actualmente que **podamos estudiar el funcionamiento molecular del reloj biológico en cualquier célula periférica del cuerpo, incluyendo células blancas sanguíneas o el propio exudado celular de la mucosa oral.**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO PRINCIPAL/GENERAL**

Evaluar la función del reloj molecular en pacientes críticos y su relación con el proceso séptico.

### **2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS/ESPECÍFICOS**

2.2.1. Evaluar la expresión de los genes en pacientes críticos y controles sanos.

2.2.2. Evaluar la expresión de los genes relacionados con la activación de la inmunidad innata en los mismos grupos de sujetos.

2.2.3. Determinar los niveles de melatonina y 6-sulfatoximelatonina en orina de los pacientes y controles.

2.2.4. Determinar marcadores bioquímicos de inflamación en plasma

2.2.5. Establecer una relación entre la expresión de los genes reloj e inmunidad innata, melatonina y su metabolito.

2.2.6. Correlacionar los datos anteriores con los marcadores plasmáticos y clínicos y su relación con el pronóstico y evolución del paciente crítico.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**





## 1. SUJETOS DE ESTUDIO

El estudio se ha llevado a cabo en un total de 56 sujetos, clasificados como:

**1) Voluntarios sanos (VS)**, n = 12 (7 hombres y 5 mujeres, 25 a 68 años de edad)

**2) Pacientes controles no sépticos (PC)**, n = 24 (16 hombres y 8 mujeres, 30 a 75 años de edad).

**3) Pacientes sépticos (PS)**, n = 20 (13 hombres y 7 mujeres, 40-81 años de edad). Estos pacientes se estudiaron en la fase aguda de sepsis (PS.A), diagnosticada de acuerdo a los criterios de Surviving Sepsis Campaign de 2012, así como a los niveles de procalcitonina, y en la fase de recuperación de la sepsis (PS.R), considerada cuando los pacientes tienen unos niveles de procalcitonina menores de 0,5-1 ng/mL, además de la mejoría del resto de aspectos clínico/analíticos. El intervalo promedio entre PS.A y PS.R fue de entre 3 y 7 días. En todos los casos se enviaron muestras de líquido peritoneal y sangre al Laboratorio del Hospital para análisis microbiano, aunque el tratamiento de la sepsis empezó en el momento del diagnóstico según los criterios comentados, usándose antibióticos en este momento. Una vez que se recibe el microbiograma, la terapia antibiótica se modifica de acuerdo al mismo, si fuera necesario.

El grupo de pacientes controles (PC) consistió en pacientes no sépticos que fueron sometidos a cirugía y hospitalizados en la misma UCI y en las mismas condiciones que los pacientes sépticos. Se siguieron los mismos criterios de inclusión y exclusión que para los pacientes sépticos, excepto por la ausencia de sepsis en los primeros.

Los criterios de inclusión de los pacientes sépticos fueron los siguientes: pacientes de ambos sexos de edad entre 18-85 años, clasificados para una operación programada o sometidos a una laparotomía urgente debido a enfermedad abdominal (peritonitis en todos

los casos). Todos los pacientes o sus familiares firmaron el consentimiento informado para su participación en el estudio.

Los criterios de exclusión incluyen a pacientes por debajo de 18 años o por encima de 85 años de edad; pacientes que no firmaron el consentimiento informado, y pacientes que previamente habían sido operados de procesos neurales centrales. Entre los criterios previstos para la retirada de sujetos el estudio se incluyó el fallecimiento en las primeras 48 horas de iniciado el mismo.

El estudio se aprobó por el Comité de Ensayos Clínicos del Hospital Universitario de las Islas Canarias (referencia nº: 2015\_25), y se realizó de acuerdo con la declaración de Helsinki de 1975 revisada en 2013 (216).

Para el registro de la evolución clínica de los pacientes se anotaron los siguientes datos clínicos:

- 1) Sospecha de diagnóstico preoperatorio.
- 2) Fecha, hora, y técnica quirúrgica usada (laparotomía).
- 3) Fiebre, presión arterial sistólica y diastólica, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, y niveles de noradrenalina.
- 3) Diagnóstico postquirúrgico.
- 4) Criterios clínicos de sepsis.

Para evaluar el grado de severidad clínica de los pacientes, se usaron los índices siguientes:

1) SAPS III, simplified acute physiological score, o puntuación fisiológica aguda simplificada, es un sistema para predecir la mortalidad en la UCI. (<http://www.somiama.org/SAPS3SOMIAMA/>).

2) SOFA, sepsis-related organ failure assessment, o evaluación del fallo orgánico dependiente de la sepsis, valora el grado de disfunción orgánica.

3)  $PAO_2/FiO_2$ , o índice de Kirby, que es el cociente entre la presión parcial de oxígeno ( $PaO_2$ ) y la fracción de oxígeno inspirada ( $FiO_2$ ).

Índice	Grado de disfunción orgánica				
	0	1	2	3	4
Respiratorio ( $PO_2/FiO_2$ )	> 400	≤ 400	≤ 300	≤ 200	≤ 100
Renal (Creatinina/Diuresis)	< 1,2	1,2-1,9	2-3,4	3,5-4,9 < 500 ml/día	≥5 < 200 ml/día
Hepático (Bilirrubina)	< 1,2	1,2-1,9	2-5,9	6-11,9	≥12
Cardiovascular (PAM o Fármacos)	No hipotensión	PAM < 70	DA < 5 o Dobutamina	Dopa > 5 ó NA ≤ 0,1	Dopa > 15 ó NA > 0.1
Hematológico (Plaquetas)	> 150.000	≤ 150.000	≤ 100.000	≤ 50.000	≤ 20.000
Neurológico (GCS)	15	13-14	10-12	6-9	< 6
<p>Respiratorio: <math>PO_2/FiO_2</math> en mmHg. Puntos 3-4 solo se valoran si precisa ventilación mecánica.            Renal: Creatinina en mg/dl. Puntos 3-4 en caso de fracaso renal funcional u oligoanuria.            Hepático: Bilirrubina en mg/dl.            Cardiovascular: PAM (presión arterial media) en mmHg. Fármacos vasoactivos administrados durante más de 1 hora. (DA = dopamina, NA = noradrenalina o adrenalina (dosis en mcg/kg/min)).            Neurológico: GCS = Glasgow Coma Score.</p>					

4) SvcO<sub>2</sub>, o saturación venosa central de oxígeno.

SvcO <sub>2</sub> > 70%	Extracción normal, disponibilidad O <sub>2</sub> > demanda O <sub>2</sub> .
SvcO <sub>2</sub> 70 – 50%	Extracción compensatoria. Incremento demanda de O <sub>2</sub> Descenso de disponibilidad de O <sub>2</sub> .
SvcO <sub>2</sub> 30 – 50%	Extracción máxima Inicio de acidosis láctica. Disponibilidad O <sub>2</sub> < demanda O <sub>2</sub>
SvcO <sub>2</sub> 30 – 25%	Acidosis láctica.
SvcO <sub>2</sub> < 25%	Muerte celular.

5) Escala de Glasgow, que evalúa el grado de consciencia:

Escala de Glasgow		
Variable	Respuesta	Puntuación
Apertura Ocular	Espontánea	4
	Estímulo verbal	3
	Estímulo doloroso	2
	Nula	1
Respuesta Verbal	Orientado	5
	Desorientado	4
	Palabras inapropiadas	3
	Sonidos incomprensibles	2
	Nula	1
Respuesta Motora	Obedece órdenes	6
	Localiza el dolor	5
	Retirada al dolor	4
	Movimiento flexor	3
	Movimiento extensor	2
	Nula	1

## 2. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de sangre y orina se recogieron de acuerdo a los siguientes criterios:

**1) Para el estudio de la expresión de los genes reloj**, se tomaron muestras de sangre a los voluntarios sanos, pacientes controles y sépticos (SP.A y SP.R) cada 5 horas a lo largo del día.

La sangre obtenida se colocó en tubos especiales para el análisis de la expresión de dichos genes. Estos tubos se congelaron a -20 °C hasta su análisis.

**2) Para la determinación de citoquinas en plasma**, se tomaron muestras de sangre a las 09:00 horas de un catéter endovenoso en los pacientes controles (PC) y sépticos; en estos últimos tanto en la fase aguda (PS.A) como tras la recuperación (PS.R). En los voluntarios sanos (VS), se tomaron muestras de sangre a las 09:00 horas mediante punción venosa antecubital. En todos los casos, la sangre se colocó en tubos para hemograma y en otros tubos que se centrifugaron a 3.000 g durante 10 minutos, separándose y congelando el plasma a -80 °C en alícuotas hasta los análisis correspondientes.

**3) Para la determinación de los parámetros de estrés oxidativo e inflamatorio**, se usaron alícuotas de las muestras de sangre obtenidas a las 09:00 horas según el apartado anterior. Las determinaciones incluyeron peroxidación de los lípidos de membrana (LPO) y productos de oxidación avanzada de las proteínas (AOPP).

**5) Para el estudio de la excreción urinaria de 6-sulfatoximelatonina (6-SM)**, se recogió la orina entre las 00:00 y las 06:00 horas en todos los casos, tanto sujetos sanos como controles y sépticos, estos últimos en la dos fase del estudio, SP.A y SP.R. Se anotó el volumen total de orina producido, se alicuotó en tubos de 5 mL, que se congelaron a -80 °C hasta la determinación de 6-SM.

**6) Para los análisis bioquímicos y hematológicos de rutina**, se usaron alícuotas de las muestras de sangre obtenidas a las 09:00 horas en cada grupo. Las determinaciones hematológicas incluyeron: hemoglobina, hematocrito, leucocitos, y neutrófilos. Las determinaciones bioquímicas incluyeron: glucosa, urea, creatinina, sodio, potasio, calcio, bilirrubina total, GOT/AST, GPT/ALT, lactato, protrombina, fibrinógeno, y procalcitonina.

### **3. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES RELOJ**

La variación diaria de la expresión de los genes reloj se realizó en muestras de sangre total de los sujetos de estudio. Como no se pudieron tomar las 4 muestras de sangre en todos ellos, el estudio se realizó en 12 sujetos sanos, 15 pacientes controles no sépticos, y 15 pacientes sépticos. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena antecubital de los sujetos sanos y del catéter endovenoso que los pacientes tenían implantado. Se tomaron muestras cada 5 horas, a las 08:00, 13:00, 18:00, y 23:00 horas, mediante el uso de tubos especiales (PAXgene blood RNA tubes), que se llenan automáticamente hasta un volumen de 2,5 mL. Estos tubos forman parte de un sistema completo que incluye también un kit de purificación del ARN (PAXgene blood RNA system, Qiagen Iberia SL, Madrid, España), para la obtención, almacenamiento y transporte de la sangre con un estabilizador para el ARN. Una vez la sangre en los tubos, éstos se invierten 8-10 veces y se almacena a temperatura ambiente (18-25 °C) por un mínimo de 2 horas, antes de congelarlos a -20 °C, estable hasta 6 meses hasta la extracción del ARN.

El ARN total de las muestras de sangre se extrajo mediante el kit PAXgene blood RNA kit IVD antes comentado, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello, se descongelan las muestras en frío y se centrifugan a 13.000 g durante 15 minutos en frío. Cada pellet de ácidos nucleicos así obtenido se resuspende e incuba con proteinasa K para digerir las proteínas, se centrifuga de nuevo en las columnas que proporciona el kit de extracción para remover restos celulares, y el sobrenadante se transfiere a tubos de microcentrífuga. Se añade etanol al sobrenadante y se aplica a las columnas también proporcionadas en el kit. Se centrifuga brevemente y el ARN se une a las membranas de sílica de dichas columnas para eliminar contaminantes que se desechan. Se realizan varios lavados para eliminar totalmente dichos contaminantes. Entre el primer y segundo lavado la membrana se trata con ADNasa

para eliminar los restos de ADN. Tras el último lavado, el ARN se eluye de la columna con tampón de elución del kit y se desnaturaliza por calor. La cantidad del ARN total obtenido (50 - 80 ng/ $\mu$ L) se calcula por espectrofotometría en un nanodrop mediante el cociente 260/280 nm. La integridad del RNA se determinó por electroforesis en agarosa al 1,5%.

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 400 ng de ARN total por medio de un kit comercial (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen Iberia SL, Madrid), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, las muestras de ARN se incuban en el tampón del kit conteniendo una transcriptasa inversa y la mezcla de cebadores (primers) a 42 °C durante 15 minutos, inactivándose posteriormente la enzima a 95 °C durante 3 minutos. El ADNc obtenido de cada muestra se congela a -80 °C en alícuotas de 25 ng cada una.

La PCR para cada gen (*bmal1*, *clock*, *per2*, y *cry1*) se llevó a cabo por triplicado en el termociclador Stratagene Mx 30005P (Agilent Technologies Spain, Madrid) la PCR, se descongela una alícuota de cada muestra. La PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) se realizó con un kit comercial QuantiNova SYBR Green PCR kit, Qiagen Iberia SL, Madrid) por el método de la curva estándar. La mezcla de PCR contenía 20 ng de ADNc, 200 nmoL de cada cebador, y 10  $\mu$ L de Power SYBR Green PCR Master Mix del kit con la mezcla de nucleótidos (adenina, timina, citosina y guanina) en un volumen total de 20  $\mu$ L. Las secuencias de los cebadores usados para cada gen reloj, así como el gen constitutivo usado de referencia, se indican en la **Tabla 1**.

La secuencia de amplificación de las PCRs fue la siguiente: 2 minutos a 95 °C, segundo por 40 ciclos consistente cada uno en un paso de desnaturalización a 95 °C durante 5 segundos, otro paso de anillado y alargamiento a 60 °C durante 10 segundos, finalizando con las curvas de amplificación. Se usó el *gadh* como control.



Tabla 1. Lista de las secuencias de los cebadores para los genes reloj usados en las PC.		
Gen diana	Cebador sentido	Cebador antisentido
<i>bmal1</i>	ATCCTCAACTACAGCCAGAATG	TCGTGCTCCAGAACATAATCG
<i>clock</i>	ACGACGAGAACTTGGCATTG	TCCGAGAAGAGGCAGAAGG
<i>per2</i>	CCCTTCCGCATGACGCCCTACCTG	GACCGCCCTTTCATCCACATCCTG
<i>cry1</i>	GCTTGCTTCTGACACGAG	GACAGCCACATCCAATTCC
<i>gadph</i>	GTACTACTGAATTCACCCCACTG	TGCGGCATCTTCAAACCTCCAT

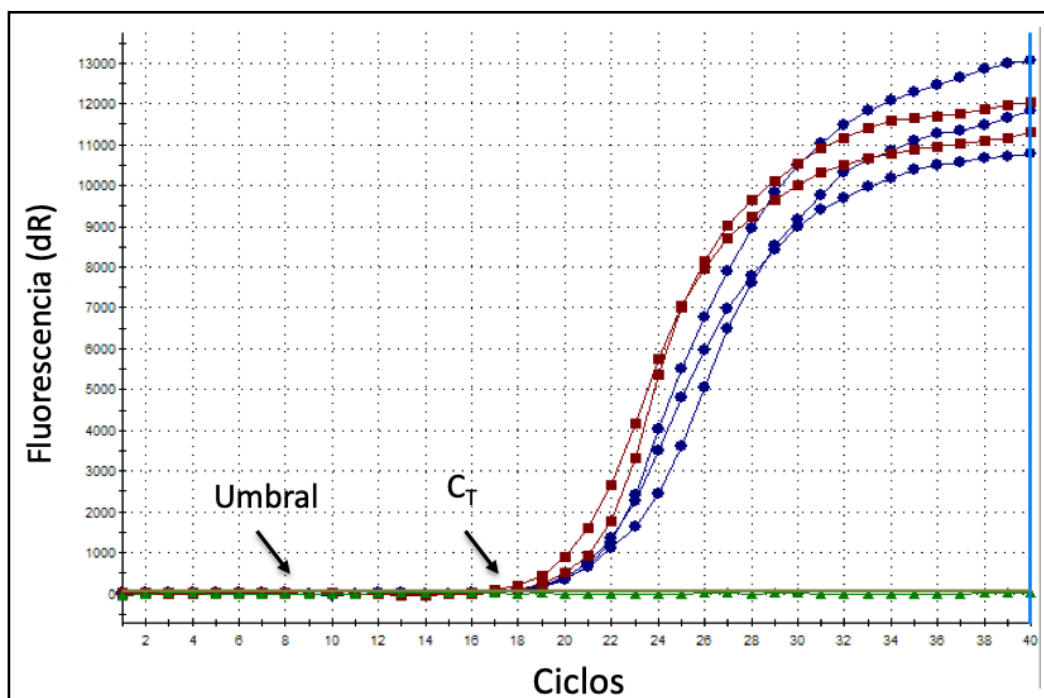


Figura 6. Ejemplo de curvas de amplificación obtenidas por PCR.

Los cambios relativos en la expresión de cada gen se calcularon por el método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  usando el grupo de voluntarios sanos como calibrador. Este método se basa en los valores de  $C_T$  proporcionados por la PCR.

$$\Delta\Delta C_T = (C_T(\text{gen de estudio}) - C_T(\text{gadph}))_{\text{Tiempo } x} - (C_T(\text{gen diana}) - C_T(\text{gadph}))_{\text{Tiempo } 0}$$

donde  $C_T$  (umbral de ciclo) es el número de ciclos donde el producto amplificado se eleva por encima del umbral determinado (**Figura 6**). Para ello se calcula la diferencia entre la  $C_T$  del gen de estudio con la  $C_T$  el gen de referencia.

#### 4. DETERMINACIÓN DE LAS CITOKINAS PLASMÁTICAS

La determinación de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, y TNF $\alpha$  en plasma se llevó a cabo por triplicado mediante un kit comercial (Affimetrix's ProcartaPlex Simplex Kit, refs EPX010-10224-901 for IL-1 $\beta$ ; EPX010-10213-901 for IL-6; EPX010-10204-901 for IL-8; EPX010-10215-901 for IL-10, and EPX010-10223-901 for TNF $\alpha$  (Labclinics, S.A., Barcelona, Spain). Se siguieron las instrucciones del fabricante. Para ello, se añadieron 50  $\mu$ L de la solución de trabajo del kit, que contiene las microesferas marcadas con los anticuerpos específicos para cada citoquina, a cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos, se lavan dos veces con 200  $\mu$ L de tampón de lavado y se secan. A continuación se añaden 25  $\mu$ L de cada alícuota de plasma diluida 1:4 con el diluyente específico del kit en los pocillos correspondientes y se incuba la placa a temperatura ambiente durante 60 minutos. Tras lavar dos veces los pocillos con 200  $\mu$ L de tampón de lavado, las microesferas se incubaron con 25  $\mu$ L de la mezcla de anticuerpos específicos para cada citoquina durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras otros dos lavados con 200  $\mu$ L de tampón de lavado, las microesferas se incubaron con 25  $\mu$ L de solución de estreptavidina-ficoeritrina durante 30 minutos a temperatura ambiente, lavándose otras dos veces de nuevo. Las microesferas se resuspendieron con 100  $\mu$ L de tampón y la concentración de cada citoquina se determinó usando un lector de microarray (Multiplex). Se hizo una curva estándar en paralelo para cada citoquina, cuya concentración se expresó en ng/L.

## 5. MEDIDA DE LA OXIDACIÓN DE LÍPIDOS EN PLASMA

La determinación del daño oxidativo a lípidos se llevó a cabo por duplicado midiendo los niveles de malondialdehido (MDA) y 4-hidroxi-alquenos (4HDA), que son dos productos derivados de la oxidación de los lípidos de membrana (217). Para ello se usó un kit comercial (Bioxytech LPO-568 assay kit; OxisResearch, Portland, OR, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La técnica se basa en que el reactivo cromógeno (N-metil-2-fenilindol) reacciona con MDA y 4-HDA a 45 °C formando un cromóforo estable con máximo de absorbancia a 586 nm. Para la determinación simultánea de los dos biomarcadores (MDA y 4-HDA), se agrega ácido metansulfónico como un solvente ácido.

Las muestras de plasma se descongelan y centrifugan a 3.000 g durante 5 minutos, y los sobrenadantes se usan para las determinaciones. Se añaden 200 µL de cada muestra a 650 µL de la solución de trabajo del kit en los correspondientes tubos, agitándose. A continuación se añaden 150 µL de ácido metansulfónico a cada tubo y se agitan de nuevo. Se tapan los tubos y se incuban en baño de María a 45 °C durante 40 minutos, pasándolos a continuación en hielo para parar la reacción. Se centrifugan los tubos a 3.500 g durante 10 minutos en frío. A continuación, se pasan 200 µL de cada muestra a una placa de 96 pocillos y se lee la absorbancia a 586 nm en un espectrofotómetro de placas (Power Wave X, Bio-Tek Instruments, Inc, Madrid, España). En paralelo se prepara una curva estándar, que permite el cálculo de las concentraciones de MDA y 4HDA, expresada en nmoL/mL de plasma según la fórmula (**Figura 7**).

En dicha curva se representa la absorbancia neta (muestra menos blanco) frente a la concentración:

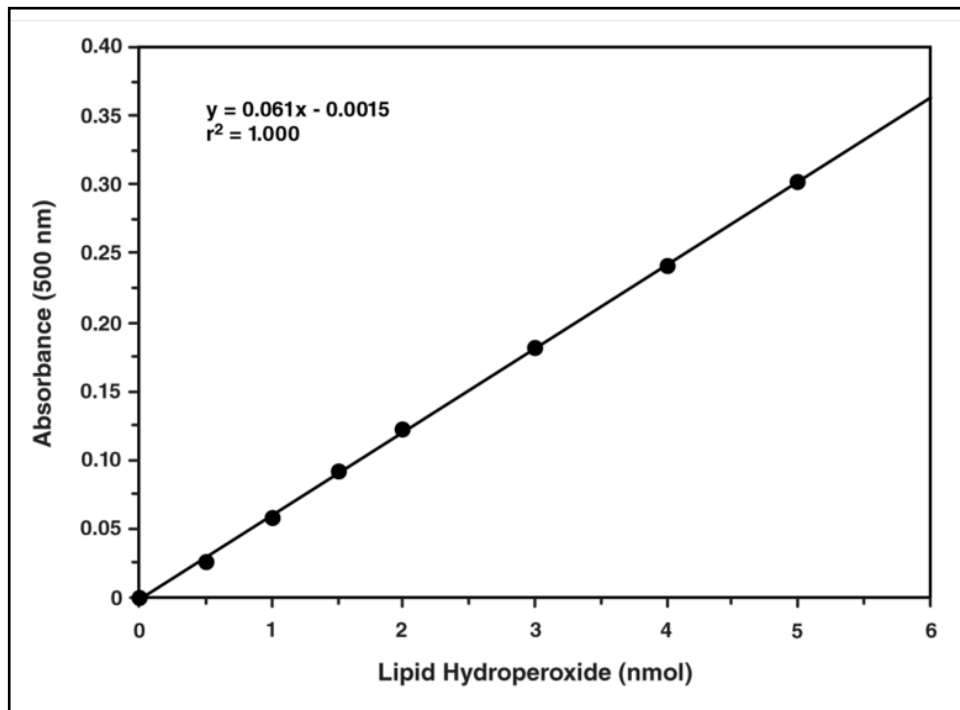
$$[\text{MDA}+4\text{HDA}] = (A_{586} \times a + b) \times fd, \text{ donde}$$

$A_{586}$  es la absorbancia de la muestra a 586 nm

a = pendiente de la recta

b = valor de X en el origen

fd = factor de dilución de la muestra



**Figura 7.** Curva estándar para la determinación de LPO.

## 5. MEDIDA DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN PLASMA

La exposición a los radicales libres de oxígeno y/o de nitrógeno da lugar a la oxidación de las proteínas. Uno de los aminoácidos que sufre los procesos oxidativos es la tirosina, formando la ditirosina, que a su vez altera la estructura terciaria de las proteínas, produciendo entrecruzamientos y agregación de las proteínas, su fragmentación y daño proteico generalizado. Los productos de oxidación avanzada de las proteínas (AOPP), que reflejan el nivel del estrés oxidativo *in vivo*, contienen ditirosinas, puentes disulfuro y grupos carbonilo. Hay dos formas de AOPP en plasma: de alto peso molecular (HMW-AOPP, 670kD) y de bajo

peso molecular (LMW-AOPP, 70 kD aproximadamente). HMW-AOPP contiene agregados de albúmina, y LMW-AOPP contiene albúmina en su forma monomérica y otros productos de oxidación proteica en el plasma. AOPP también refleja la activación inflamatoria, ya que puede activar monocitos así como la síntesis y liberación de citocinas y otras moléculas de adhesión (218).

En consecuencia, los niveles de ditirosina se pueden considerar como el índice de formación de agregados proteicos debido a su oxidación (219) y puede usarse como marcador del daño oxidativo/nitrosativo de las proteínas endógenas. Los niveles de AOPP se pueden medir en plasma, y sus niveles se elevan como consecuencia, además de estrés oxidativo, de la edad, en enfermedades cardiovasculares, daño renal agudo y crónico, embarazo, obesidad, leucemia, diabetes mellitus, etc., entre otras condiciones patológicas y fisiológicas (220).

El método para determinar los niveles de AOPP se basa en la determinación de ditirosina, marcador específico de oxidación de las proteínas. En presencia de yoduro potásico y ácido acético, la ditirosina forma un componente que absorbe la luz a 340 nm. Esta absorbancia se mide frente a concentraciones conocidas de cloramina-T que absorbe a 340 nm en las mismas condiciones.

Para la determinación de AOPP seguimos el siguiente protocolo (218): Se descongelan las alícuotas de plasma en baña de hielo y se centrifugan en frío a 600 g durante 10 minutos. El sobrenadante se diluye 1:5 en PBS pH 7.4. En paralelo se prepara la curva estándar de cloramina-T a partir de una solución madre de 10 mM en el rango de concentraciones de 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, y 100  $\mu\text{mol/L}$ . En una placa de 96 pocillos se distribuyen las muestras de acuerdo a la **Tabla 2**.

La absorbancia de los pocillos se mide inmediatamente a 340 nm, mediante un lector de microplacas Power WaveX (Biotek Instruments, Agilent Technologies Spain, Barcelona), y los resultados se expresan en  $\mu\text{mol/L}$  de equivalentes de cloramina-T.

Tabla 2. Distribución de la placa					
Pocillos	Plasma diluido en PBS	Cloramina-T	PBS	KI	Ácido acético
Blanco		0	200 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
S1		200 $\mu\text{L}$ de 3.125 $\mu\text{mol/L}$	0 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
S2		200 $\mu\text{L}$ de 6.25 $\mu\text{mol/L}$	0 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
S3		200 $\mu\text{L}$ de 12.5 $\mu\text{mol/L}$	0 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
S4		200 $\mu\text{L}$ de 25 $\mu\text{mol/L}$	0 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
S5		200 $\mu\text{L}$ de 50 $\mu\text{mol/L}$	0 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
S6		200 $\mu\text{L}$ de 100 $\mu\text{mol/L}$	0 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
Problema	200 $\mu\text{L}$	0	10 $\mu\text{L}$	0	20 $\mu\text{L}$

## 6. DETERMINACIÓN DE LA EXCRECIÓN URINARIA DE LA 6-SULFATOXIMELATONINA (6-SM)

La determinación de 6-sulfatoximelatonina (6-SM) en orina se realizó mediante un kit comercial de ELISA (RE54031, IBL Int., Hamburgo, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El método se basa en un principio de competencia. La cantidad desconocida del antígeno (6-SM) presente en la muestra de orina, y una cantidad conocida fija de 6-SM ligado a un enzima compiten por los sitios de unión del anticuerpo, que se encuentra pegado a la pared de los pocillos de la placa de ELISA de 96 pocillos, frente a la 6-SM. Tras la incubación, los pocillos se lavan para parar la reacción de competición. Se añade a continuación un substrato para el enzima, y la intensidad de color desarrollada es inversamente proporcional a la cantidad del 6-SM presente en la muestra de orina.

Para el desarrollo de la técnica, se sigue el protocolo que se indica en la **Tabla 3** (los reactivos para el ELISA los proporciona el kit):

<b>Tabla 3. Procedimiento para el ELISA de 6-sulfatoximelatonina</b>	
<b>Pasos</b>	<b>Procedimiento</b>
<b>1</b>	Pipetear 50 µL de cada estándar proporcionado por el kit, controles y muestras diluidas en su caso.
<b>2</b>	Pipetear 50 µL del conjugado de enzima preparado en el momento en cada pocillo.
<b>3</b>	Pipetear 50 µL de la solución de anticuerpo
<b>4</b>	Cubrir la microplaca con un adhesivo e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador orbital a 500 rpm.
<b>5</b>	Quitar el adhesivo, descartar la solución de incubación y lavar los pocillos 4 x 250 µL de tampón de lavado diluido. Descartar el exceso de solución invirtiendo la microplaca con golpes suaves sobre papel de filtro.
<b>6</b>	Pipetear 100 µL de la solución de sustrato en cada pocillo.
<b>7</b>	Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital a 500 rpm.
<b>8</b>	Parar la reacción del sustrato y enzima con la adición de 100 µL de la solución de parada a cada pocillo. Mezclar por agitación.
<b>9</b>	Medir la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro, con 600-650 nm como referencia durante los 60 minutos de añadir la solución de parada.

Una vez obtenidos los datos, se construye la curva estándar graficando las absorbancias frente a sus respectivas concentraciones. El cálculo de las concentraciones de las muestras se realiza interpolando las absorbancias de las mismas en dicha curva. Los valores de 6-SM en orina se expresan en ng/6 horas.

## **7. ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y HEMATOLÓGICO**

Las determinaciones bioquímicas y hematológicas se realizaron en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario de Canarias por los métodos de rutina establecidos. El recuento de leucocitos y polimorfonucleares se utilizaron como indicación de la severidad de la sepsis. Se midieron también el recuento de eritrocitos, el hematocrito, y la hemoglobina.

Las determinaciones bioquímicas incluyeron: glucosa, como marcador del metabolismo de hidratos de carbono y, por tanto, de las alteraciones metabólicas en la sepsis. La función hepática se determinó por la medida de bilirrubina, aspartato aminotransferasa (AST/GOT) como marcador inespecífico del daño al parénquima hepático, y alanina aminotransferasa (ALT/GPT) como marcador específico del daño al parénquima hepático. La función renal se determinó por las concentraciones séricas de creatinina como indicador de la filtración glomerular; urea y ácido úrico como indicadores de la alteración de la función excretora del riñón y/o aumento del catabolismo; sodio, potasio, y calcio para el balance electrolítico. El lactato,  $SvcO_2$  y procalcitonina se midieron como índices de la severidad de la sepsis. La procalcitonina sérica se usa comúnmente para ayudar en el diagnóstico de infección aguda y en la duración de la terapia antimicrobiana. Se utilizan diversos algoritmos basados en los niveles de procalcitonina para controlar la reducción de la terapia antimicrobiana en la infección severa y sepsis. La actividad de protrombina y los niveles de fibrinógeno se usaron como marcadores del estado de la microcirculación, ya que están alterados en la coagulopatía concomitante con la sepsis durante la fase aguda de la misma.

## **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de la varianza de medias no apareadas seguido por el test de Bonferroni. Los cálculos estadísticos y las figuras se realizaron con la ayuda del software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Estados Unidos), y se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ .





## **RESULTADOS**



Los resultados mostrados en este apartado corresponden al trabajo:

Acuña-Fernández C, Marín JS, Díaz-Casado ME, Rusanova I, Darias-Delbey B, Pérez-Guillama L, Florido-Ruiz J, Acuña-Castroviejo D. Daily changes in the expression of clock genes in sepsis and their relation with sepsis outcome and urinary excretion of 6-sulfatoximelatonin. *Shock* 2019; doi: 10.1097/SHK.0000000000001433.1.

Factor de impacto: 3.083

Área: Surgery

Posición/area: 43/203 (D1)

Este trabajo se planteó para dar una respuesta a la situación actual de la relación entre genes reloj e inmunidad. Mientras que el sistema circadiano controla la producción diaria de melatonina y los cambios diarios de la actividad de la inmunidad innata, existen evidencias que apoyan la asociación entre trastornos circadianos con alteración de la respuesta inmune y el ritmo de melatonina en la sepsis. Los resultados del estudio indican que el grado de alteración del ritmo de los genes reloj se correlaciona con la gravedad de la respuesta inmunitaria, de manera que los pacientes sépticos tienen mayor inflamación y cronodisrupción que los pacientes quirúrgicos no sépticos. Además, la excreción urinaria de 6-SM está más elevada en pacientes sépticos que no sépticos, y se correlaciona con el grado de la respuesta inmune y del estrés oxidativo de los pacientes. La 6-SM se correlaciona también con SOFA y la procalcitonina en los pacientes. Los datos demuestran la relación entre alteración el ritmo de los genes reloj, la respuesta inmunitaria, y el estrés oxidativo, con la 6-SM actuando como mecanismo compensador. Es interesante destacar que las condiciones de la UCI no son el principal

disruptor del reloj biológico, ya que se han observado diferencias importantes entre pacientes sépticos y no sépticos que estaban en las mismas condiciones hospitalarias.

## 1. EXPRESIÓN DE LOS GENES RELOJ

Para analizar si la sepsis afecta a los relojes periféricos, se ha analizado la expresión de los genes reloj *bmal1*, *clock*, *per2* y *cry1* en muestras de sangre obtenidas en todos los sujetos (Figura 8) a las 08:00, 13:00, 18:00 y 23:00 horas.

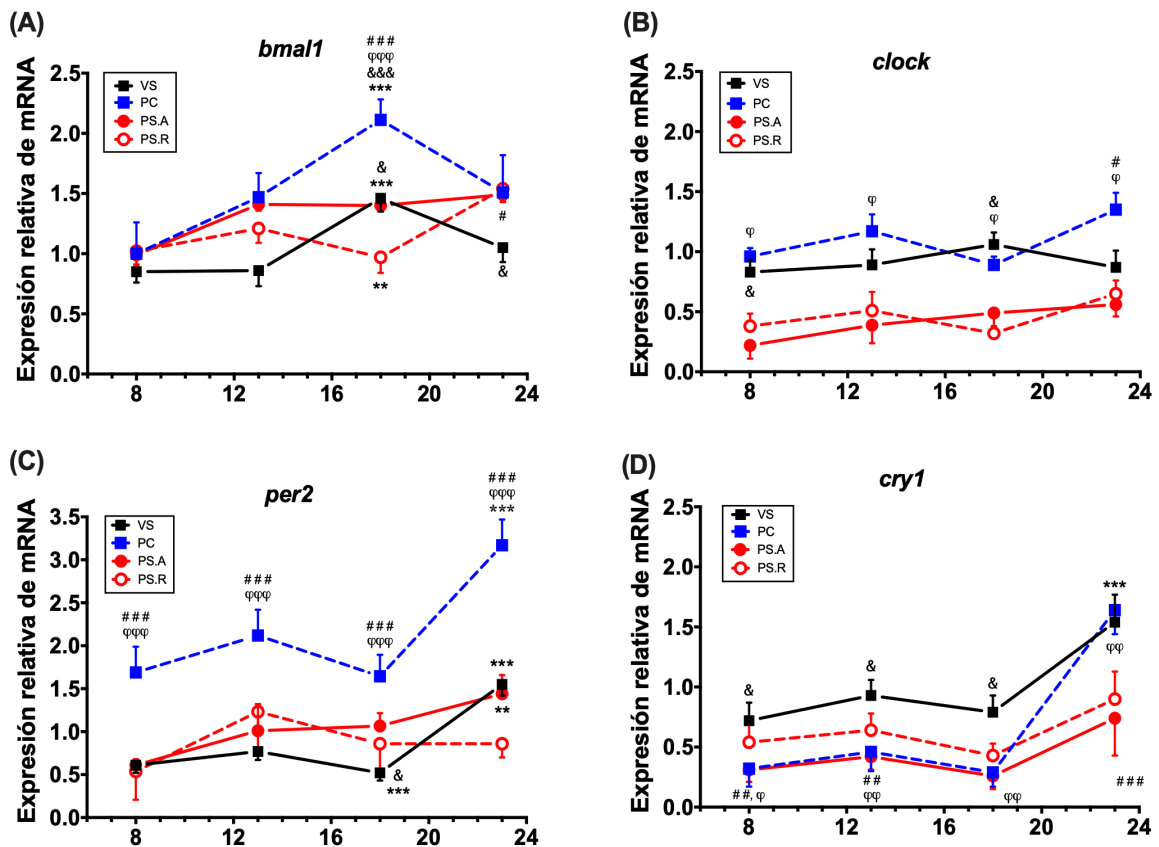


Figura 8. Expresión diurna de los genes reloj. Se analizó la expresión relativa de *bmal1* (A), *clock* (B), *per2* (C) y *cry1* (D) en sangre total de los sujetos del estudio a las 08:00, 13:00, 18:00 y 23:00 horas por qRT-PCR. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar. VS = voluntarios sanos; PC, pacientes controles; SP.A, pacientes sépticos en la fase aguda de la sepsis, y PS.R, pacientes sépticos en la fase de recuperación. \* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$  vs. otros puntos horarios para cada gen; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , y ### $p < 0.001$  vs. VS; & $p < 0.05$  vs. PS.A; &phi; $p < 0.05$ , &phi;phi; $p < 0.001$ , y &phi;phi;phi; $p < 0.001$  vs. PS.R

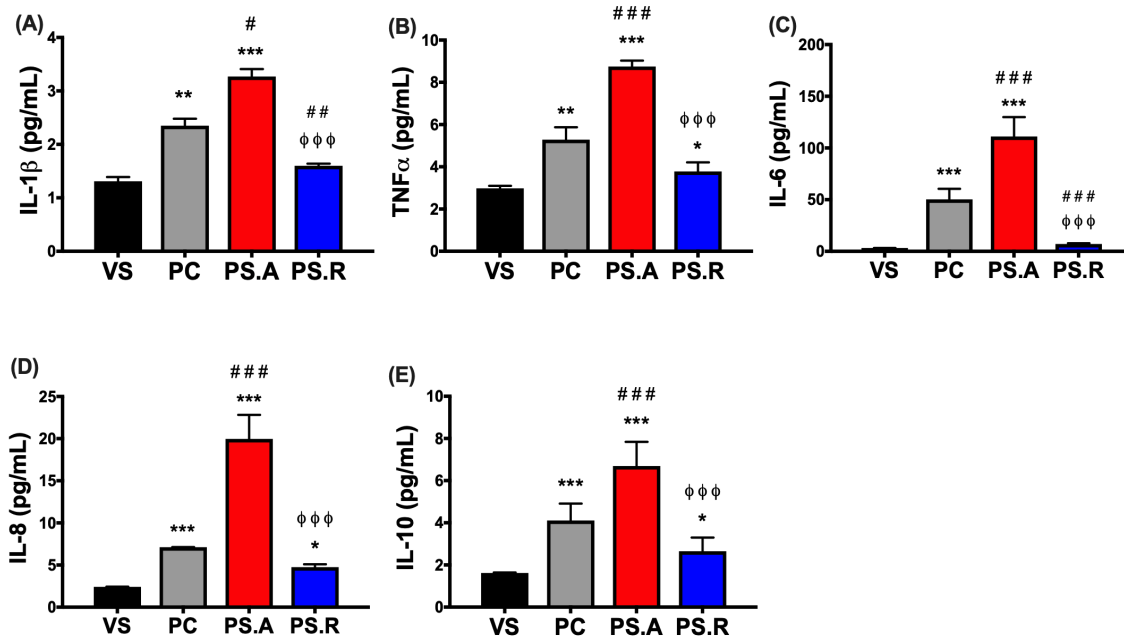
La expresión de *bmal1* muestra una acrofase a las 18:00 horas en voluntarios sanos (VS) y pacientes controles (PC), aunque los niveles de *bmal1* son significativamente más elevados en los pacientes (**Figura 8A**). Este ritmo de *bmal1* se atenúa en la fase aguda de los pacientes sépticos (PS.A), y se mantiene alterado en la fase de recuperación de estos pacientes (PS.R). En cuanto a la expresión de *clock* (**Figura 8B**), no se observó la existencia de ritmo en ningún grupo, aunque los niveles de *clock* fueron más elevados en VS y PC que en sépticos. La expresión de *per2* muestra una acrofase hacia las 23:00 horas en VS y PC, siendo en estos últimos sus niveles significativamente mayores (**Figura 8C**). Los pacientes sépticos, por su parte, muestran pocos cambios diarios en la expresión de *per2*. La expresión de *cry1* muestra una acrofase a las 23:00 en VS y PC, aunque en este caso sus niveles de expresión fueron mayores en los PC (**Figura 8D**). Los pacientes sépticos en su fase aguda (PS.A) y de recuperación (PS.R) muestran cambios paralelos en la expresión de *cry1* a lo largo del tiempo, con una tendencia a aumentar a las 23:00 h.

## 2. NIVELES PLASMÁTICOS DE CITOQUINAS PRO- Y ANTI-INFLAMATORIAS

Con el fin de evaluar la participación de la inmunidad innata en la evolución de los pacientes, se determinó la concentración plasmática de citoquinas pro- y anti-inflamatorias (**Figura 9**).

La IL-1 $\beta$  se eleva en pacientes controles (PC) con respecto a los voluntarios sanos (VS), elevándose todavía más en los pacientes sépticos (SP.A) (**Figura 9A**). Tras la recuperación de la sepsis (SP.R) los niveles de IL-1 $\beta$  se reducen a los niveles basales encontrados en VS. TNF $\alpha$  muestra unos niveles más altos en PC que en VS, mientras que la sepsis induce un aumento mayor en la fase aguda (SP.A), que se reduce tras la

recuperación (PS.R), aunque permanece ligeramente elevada con respecto a los VS (Figura 9B).



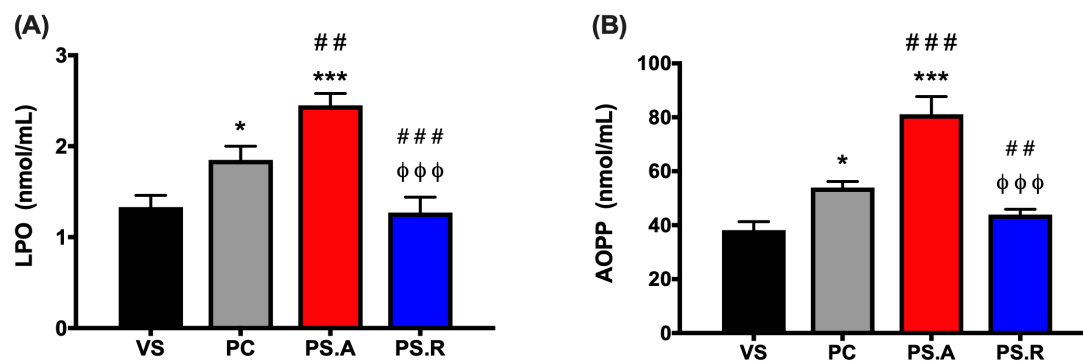
**Figura 9. Cambios en los niveles plasmáticos de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en los grupos estudiados.** Los niveles de citoquinas en plasma se determinaron mediante un sistema multiplex. Se representan los niveles de citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  (A), TNF $\alpha$  (B), IL-6 (C), IL-8 (D), y de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (E). Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar. VS = voluntarios sanos; PC, pacientes controles; SP.A, pacientes sépticos en la fase aguda de la sepsis, y PS.R, pacientes sépticos en la fase de recuperación. \* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$  vs. VS; # $p < 0.05$ , ### $p < 0.01$ , y #### $p < 0.001$  vs. PC;  $\phi\phi\phi p < 0.001$  vs. PS.A

Por su parte, la IL-6 también se encuentra más elevada en PC que en VS, elevándose más todavía en SP.A (Figura 9C); sus valores retornan a niveles basales similares a los del grupo VS tras la recuperación de la sepsis (SP.R). La IL-8 también aumenta en PC con respecto a VS, y siendo este aumento mucho mayor en el grupo de SP.A (Figura 9D); sus niveles se reducen significativamente tras la recuperación de la sepsis (SP.R), aunque permanecen ligeramente elevados por encima del grupo de VS. La

citoquina anti-inflamatoria IL-10 se encuentra elevada en CP con respecto a VS, y más todavía en SP.A (**Figura 9E**), y se reduce en SP.R, pero sin llegar a valores basales. En todos los casos, los niveles de citoquinas fueron mayores en la fase aguda de sepsis (SP.A) que en los otros grupos.

### 3. DAÑO OXIDATIVO A LÍPIDOS Y PROTEÍNAS EN PLASMA

Se ha analizado el grado de estrés oxidativo durante la sepsis mediante la determinación de dos marcadores de daño oxidativo a macromoléculas en plasma, la peroxidación lipídica (LPO), mediante la determinación de MDA y 4-HDA, y los productos de oxidación avanzada a proteínas (AOPP) (**Figura 10**). Mientras que la LPO refleja típicamente el daño oxidativo a los lípidos de membrana y, por tanto, el daño de las membranas celulares, AOPP refleja no solamente el daño oxidativo a proteínas, si no también constituye un nuevo marcador de inflamación y activación de monocitos.



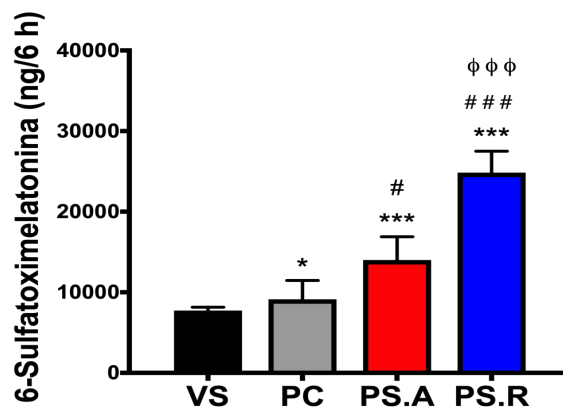
**Figura 10. Niveles plasmáticos de LPO y AOPP en los grupos estudiados.** Los niveles de LPO (A) como índice de peroxidación lipídica, y de AOPP (B) como índice de oxidación de proteínas e inflamación, se determinaron en plasma por espectrofotometría. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar. VS = voluntarios sanos; PC, pacientes controles; SP.A, pacientes sépticos en la fase aguda de la sepsis, y PS.R, pacientes sépticos en la fase de recuperación. \* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$  vs. VS; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , y ### $p < 0.001$  vs. PC;  $\phi\phi\phi p < 0.001$  vs. PS.A



Los resultados muestran que, aunque los niveles de LPO ya están aumentados en pacientes controles (PC) con respecto a los voluntarios sanos (VS), aquellos aumentan todavía más en los pacientes en la fase aguda de sepsis (PS.A), para reducirse a valores basales similares a los del grupo VS tras la recuperación de la sepsis (PS.R) (**Figura 10A**). Se observaron cambios similares en los niveles de AOPP, con un máximo en el grupo PS.A (**Figura 10B**).

#### 4. EXCRECIÓN URINARIA DE 6-SULFATOXIMELATONINA (6-SM)

Para evaluar el comportamiento del sistema circadiano, además de la expresión de los genes reloj se determinó la excreción urinaria de 6-sulfatoximelatonina (6-SM) (**Figura 11**).

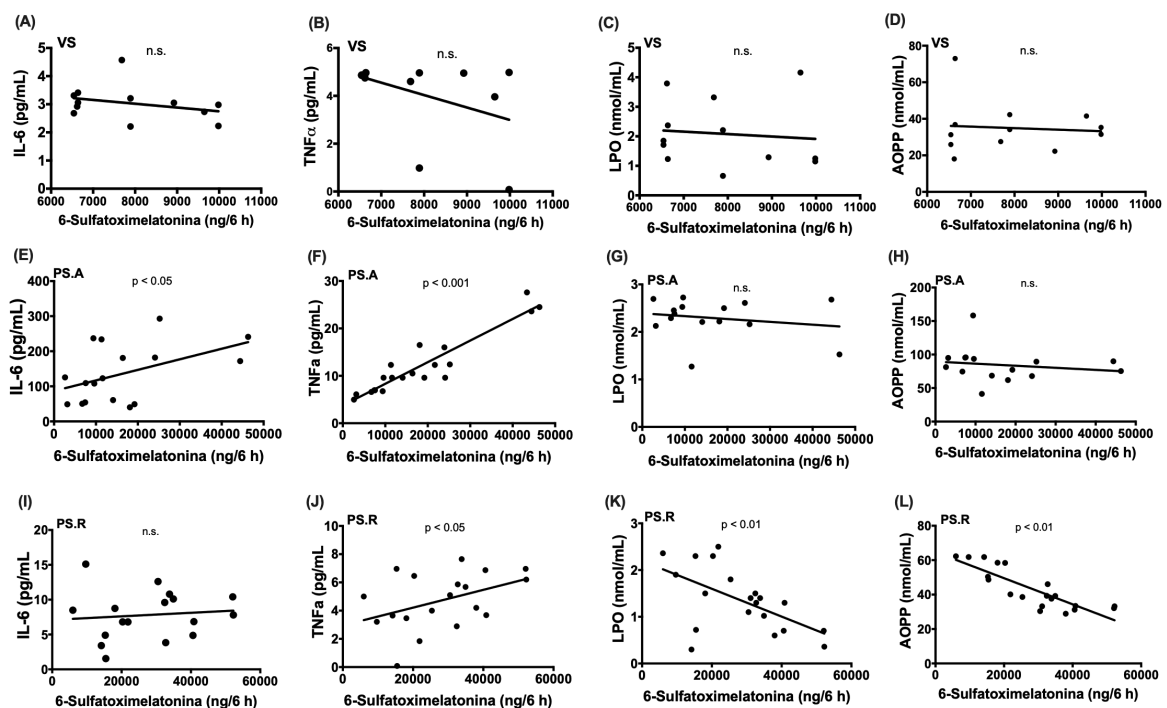


**Figura 11. Excreción urinaria de 6-sulfatoximelatonina en los grupos estudiados.** Para ello, se recogió la orina de 6 horas de todos los sujetos de estudio, entre las 00:00 y las 06:00 horas, y se usó una alícuota para medir los niveles de 6-SM mediante un kit de ELISA. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar. VS = voluntarios sanos; PC, pacientes controles; SP.A, pacientes sépticos en la fase aguda de la sepsis, y PS.R, pacientes sépticos en la fase de recuperación. \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  vs. VS; # $p < 0.05$ , y ### $p < 0.001$  vs. PC; phi phi phi $p < 0.001$  vs. PS.A.

La excreción urinaria de 6-SM se eleva ligeramente, aunque de manera significativa, en pacientes controles (PC) con respecto a los voluntarios sanos (VS). La 6-SM aumenta más en pacientes sépticos durante la fase aguda de sepsis (PS.A), para alcanzar los máximos niveles en la fase de recuperación de la sepsis (PS.R).

## 5. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE 6-SM y MARCADORES DE INFLAMACIÓN

Para valorar la relación existente entre melatonina y el grado de inflamación en la sepsis, se realizó un análisis de correlación y regresión entre la excreción urinaria de 6-SM y los niveles de marcadores de inflamación (**Figura 12**).



**Figura 12. Correlación entre la excreción urinaria de 6-SM y los marcadores de inflamación y estrés oxidativo.** Se realizó un análisis de regresión entre la excreción urinaria de 6-SM y los niveles de IL-6, TNF $\alpha$ , LPO, and AOPP en voluntarios sanos (A-D), pacientes en la fase aguda de sepsis (E-H), y en la fase de recuperación (I-L). VS = voluntarios sanos; PC, pacientes controles; SP.A, pacientes sépticos en la fase aguda de la sepsis, y PS.R, pacientes sépticos en la fase de recuperación.

No se encontró correlación significativa entre los parámetros indicados y los grupos de voluntarios sanos (VS) y pacientes controles (PC). Si se encontró una correlación significativa entre 6-SM, IL-6 y TNF $\alpha$  en la fase aguda de sepsis (PS.A) (**Figura 12E-F**). Los pacientes sépticos una vez recuperados (PS.R) pierden la correlación entre 6-SM e IL-6, y disminuyen la significación de la correlación entre 6-SM y TNF $\alpha$  (**Figura 12I,J**). Tras la recuperación de la sepsis (PS.R), los pacientes mostraron una correlación negativa entre 6-SM, LPO y AOPP (**Figura 12K,L**), lo que no ocurría durante la fase aguda de la sepsis (**Figura 12G,H**).

## 6. DATOS HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS

Se realizó en todos los sujetos del estudio un análisis de rutina de los principales marcadores hematológicos y bioquímicos que puedan estar relacionados con el curso y evolución de la sepsis (**Tabla 4**).

La hemoglobina y el hematocrito están más bajos en los grupos de pacientes controles (PC) y sépticos (PS) que en los voluntarios sanos (VS). Los leucocitos aumentan en la fase aguda de sepsis (PS.A), mientras que la proporción de células polimorfonucleares (PMN) aumenta en todos los grupos.

La glucosa está más elevada en PC y PS.A que en VS, recuperando sus niveles normales in el grupo PS.R. Urea, creatinina, sodio y potasio no cambian significativamente en ningún grupo, mientras que el calcio disminuye en todos ellos. La bilirrubina total, AST y ALT muestran pocos cambios, y el lactato aumenta en el grupo PS.A, disminuyendo en PS.R. La protrombina disminuye y el fibrinógeno aumenta en los PC y PS comparado con los VS, permaneciendo elevados en los pacientes recuperados de la sepsis (PS.R). Los pacientes sépticos también muestran niveles elevados de procalcitonina, que disminuye una vez recuperados de la sepsis.

Tabla 4. Datos hematológicos y bioquímicos de los grupos estudiados.				
Parámetro	VS	PC	PS.A	PS.R
Hemoglobina, g/dL	15,35 ± 0,56	10,93 ± 0,38***	10,55 ± 0,49***	8,7 ± 7,46***.#
Hematocrito, %	45,0 ± 1,12	30,50 ± 1,48***	31,99 ± 1,43***	29,92 ± 0,72***
Leucocitos, x10 <sup>3</sup> /μL	7,05 ± 1,28	10,49 ± 1,14	15,63 ± 2,52**	11,86 ± 2,13
Neutrófilos, %	55,68 ± 3,25	78,4 ± 2,06***	86,95 ± 1,40***	81,74 ± 1,68***
Glucosa, mg/dL	95,54 ± 6,50	152,05 ± 0,35***	128,09 ± 10,64*	108,85 ± 5,54#
Urea, mg/dL	30,12 ± 3,26	19,91 ± 5,45	20,79 ± 2,76	21,08 ± 4,01
Creatinina, mg/dL	0,93 ± 0,13	0,72 ± 0,12	0,71 ± 0,14	0,58 ± 0,05
Sodio, mEq/L	141,4 ± 0,92	139,7 ± 0,74	139,72 ± 1,07	138,97 ± 1,07
Potasio, mEq/L	4,3 ± 0,08	4,03 ± 0,11	4,14 ± 0,10	3,94 ± 0,08
Calcio, mg/dL	9,7 ± 0,11	7,65 ± 0,10***	7,57 ± 0,16***	7,72 ± 0,10***
Bilirubina total, mg/dL	0,75 ± 0,10	0,73 ± 0,13	0,9 ± 0,14#	0,64 ± 0,11
GOT (AST), UI/L	30,08 ± 3,50	33,06 ± 9,40	33,13 ± 3,88#	30,29 ± 4,57
GPT (ALT), UI/L	26,07 ± 4,23	39,03 ± 5,95	28,84 ± 3,60#	30,12 ± 3,75
Lactato, mg/dL	1,55 ± 0,14	1,31 ± 0,13	2,31 ± 0,38##	0,92 ± 0,12 <sup>⊖</sup>
Protrombina, %	100,0 ± 2,22	76,01 ± 2,87***	74,57 ± 3,06***	82,9 ± 3,21**. <sup>⊖</sup>
Fibrinógeno, mg/dL	275,4 ± 8,51	544,14 ± 36,85***	662,9 ± 46,6***	680,4 ± 52,6***
Procalcitonina, ng/mL	0,26 ± 0,08	0,30 ± 0,19	14,9 ± 2,2***.###	2,6 ± 0,7***. <sup>⊖⊖⊖</sup>

VS, voluntarios sanos; PC, pacientes controles; PS.A, pacientes en la fase aguda de sepsis; PS.R, pacientes en la fase de recuperación de la sepsis; PMN, leucocitos polimorfonucleares; GOT (AST), aspartato aminotransferasa; GPT (ALT), alanina aminotransferasa. \*\**p* < 0.01, y \*\*\**p* < 0.001 vs. VS; #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, y ###*p* < 0.001 vs. PC; <sup>⊖</sup>*p* < 0.05, y <sup>⊖⊖⊖</sup>*p* < 0.001 vs. PS.R.

## 7. PUNTUACIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES

La **Tabla 5** muestra los diferentes marcadores usados para evaluar la severidad de la sepsis.

SAPS, que se define como el índice fisiológico agudo simplificado, y SOFA, que evalúa la disfunción y el fallo orgánico en la sepsis, se eleva en la fase aguda de la sepsis (PS.A) comparado con los voluntarios sanos (VS), disminuyendo tras la recuperación de la sepsis (PS.R). El índice de Glasgow por su parte disminuye en sepsis (PS.A) comparado con los VS, y se normaliza en el grupo PS.R. PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> y SvcO<sub>2</sub> no cambian significativamente. Con respecto a la presión arterial sistólica y diastólica, frecuencia

cardíaca y respiratoria, solo cambian ligeramente. Con respecto a la noradrenalina, se indican las dosis administradas en cada caso. El volumen de orina recoge un máximo de producción en el grupo PS.R.

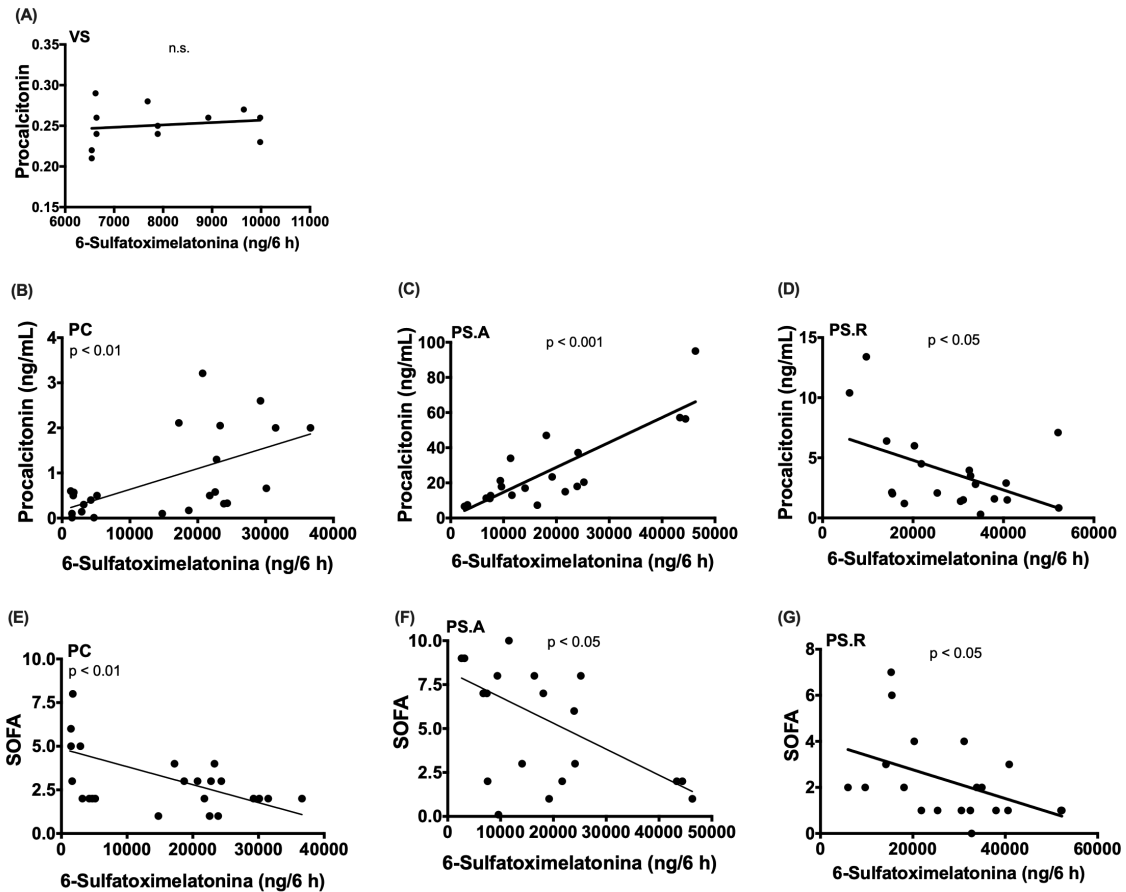
Tabla 5. Datos clínicos de los sujetos de estudio.				
Parámetro	VS	PC	SP.A	SP.R
SAPS	---	58,59 ± 2,48	79,95 ± 8,31 <sup>#</sup>	---
SOFA	---	2,61 ± 0,46	6,10 ± 1,16 <sup>###</sup>	2,25 ± 0,39 <sup>ΦΦ</sup>
Glasgow	15,00	15,00	10,8 ± 1,3 <sup>***,###</sup>	14,91 ± 1,07 <sup>ΦΦΦ</sup>
Fiebre, °C	36,72 ± 0,06	36,06 ± 0,05*	37,06 ± 0,23 <sup>###</sup>	36,39 ± 0,30
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	---	291,06 ± 10,70	293,40 ± 31,89	301,31 ± 11,05
cVSO <sub>2</sub> (%)	---	72,20 ± 7,70	75,89 ± 8,00	71,58 ± 6,93
NA, µg/kg/min	0	0	0,53 ± 0,08 <sup>#</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>ΦΦΦ</sup>
PAS, mm Hg	120,5 ± 5,30	122,75 ± 4,44	103,30 ± 2,79 <sup>*,#</sup>	113,41 ± 6,79 <sup>*,#</sup>
PAD, mm Hg	70,44 ± 3,60	69,70 ± 4,03	58,86 ± 1,88 <sup>#</sup>	67,06 ± 1,41
FC, lpm	72,36 ± 6,50	89,52 ± 6,74	90,83 ± 6,16 <sup>#</sup>	84,20 ± 2,68
FR, rpm	16,5 ± 0,001	13,25 ± 0,36	14,5 ± 1,34	14,20 ± 1,99
Volumen orina, mL/6 h	450,3 ± 60,6	515,96 ± 80,53	534,61 ± 63,98	832,8 ± 58,9 <sup>***,ΦΦ</sup>

VS, voluntarios sanos; PC, pacientes controles; PS.A, pacientes en la fase aguda de sepsis; PS.R, pacientes en la fase de recuperación de la sepsis; SAPS, índice fisiológico agudo simplificado; SOFA, evaluación del fallo orgánico en la sepsis; PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, índice de Kirby; SvcO<sub>2</sub> saturación venosa central de oxígeno; NA, dosis de noradrenalina; PAS presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; FC, frecuencia cardíaca (lpm, latidos por minuto); FR, frecuencia respiratoria (rpm, respiraciones por minuto). \**P* < 0.05, and \*\*\**p* < 0.001 vs. HS; #*P* < 0.05, and ###*P* < 0.001 vs. CP; ΦΦ *P* < 0.01, and ΦΦΦ *P* < 0.001 vs. SP.B.

## 8. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE 6-SM Y MARCADORES DE EVOLUCIÓN CLÍNICA

Para valorar la relación existente entre melatonina y la evolución de la sepsis, se realizó un análisis de correlación y regresión entre la excreción urinaria de 6-sulfatoximelatonina (6-SM) y los diferentes índices que cambian significativamente durante la enfermedad (**Figura 13**). Los voluntarios sanos (VS) no presentaron ninguna correlación significativa entre 6-SM y niveles de procalcitonina (**Figura 13A**). Los niveles de procalcitonina y de 6-SM se correlacionan positivamente en el grupo de pacientes controles (PC) y en los pacientes en la fase aguda de la sepsis (PS.A) (**Figura 13B,C**), e

inversamente en la fase de recuperación de la sepsis (PS.R) (**Figura 13D**). En los grupos PC y PS.R se observa una correlación negativa significativa entre SOFA y 6-SM (**Figura 13E-G**).



**Figura 13. Correlación entre la excreción urinaria de 6-SM y los índices de evolución clínica.** Se realizó un análisis de regresión entre la excreción urinaria de 6-SM y procalcitonina y SOFA en voluntarios sanos (A), pacientes controles (B,E), pacientes en la fase aguda de sepsis (C,F), y en la fase de recuperación de la sepsis (I-L). VS = voluntarios sanos; PC, pacientes controles; SP.A, pacientes sépticos en la fase aguda de la sepsis, y PS.R, pacientes sépticos en la fase de recuperación.



## **DISCUSIÓN**





El principal hallazgo de este estudio es la relación entre las alteraciones de la expresión de los genes reloj y el grado de inflamación, lo que viene determinado porque los pacientes controles (PC) tienen menos inflamación y menos cronodisrupción que los pacientes sépticos (PS). Asimismo, la correlación negativa entre la 6-sulfatoximelatonina (6-SM) y SOFA, el cambio de correlación positiva a negativa entre 6-SM y procalcitonina, y la correlación negativa entre 6-SM, LPO y AOPP en el momento de la recuperación de la sepsis (PS.R), avalan una respuesta compensatoria de la melatonina en contra del proceso séptico. Esta observación está también soportada por la presencia de altos niveles de 6-SM en el grupo de pacientes PS.R. De gran interés es también la observación que, además de la luz y el entorno, otros factores deben afectar a la producción de melatonina ya que tanto los pacientes controles como los sépticos, que estuvieron bajo las mismas condiciones en la misma UCI, presentan diferentes niveles de 6-sulfatoximelatonina.

En este estudio analizamos los cambios diarios en la expresión de los genes reloj *bmal1*, *clock*, *per2* y *cry1*. Aunque algunos autores no encuentran cambios circadianos importantes en los genes reloj en la sangre (221), nuestros resultados muestran cambios diarios en *bmal1* con un máximo de expresión a las 18:00 horas en voluntarios sanos. Dichos resultados también indican que el ritmo de *bmal1* desaparece en los pacientes sépticos y se reduce su expresión en los pacientes controles. Por su parte, la expresión de *clock* no cambia significativamente a lo largo del día, aunque su expresión se reduce en los pacientes sépticos. Por su parte, *per2* y *cry1* muestran un pico de expresión unas horas más tarde que *bmal1* en voluntarios sanos (222, 223). De acuerdo con otros datos recientes, nuestros resultados muestran mayores niveles de expresión de *per2* en pacientes controles que en voluntarios sanos y en sépticos (224); en estos últimos desaparece además su ritmo diurno. Por su parte, la expresión de *cry1* es más alta en voluntarios sanos que en pacientes controles, en los que

se mantiene su ritmo diurno que, sin embargo, desaparece en los pacientes sépticos. Por tanto, la reducción de la expresión de *bmal1* en la sepsis que se observa en nuestros resultados, junto con la reducción de *per2* y *cry1*, puede favorecer la respuesta inflamatoria dependiente de NF- $\kappa$ B durante la sepsis (200, 225, 226). A su vez, esta respuesta inflamatoria aguda pueda dañar al reloj molecular, con el aumento de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  suprimiendo la actividad transcripcional de BMAL1/CLOCK.

Con estos datos, puede proponerse que una infección bacteriana aguda puede actuar primero para reprimir la expresión de los genes reloj, lo que favorece la inflamación sistémica, que a su vez ejerce un efecto negativo sobre el reloj (224, 227). Esta hipótesis está avalada porque los pacientes controles desarrollan un proceso inflamatorio significativamente menor que los sépticos, además que la respuesta inflamatoria en los primeros fue insuficiente para reprimir el reloj molecular. En efecto, los niveles de IL-6, una citoquina relacionada con la fase aguda de inflamación, estimula los linfocitos T y B, y de la IL-8, relacionada con la movilización de neutrófilos, están significativamente más bajos en pacientes controles que en sépticos. Esos datos, junto con el aumento de la expresión de los genes reloj en pacientes controles, puede ser una respuesta compensadora para controlar la inflamación. De esta forma, los pacientes controles pueden mantener el ritmo del reloj circadiano (228). Además, parece ser que la disrupción del reloj molecular inducida por las condiciones ambientales en la UCI no es la causa primaria o principal del proceso de cronodisrupción, ya que los pacientes controles y los sépticos estuvieron bajo las mismas condiciones de iluminación ya que ambos grupos de sujetos estuvieron ingresados en la misma UCI.

Es interesante la observación de que el ritmo de los genes reloj no vuelve a la normalidad en pacientes recuperados de la sepsis, probablemente debido a que la inflamación no está totalmente controlada aún, lo que puede inferirse porque los niveles de IL-8 y TNF $\alpha$

permanecen elevados en esos pacientes (229). La IL-10, que se asocia con funciones anti-inflamatorias al inhibir la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias, está elevado en todos los grupos estudiados en comparación con el grupo de voluntarios sanos, y permanece elevada en los pacientes recuperados de la sepsis, lo que sugiere la persistencia de este mecanismo compensador más allá del final del estado inflamatorio. En conjunto, los cambios en los niveles de citoquinas aquí registrados son compatibles con la inhibición de la cascada de activación de la inmunidad innata dependiente de la NF- $\kappa$ B/inflamasoma NLRP3 en los pacientes recuperados de la sepsis, lo que está también relacionado con el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la inmunidad innata, tanto en condiciones experimentales como clínicas (122, 182, 187-189).

El estrés oxidativo forma parte del proceso inflamatorio y va paralelo al mismo; nuestros resultados demuestran un aumento del mismo desde los pacientes controles a los sépticos en su fase aguda, comparado con los voluntarios sanos, regresando a niveles normales cuando los pacientes se recuperan de la sepsis. Los niveles de LPO reflejan el daño a los lípidos de las membranas celulares (217), mientras que los de AOPP indican daño oxidativo a proteínas plasmáticas (218). Los cambios en LPO y AOPP registrados en este estudio demuestran el aumento del daño tisular durante la sepsis. Además, AOPP también refleja el estado inflamatorio y activación de monocitos en el fallo renal crónico (26 paper); nuestros resultados muestran por primera vez que AOPP también se correlaciona con el curso de la sepsis, lo que lo hace susceptible de ser usado como marcador de pronóstico del proceso séptico.

La relación de la melatonina con la sepsis se conoce desde hace muchos años. Nuestro grupo demostró por primera vez la eficacia de la melatonina frente a la sepsis en 1999 (182). La elevada producción de melatonina aquí registrada es compatible con la pérdida de su ritmo

circadiano ya descrita, probablemente debido a la cronodisrupción observada en pacientes críticos (178, 179). Ya que NF- $\kappa$ B induce la producción de melatonina, es razonable que, durante la sepsis, tanto la pineal como los tejidos extrapineales, principalmente las células inmunocompetentes (107, 230), producen más melatonina como mecanismo de defensa (231-233). Esto explica la correlación positiva entre 6-SM, IL-6 y TNF- $\alpha$  durante la sepsis. Otros investigadores han sugerido que la melatonina nocturna no tiene efecto para mejorar la endotoxemia humana (234, 235), o incluso tiene relación con la mortalidad en pacientes con sepsis severa (234), habiendo sido rebatido esos datos por los autores (236). En contra, los modelos experimentales de endotoxemia avalan la elevada eficacia de la melatonina para bloquear la conexión entre NF- $\kappa$ B/inflamasoma NLRP3, normalizar la función mitocondrial y recuperar a los animales del shock séptico y fallo multiorgánico (122, 167, 168, 171, 188). En conjunto, esos datos avalan la utilidad de la melatonina en pacientes sépticos (189). Por último, la correlación negativa entre 6-SM, LPO y AOPP observada en los pacientes recuperados de la sepsis, demuestra el papel antioxidante de la melatonina, que es capaz de restaurar el equilibrio redox en los pacientes sépticos.

Los datos bioquímicos de este estudio muestran el aumento de la protrombina en los pacientes recuperados de la sepsis, lo que sugiere una mejoría en la coagulación vascular. La procalcitonina aumenta significativamente en la fase aguda de la sepsis, retornando a los niveles basales en los pacientes una vez recuperados de la sepsis. Ambos parámetros se asocian muy bien a la evolución de la sepsis hacia una condición clínica favorable. Los índices SASP III, SOFA,  $PAO_2/FIO_2$ , y Glasgow reflejan la evolución clínica de los pacientes sépticos, y todos ellos reflejan la recuperación del estado séptico de todos los pacientes estudiados, al tiempo que los pacientes controles mostraron cambios mínimos en esos índices. A su vez, estos índices se correlacionan con los niveles de 6-SM. Nuestros resultados muestran una

correlación negativa entre SOFA y 6-SM en los grupos control y séptico. En el caso de la procalcitonina, encontramos una correlación positiva entre sus niveles y los de 6-SM en los grupos control y séptico, que se vuelve negativa cuando los pacientes se recuperan de la sepsis. En conjunto, esos datos sugieren una asociación entre altos niveles de melatonina con una reducida condición crítica en los pacientes.

En resumen, los resultados de este estudio demuestran la existencia de una importante cronodisrupción durante la sepsis, que se acompaña de un aumento significativo de la excreción urinaria de 6-SM. Esos cambios reflejan modificaciones en el funcionamiento normal del reloj biológico, que está afectado probablemente por los mediadores inflamatorios de la sepsis (224). El grado de cronodisrupción, incluyendo *bmal1* y *per2*, se correlaciona con la severidad del proceso inflamatorio. De gran interés es también el hecho de que las condiciones ambientales de la UCI no son sólo las causantes de la cronodisrupción, ya que pacientes controles y sépticos estaban en las mismas condiciones. Los cambios en los niveles de 6-SM y su correlación con los marcadores de inflamación, estrés oxidativo, y evolución clínica, pueden también reflejar el beneficio de la respuesta de la melatonina endógena frente a la sepsis. El presente estudio tiene indudablemente algunas limitaciones, una de las cuales es la falta de análisis de la expresión de los genes reloj durante la noche para analizar alteraciones de fase del ritmo. Ciertos aspectos éticos del hospital donde se llevó a cabo el estudio nos han impuesto esa limitación.



## CONCLUSIONES

*Los días pueden ser iguales para un reloj, pero no para un hombre*

***Marcel Proust***





1ª. Los factores ambientales en la UCI en la que los pacientes estaban ingresados no son la causa principal del proceso de cronodisrupción ya que en ambos grupos (tanto sépticos como controles), permanecieron bajo las mismas condiciones ambientales.

2ª. La alteración de la expresión de los genes reloj, sin embargo, se encuentra directamente relacionada con la gravedad del proceso inflamatorio, siendo la cronodisrupción mayor en los pacientes sépticos en fase aguda y menor en pacientes sépticos recuperados y en pacientes control.

3ª. En consecuencia, se puede establecer que la activación de la inmunidad innata en la sepsis, a través de las citoquinas proinflamatorias, altera la expresión de los genes reloj, principalmente *bmal1*, lo que a su vez activa la inmunidad innata, estableciéndose un circuito de retroalimentación positiva que puede explicar la exagerada respuesta inflamatoria en la sepsis.

4ª. El proceso de cronodisrupción se acompaña de un aumento significativo de la excreción urinaria de 6-SM, siendo este aumento directamente relacionado con la gravedad del proceso inflamatorio. El hecho de que los niveles de 6-SM sigan elevados en pacientes sépticos recuperados habla del mantenimiento de la producción elevada de melatonina en esta etapa de la evolución de la sepsis como respuesta protectora del organismo.

5ª. Los cambios en los niveles de la excreción urinaria de 6-SM se correlacionan con los marcadores de inflamación y estrés oxidativo, reflejando un efecto beneficioso de la respuesta de la melatonina endógena frente a la sepsis.

6ª. El aumento de la protrombina, que sugiere una mejoría en el mecanismo de coagulación en los pacientes recuperados de la sepsis, así como la disminución de la procalcitonina en estos pacientes, se asocian a la evolución favorable de la sepsis así como a la mejoría del estado clínico. El cambio de correlación positiva entre procalcitonina y 6-SM en la fase aguda de la sepsis, a negativa en los pacientes recuperados de ella, probablemente refleja el efecto beneficioso del aumento de melatonina en la evolución del proceso inflamatorio.

## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315(8):762-74.
2. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315(8):775-87.
3. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315(8):801-10.
4. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29(7):1303-10.
5. Dellinger RP. Cardiovascular management of septic shock. *Crit Care Med* 2003;31(3):946-55.
6. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348(16):1546-54.
7. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit Care Med* 2017;45(3):486-552.
8. Murphy DJ, Ogbu OC, Coopersmith CM. ICU director data: using data to assess value, inform local change, and relate to the external world. *Chest* 2015;147(4):1168-78.

9. Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, et al. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Crit Care Med.* 2010;38(2):367-74.
10. Jones SL, Ashton CM, Kiehne L, Gigliotti E, Bell-Gordon C, Disbot M, et al. Reductions in Sepsis Mortality and Costs After Design and Implementation of a Nurse-Based Early Recognition and Response Program. *Jt Comm J Qual Patient Saf.* 2015;41(11):483-91.
11. Damiani E, Donati A, Serafini G, Rinaldi L, Adrario E, Pelaia P, et al. Effect of performance improvement programs on compliance with sepsis bundles and mortality: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *PLoS One* 2015;10(5):e0125827.
12. Levy MM, Rhodes A, Phillips GS, Townsend SR, Schorr CA, Beale R, et al. Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study. *Crit Care Med.* 2015;43(1):3-12.
13. Kanegaye JT, Soliemanzadeh P, Bradley JS. Lumbar puncture in pediatric bacterial meningitis: defining the time interval for recovery of cerebrospinal fluid pathogens after parenteral antibiotic pretreatment. *Pediatrics* 2001;108(5):1169-74.
14. Zadroga R, Williams DN, Gottschall R, Hanson K, Nordberg V, Deike M, et al. Comparison of 2 blood culture media shows significant differences in bacterial recovery for patients on antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* 2013;56(6):790-7.
15. Pollack LA, van Santen KL, Weiner LM, Dudeck MA, Edwards JR, Srinivasan A. Antibiotic Stewardship Programs in U.S. Acute Care Hospitals: Findings from the 2014

National Healthcare Safety Network Annual Hospital Survey. *Clin Infect Dis*. 2016;63(4):443-9.

16. Cardoso T, Carneiro AH, Ribeiro O, Teixeira-Pinto A, Costa-Pereira A. Reducing mortality in severe sepsis with the implementation of a core 6-hour bundle: results from the Portuguese community-acquired sepsis study (SACiUCI study). *Crit Care*. 2010;14(3):R83.

17. Weiss CH, Persell SD, Wunderink RG, Baker DW. Empiric antibiotic, mechanical ventilation, and central venous catheter duration as potential factors mediating the effect of a checklist prompting intervention on mortality: an exploratory analysis. *BMC Health Serv Res*. 2012;12:198.

18. Garnacho-Montero J, Gutierrez-Pizarra A, Escobedo-Ortega A, Corcia-Palomo Y, Fernandez-Delgado E, Herrera-Melero I, et al. De-escalation of empirical therapy is associated with lower mortality in patients with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*. 2014;40(1):32-40.

19. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*. 2006;34(6):1589-96.

20. Ferrer R, Artigas A, Suarez D, Palencia E, Levy MM, Arenzana A, et al. Effectiveness of treatments for severe sepsis: a prospective, multicenter, observational study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(9):861-6.

21. Vaughn VM, Chopra V. Revisiting the panculture. *BMJ Qual Saf*. 2017;26(3):236-9.

22. Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, Osborn TM, Townsend S, Dellinger RP, et al. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from



the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med.* 2014;42(8):1749-55.

23. Bagshaw SM, Lapinsky S, Dial S, Arabi Y, Dodek P, Wood G, et al. Acute kidney injury in septic shock: clinical outcomes and impact of duration of hypotension prior to initiation of antimicrobial therapy. *Intensive Care Med.* 2009;35(5):871-81.

24. Iscimen R, Cartin-Ceba R, Yilmaz M, Khan H, Hubmayr RD, Afessa B, et al. Risk factors for the development of acute lung injury in patients with septic shock: an observational cohort study. *Crit Care Med.* 2008;36(5):1518-22.

25. Garnacho-Montero J, Aldabo-Pallas T, Garnacho-Montero C, Cayuela A, Jimenez R, Barroso S, et al. Timing of adequate antibiotic therapy is a greater determinant of outcome than are TNF and IL-10 polymorphisms in patients with sepsis. *Critical Care.* 2006;10(4).

26. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 2000;118(1):146-55.

27. Barie PS, Hydo LJ, Shou J, Larone DH, Eachempati SR. Influence of antibiotic therapy on mortality of critical surgical illness caused or complicated by infection. *Surg Infect (Larchmt).* 2005;6(1):41-54.

28. Paul M, Shani V, Muchtar E, Kariv G, Robenshtok E, Leibovici L. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empiric antibiotic therapy for sepsis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(11):4851-63.

29. Micek ST, Welch EC, Khan J, Pervez M, Doherty JA, Reichley RM, et al. Empiric combination antibiotic therapy is associated with improved outcome against sepsis due

to Gram-negative bacteria: a retrospective analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(5):1742-8.

30. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001;344(10):699-709.

31. Schuetz P, Briel M, Christ-Crain M, Stolz D, Bouadma L, Wolff M, et al. Procalcitonin to guide initiation and duration of antibiotic treatment in acute respiratory infections: an individual patient data meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2012;55(5):651-62.

32. Soni NJ, Samson DJ, Galaydick JL, Vats V, Huang ES, Aronson N, et al. Procalcitonin-guided antibiotic therapy: a systematic review and meta-analysis. *J Hosp Med.* 2013;8(9):530-40.

33. Westwood M, Ramaekers B, Whiting P, Tomini F, Joore M, Armstrong N, et al. Procalcitonin testing to guide antibiotic therapy for the treatment of sepsis in intensive care settings and for suspected bacterial infection in emergency department settings: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess.* 2015;19(96):v-xxv, 1-236.

34. Investigators A, Group ACT, Peake SL, Delaney A, Bailey M, Bellomo R, et al. Goal-directed resuscitation for patients with early septic shock. *N Engl J Med.* 2014;371(16):1496-506.

35. Pro CI, Yealy DM, Kellum JA, Huang DT, Barnato AE, Weissfeld LA, et al. A randomized trial of protocol-based care for early septic shock. *N Engl J Med.* 2014;370(18):1683-93.

36. Mouncey PR, Osborn TM, Power GS, Harrison DA, Sadique MZ, Grieve RD, et al. Trial of early, goal-directed resuscitation for septic shock. *N Engl J Med.* 2015;372(14):1301-11.
37. Cecconi M, De Backer D, Antonelli M, Beale R, Bakker J, Hofer C, et al. Consensus on circulatory shock and hemodynamic monitoring. Task force of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 2014;40(12):1795-815.
38. Eskesen TG, Wetterslev M, Perner A. Systematic review including re-analyses of 1148 individual data sets of central venous pressure as a predictor of fluid responsiveness. *Intensive Care Med.* 2016;42(3):324-32.
39. Monnet X, Marik P, Teboul JL. Passive leg raising for predicting fluid responsiveness: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* 2016;42(12):1935-47.
40. Solomkin JS, Mazuski JE, Bradley JS, Rodvold KA, Goldstein EJ, Baron EJ, et al. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. *Surg Infect (Larchmt).* 2010;11(1):79-109.
41. Yamazaki T, Shimada Y, Taenaka N, Oshumi H, Takezawa J, Yoshiya I. Circulatory responses to afterloading with phenylephrine in hyperdynamic sepsis. *Crit Care Med.* 1982;10(7):432-5.
42. Moran JL, O'Fathartaigh MS, Peisach AR, Chapman MJ, Leppard P. Epinephrine as an inotropic agent in septic shock: a dose-profile analysis. *Crit Care Med.* 1993;21(1):70-7.
43. Levy B, Bollaert PE, Charpentier C, Nace L, Audibert G, Bauer P, et al. Comparison of norepinephrine and dobutamine to epinephrine for hemodynamics, lactate

metabolism, and gastric tonometric variables in septic shock: a prospective, randomized study. *Intensive Care Med.* 1997;23(3):282-7.

44. Zhou SX, Qiu HB, Huang YZ, Yang Y, Zheng RQ. Effects of norepinephrine, epinephrine, and norepinephrine-dobutamine on systemic and gastric mucosal oxygenation in septic shock. *Acta Pharmacol Sin.* 2002;23(7):654-8.

45. De Backer D, Creteur J, Silva E, Vincent JL. Effects of dopamine, norepinephrine, and epinephrine on the splanchnic circulation in septic shock: which is best? *Crit Care Med.* 2003;31(6):1659-67.

46. Regnier B, Rapin M, Gory G, Lemaire F, Teisseire B, Harari A. Haemodynamic effects of dopamine in septic shock. *Intensive Care Med.* 1977;3(2):47-53.

47. Beck G, Brinkkoetter P, Hanusch C, Schulte J, van Ackern K, van der Woude FJ, et al. Clinical review: immunomodulatory effects of dopamine in general inflammation. *Crit Care* 2004;8(6):485-91.

48. Landry DW, Levin HR, Gallant EM, Ashton RC, Jr., Seo S, D'Alessandro D, et al. Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation* 1997;95(5):1122-5.

49. Holmes CL, Walley KR, Chittock DR, Lehman T, Russell JA. The effects of vasopressin on hemodynamics and renal function in severe septic shock: a case series. *Intensive Care Med.* 2001;27(8):1416-21.

50. Dunser MW, Mayr AJ, Ulmer H, Knotzer H, Sumann G, Pajk W, et al. Arginine vasopressin in advanced vasodilatory shock: a prospective, randomized, controlled study. *Circulation* 2003;107(18):2313-9.

51. O'Brien A, Clapp L, Singer M. Terlipressin for norepinephrine-resistant septic shock. *Lancet* 2002;359(9313):1209-10.

52. Sharshar T, Blanchard A, Paillard M, Raphael JC, Gajdos P, Annane D. Circulating vasopressin levels in septic shock. *Crit Care Med.* 2003;31(6):1752-8.
53. Gattinoni L, Brazzi L, Pelosi P, Latini R, Tognoni G, Pesenti A, et al. A trial of goal-oriented hemodynamic therapy in critically ill patients. SvO<sub>2</sub> Collaborative Group. *N Engl J Med.* 1995;333(16):1025-32.
54. Volbeda M, Wetterslev J, Gluud C, Zijlstra JG, van der Horst IC, Keus F. Glucocorticosteroids for sepsis: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *Intensive Care Med.* 2015;41(7):1220-34.
55. Corwin HL, Gettinger A, Rodriguez RM, Pearl RG, Gubler KD, Enny C, et al. Efficacy of recombinant human erythropoietin in the critically ill patient: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Crit Care Med.* 1999;27(11):2346-50.
56. Kaufman RM, Djulbegovic B, Gernsheimer T, Kleinman S, Tinmouth AT, Capocelli KE, et al. Platelet transfusion: a clinical practice guideline from the AABB. *Ann Intern Med.* 2015;162(3):205-13.
57. Zhou F, Peng Z, Murugan R, Kellum JA. Blood purification and mortality in sepsis: a meta-analysis of randomized trials. *Crit Care Med.* 2013;41(9):2209-20.
58. Yamakawa K, Ogura H, Fujimi S, Morikawa M, Ogawa Y, Mohri T, et al. Recombinant human soluble thrombomodulin in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: a multicenter propensity score analysis. *Intensive Care Med.* 2013;39(4):644-52.
59. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute Respiratory Distress Syndrome The Berlin Definition. *Jama-J Am Med Assoc.* 2012;307(23):2526-33.

60. Guerin C, Reignier J, Richard JC, Beuret P, Gacouin A, Boulain T, et al. Prone Positioning in Severe Acute Respiratory Distress Syndrome. *New Engl J Med.* 2013;368(23):2159-68.
61. Futier E, Constantin JM, Paugam-Burtz C, Pascal J, Eurin M, Neuschwander A, et al. A Trial of Intraoperative Low-Tidal-Volume Ventilation in Abdominal Surgery. *New Engl J Med.* 2013;369(5):428-37.
62. Drakulovic MB, Torres A, Bauer TT, Nicolas JM, Nogue S, Ferrer N. Supine body position as a risk factor for nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients: a randomised trial. *Lancet* 1999;354(9193):1851-8.
63. Sevransky JE, Checkley W, Herrera P, Pickering BW, Barr J, Brown SM, et al. Protocols and Hospital Mortality in Critically Ill Patients: The United States Critical Illness and Injury Trials Group Critical Illness Outcomes Study. *Crit Care Med.* 2015;43(10):2076-84.
64. Ouellette DR, Patel S, Girard TD, Morris PE, Schmidt GA, Truwit JD, et al. Liberation From Mechanical Ventilation in Critically Ill Adults: An Official American College of Chest Physicians/American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: Inspiratory Pressure Augmentation During Spontaneous Breathing Trials, Protocols Minimizing Sedation, and Noninvasive Ventilation Immediately After Extubation. *Chest* 2017;151(1):166-80.
65. Schweickert WD, Pohlman MC, Pohlman AS, Nigos C, Pawlik AJ, Esbrook CL, et al. Early physical and occupational therapy in mechanically ventilated, critically ill patients: a randomised controlled trial. *Lancet* 2009;373(9678):1874-82.

66. Shehabi Y, Bellomo R, Reade MC, Bailey M, Bass F, Howe B, et al. Early intensive care sedation predicts long-term mortality in ventilated critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(8):724-31.
67. Fraser GL, Devlin JW, Worby CP, Alhazzani W, Barr J, Dasta JF, et al. Benzodiazepine versus nonbenzodiazepine-based sedation for mechanically ventilated, critically ill adults: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Crit Care Med.* 2013;41(9 Suppl 1):S30-8.
68. Lonardo NW, Mone MC, Nirula R, Kimball EJ, Ludwig K, Zhou X, et al. Propofol is associated with favorable outcomes compared with benzodiazepines in ventilated intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;189(11):1383-94.
69. Reade MC, Eastwood GM, Bellomo R, Bailey M, Bersten A, Cheung B, et al. Effect of Dexmedetomidine Added to Standard Care on Ventilator-Free Time in Patients With Agitated Delirium: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2016;315(14):1460-8.
70. Kalfon P, Giraudeau B, Ichai C, Guerrini A, Brechot N, Cinotti R, et al. Tight computerized versus conventional glucose control in the ICU: a randomized controlled trial. *Intensive Care Med.* 2014;40(2):171-81.
71. Pereira AJ, Correa TD, de Almeida FP, Deliberato RO, Lobato Mdos S, Akamine N, et al. Inaccuracy of Venous Point-of-Care Glucose Measurements in Critically Ill Patients: A Cross-Sectional Study. *PloS One* 2015;10(6):e0129568.
72. Mehta RL, McDonald B, Gabbai FB, Pahl M, Pascual MT, Farkas A, et al. A randomized clinical trial of continuous versus intermittent dialysis for acute renal failure. *Kidney Int.* 2001;60(3):1154-63.

73. Gaudry S, Hajage D, Schortgen F, Martin-Lefevre L, Pons B, Boulet E, et al. Initiation Strategies for Renal-Replacement Therapy in the Intensive Care Unit. *N Engl J Med.* 2016;375(2):122-33.
74. Zarbock A, Kellum JA, Schmidt C, Van Aken H, Wempe C, Pavenstadt H, et al. Effect of Early vs Delayed Initiation of Renal Replacement Therapy on Mortality in Critically Ill Patients With Acute Kidney Injury: The ELAIN Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2016;315(20):2190-9.
75. John S, Griesbach D, Baumgartel M, Weihprecht H, Schmieder RE, Geiger H. Effects of continuous haemofiltration vs intermittent haemodialysis on systemic haemodynamics and splanchnic regional perfusion in septic shock patients: a prospective, randomized clinical trial. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(2):320-7.
76. Alhazzani W, Lim W, Jaeschke RZ, Murad MH, Cade J, Cook DJ. Heparin thromboprophylaxis in medical-surgical critically ill patients: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Crit Care Med.* 2013;41(9):2088-98.
77. Kakkos SK, Caprini JA, Geroulakos G, Nicolaides AN, Stansby GP, Reddy DJ. Combined intermittent pneumatic leg compression and pharmacological prophylaxis for prevention of venous thromboembolism in high-risk patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008(4):CD005258.
78. Bardou M, Quenot JP, Barkun A. Stress-related mucosal disease in the critically ill patient. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(2):98-107.
79. Sasabuchi Y, Matsui H, Lefor AK, Fushimi K, Yasunaga H. Risks and Benefits of Stress Ulcer Prophylaxis for Patients With Severe Sepsis. *Crit Care Med.* 2016;44(7):e464-9.



80. Harvey SE, Parrott F, Harrison DA, Bear DE, Segaran E, Beale R, et al. Trial of the route of early nutritional support in critically ill adults. *N Engl J Med.* 2014;371(18):1673-84.
81. Doig GS, Simpson F, Sweetman EA, Finfer SR, Cooper DJ, Heighes PT, et al. Early parenteral nutrition in critically ill patients with short-term relative contraindications to early enteral nutrition: a randomized controlled trial. *JAMA* 2013;309(20):2130-8.
82. Sadique Z, Harrison DA, Bear DE, Rowan KM, Grieve R, investigators Ct. Effectiveness and cost-effectiveness of early nutritional support via the parenteral versus the enteral route for critically ill adult patients. *J Crit Care.* 2019;52:237-41.
83. Herbert G, Perry R, Andersen HK, Atkinson C, Penfold C, Lewis SJ, et al. Early enteral nutrition within 24 hours of lower gastrointestinal surgery versus later commencement for length of hospital stay and postoperative complications. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;7:CD004080.
84. Parikh R, Bates JHT, Poynter ME, Suratt BT, Parsons PE, Kien CL, et al. Pharmacokinetics of omega-3 fatty acids in patients with severe sepsis compared with healthy volunteers: A prospective cohort study. *Clin Nutr.* 2019.
85. Reignier J, Mercier E, Le Gouge A, Boulain T, Desachy A, Bellec F, et al. Effect of not monitoring residual gastric volume on risk of ventilator-associated pneumonia in adults receiving mechanical ventilation and early enteral feeding: a randomized controlled trial. *JAMA* 2013;309(3):249-56.
86. Elke G, Felbinger TW, Heyland DK. Gastric residual volume in critically ill patients: a dead marker or still alive? *Nutr Clin Pract.* 2015;30(1):59-71.
87. McCord CO, Allen EP. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool.* 1917;23:207.

88. Lerner AB, Case JD, Takahasi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc.* 1958;80:2587.
89. Lerner AB, Case JD, Takahashy Y, Lee TH. Structure of melatonin and 5-metoxy-indole-3-acetic acid from bovine pineal gland. *J Biol Chem.* 1960;235:1992-7.
90. Macias M, Rodriguez-Cabezas M, Reiter R, Osuna A, Acuna-Castroviejo D. Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res.* 1999;27(2):86-94.
91. Hardeland R, Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res.* 2003;34(4):233-41.
92. Zhao D, Yu Y, Shen Y, Liu Q, Zhao Z, Sharma R, et al. Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary History in Animals and Plants. *Front Endocrinol. (Lausanne).* 2019;10:249.
93. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Weintraub ST, et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(11):1177-85.
94. Acuña-Castroviejo D. Melatonin Receptors in Cell Nucleus: An answer to the numerous actions of the pineal hormone. 1st Meeting of Mediterranean Physiologists; 1994 09/04/1994; Palma de Mallorca (España): Pfluger Archiv Eur J Physiol.
95. Carlberg C, Hooft van Huijsduijnen R, Staple JK, DeLamararter JF, Becker-Andre M. RZR<sub>s</sub>, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol.* 1994;8(6):757-70.
96. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, León J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Topics Med Chem.* 2002. 2(2):133-51.

97. Benitez-King G, Rios A, Martinez A, Anton-Tay F. In vitro inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1996;1290(2):191-6.
98. Romero MP, Garcia-Perganeda A, Guerrero JM, Osuna C. Membrane-bound calmodulin in *Xenopus laevis* oocytes as a novel binding site for melatonin. *FASEB J*. 1998;12(13):1401-8.
99. Leon J, Macias M, Escames G, Camacho E, Khaldy H, Martin M, et al. Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. *Mol Pharmacol*. 2000;58(5):967-75.
100. Macias M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, et al. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem*. 2003;270(5):832-40.
101. Arendt J, Deacon S, English J, Hampton S, Morgan L. Melatonin and adjustment to phase shift. *J Sleep Res*. 1995;4(S2):74-9.
102. Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol*. 1991;79(1-3):C153-8.
103. Wurtman RJ, Axelrod J, Fischer JE. Melatonin Synthesis in the Pineal Gland: Effect of Light Mediated by the Sympathetic Nervous System. *Science* 1964;143(3612):1328-30.
104. Liu TC, Borjigin J. N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J Pineal Res*. 2005;39(1):91-6.
105. Kvetnoy I. Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness. *NeuroEndocrinol Lett*. 2002;23 Suppl 1:92-6.

106. Venegas C, García JA, Escames G, Ortiz F, López A, Doerrier C, et al. Extrapineal melatonin: Analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res.* 2012;52(2):217-27.
107. Acuna-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Diaz-Casado ME, Lima-Cabello E, Lopez LC, et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *CCell Mol Life Sci.* 2014;71(16):2997-3025.
108. Venegas C, García JA, Doerrier C, Volt H, Escames G, López LC, et al. Analysis of the daily changes of melatonin receptors in the rat liver. *J Pineal Res.* 2013;54(3):313-21.
109. Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *PNAS* 1995;92(19):8734-8.
110. Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, Popovska-Gorevski M, Dubocovich ML. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2016;56:361-83.
111. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev.* 1998;78(3):687-721.
112. von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 2002;309(1):151-62.
113. Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, et al. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem.* 2000;275(40):31311-7.

114. Withyachumnarnkul B, Limpanawattanakul M, Trakulrungsi W. Retention of radioactive substances in the hypothalamus, anterior pituitary, and reproductive organs of male rats after <sup>3</sup>H-melatonin administration. *Life Sci.* 1986;38(19):1757-65.
115. Menendez-Pelaez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Pablos MI, Tan DX. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem.* 1993;53(4):373-82.
116. Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res.* 1993;15(2):59-69.
117. Acuña-Castroviejo D, Pablos M, Menéndez Peláez A, Reiter RJ. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res Com Chem Pathol Pharmacol.* 1993;82(2):253-6.
118. Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menendez-Pelaez A, Pablos MI, Burgos A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res.* 1994;16(2):100-12.
119. Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem.* 1994;269(46):28531-4.
120. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I, Calvo JR, Karasek M, et al. Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(2):992-1000.

121. Lardone PJ, Guerrero JM, Fernandez-Santos JM, Rubio A, Martin-Lacave I, Carrillo-Vico A. Melatonin synthesized by T lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor. *J Pineal Res.* 2011;51(4):454-62.
122. Garcia JA, Volt H, Venegas C, Doerrier C, Escames G, Lopez LC, et al. Disruption of the NF-kappa B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor-alpha and blocks the septic response in mice. *FASEB J.* 2015;29(9):3863-75.
123. Andre E, Becker-Andre M. Expression of an N-terminally truncated form of human focal adhesion kinase in brain. *Biochem Biophys Res Comm.* 1993;190(1):140-7.
124. Giguere V, Beatty B, Squire J, Copeland NG, Jenkins NA. The orphan nuclear receptor ROR alpha (RORA) maps to a conserved region of homology on human chromosome 15q21-q22 and mouse chromosome 9. *Genomics* 1995;28(3):596-8.
125. He YW, Deftos ML, Ojala EW, Bevan MJ. RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity* 1998;9(6):797-806.
126. Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal.* 2009;7:e003.
127. Hamilton BA, Frankel WN, Kerrebrock AW, Hawkins TL, FitzHugh W, Kusumi K, et al. Disruption of the nuclear hormone receptor RORalpha in staggerer mice. *Nature* 1996;379(6567):736-9.
128. Andre E, Conquet F, Steinmayr M, Stratton SC, Porciatti V, Becker-Andre M. Disruption of retinoid-related orphan receptor beta changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice. *EMBO J.* 1998;17(14):3867-77.

129. Hirose T, Smith RJ, Jetten AM. ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Comm.* 1994;205(3):1976-83.
130. Medvedev A, Yan ZH, Hirose T, Giguere V, Jetten AM. Cloning of a cDNA encoding the murine orphan receptor RZR/ROR gamma and characterization of its response element. *Gene* 1996;181(1-2):199-206.
131. Smirnov AN. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Mosc)* 2001;66(1):19-26.
132. Giguere V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev.* 1999;20(5):689-725.
133. Burris TP. Nuclear hormone receptors for heme: REV-ERBalpha and REV-ERBbeta are ligand-regulated components of the mammalian clock. *Mol Endocrinol.* 2008;22(7):1509-20.
134. King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, et al. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 1997;89(4):641-53.
135. Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, Pirrotta V, Hadfield C, Hall JC, et al. Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell* 1984;38(3):701-10.
136. Ishida N, Kaneko M, Allada R. Biological clocks. *PNAS* 1999;96(16):8819-20.
137. Nakajima Y, Ikeda M, Kimura T, Honma S, Ohmiya Y, Honma K. Bidirectional role of orphan nuclear receptor RORalpha in clock gene transcriptions demonstrated by a novel reporter assay system. *FEBS Lett.* 2004;565(1-3):122-6.

138. Akashi M, Takumi T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12(5):441-8.
139. Feige JN, Auwerx J. Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20(3):303-9.
140. Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, et al. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem.* 1995;270(13):7037-40.
141. Delerive P, Monte D, Dubois G, Trottein F, Fruchart-Najib J, Mariani J, et al. The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep.* 2001;2(1):42-8.
142. Stapleton CM, Jaradat M, Dixon D, Kang HS, Kim SC, Liao G, et al. Enhanced susceptibility of staggerer (RORalphasg/sg) mice to lipopolysaccharide-induced lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;289(1):L144-52.
143. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004;23(12):2369-80.
144. Kennaway DJ, Voultsios A. Circadian rhythm of free melatonin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(3):1013-5.
145. Ramirez-Rodriguez G, Ortiz-Lopez L, Dominguez-Alonso A, Benitez-King GA, Kempermann G. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. *J Pineal Res.* 2011;50(1):29-37.



146. Dominguez-Alonso A, Ramirez-Rodriguez G, Benitez-King G. Melatonin increases dendritogenesis in the hilus of hippocampal organotypic cultures. *J Pineal Res.* 2012;52(4):427-36.
147. Leon J, Escames G, Rodriguez MI, Lopez LC, Tapias V, Entrena A, et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. *J Neurochem.* 2006;98(6):2023-33.
148. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J.* 1993;1:52-60.
149. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo JR. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept.* 2000;9(3-4):137-59.
150. Acuña-Castroviejo D, Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H, et al. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res.* 2001;30(2):65-74.
151. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem.* 2002;2(2):181-97.
152. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res.* 2007;42(1):28-42.
153. Reiter RJ. Melatonin: Lowering the high price of free radicals. *News Physiol Sci.* 2000;15:246-50.
154. Acuña-Castroviejo D, López LC, Escames G, López A, García JA, Reiter RJ. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Cur Topics Med Chem.* 2011;11(2):221-40.

155. Zhang H, Squadrito GL, Uppu R, Pryor WA. Reaction of peroxynitrite with melatonin: A mechanistic study. *Chem Res Toxicol.* 1999;12(6):526-34.
156. Antolin I, Mayo JC, Sainz RM, del Brio Mde L, Herrera F, Martin V, et al. Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2002;943(2):163-73.
157. Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Galano A, Jou MJ, Acuna-Castroviejo D. Melatonin Mitigates Mitochondrial Meltdown: Interactions with SIRT3. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8): doi: 10.3390/ijms19082439.
158. Urata Y, Honman S, Todoroki S, Lida T, Cho S, Honma K, et al. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthase mediated by activator proteín-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:838-47.
159. Pierrefiche G, Laborit H. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp Gerontol.* 1995;30(3-4):213-27.
160. Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res.* 2003;34(1):75-8.
161. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Rodríguez MI, López LC. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci.* 2007;12:947-63.
162. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol.* 2003;50(4):1129-46.
163. Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Acuña-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* 2000;14(12):1677-9.

164. Martin M, Macias M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, et al. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res.* 2000;28(4):242-8.
165. Doerrier C, Garcia JA, Volt H, Diaz-Casado ME, Lima-Cabello E, Ortiz F, et al. Identification of mitochondrial deficits and melatonin targets in liver of septic mice by high-resolution respirometry. *Life Sci.* 2015;121:158-65.
166. Escames G, Leon J, Macias M, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J.* 2003;17(8):932-4.
167. Escames G, Lopez LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB, et al. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res.* 2006;40(1):71-8.
168. Escames G, Lopez LC, Ortiz F, Lopez A, Garcia JA, Ros E, et al. Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J.* 2007;274(8):2135-47.
169. Rodriguez MI, Carretero M, Escames G, Lopez LC, Maldonado MD, Tan DX, et al. Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radic Res.* 2007;41(1):15-24.
170. Rodriguez MI, Escames G, Lopez LC, Lopez A, Garcia JA, Ortiz F, et al. Improved mitochondrial function and increased life span after chronic melatonin treatment in senescent prone mice. *Exp Gerontol.* 2008;43(8):749-56.

171. Ortiz F, Garcia JA, Acuna-Castroviejo D, Doerrier C, Lopez A, Venegas C, et al. The beneficial effects of melatonin against heart mitochondrial impairment during sepsis: inhibition of iNOS and preservation of nNOS. *J Pineal Res.* 2014;56:71-81.
172. Escames G, Lopez LC, Garcia JA, Garcia-Corzo L, Ortiz F, Acuña-Castroviejo D. Mitochondrial DNA and inflammatory diseases. *Hum Genet.* 2012;131(2):161-73.
173. Lopez LC, Escames G, Ortiz F, Ros E, Acuña-Castroviejo D. Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *NeuroEndocrinol Lett.* 2006;27(5):623-30.
174. Tan DX, Manchester LC, Qin L, Reiter RJ. Melatonin: A Mitochondrial Targeting Molecule Involving Mitochondrial Protection and Dynamics. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12).
175. Garcia JJ, Pinol-Ripoll G, Martinez-Ballarín E, Fuentes-Broto L, Miana-Mena FJ, Venegas C, et al. Melatonin reduces membrane rigidity and oxidative damage in the brain of SAMP8 mice. *Neurobiol Aging.* 2011;32(11):2045-54.
176. Lopez A, Garcia JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, Lopez LC, et al. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res.* 2009;46(2):188-98.
177. Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D, Wolf G, Horn TF. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J.* 2004;18(7):869-71.
178. Mundigler G, Delle-Karth G, Koreny M, Zehetgruber M, Steindl-Munda P, Marktl W, et al. Impaired circadian rhythm of melatonin secretion in sedated critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 2002;30(3):536-40.

179. Verceles AC, Silhan L, Terrin M, Netzer G, Shanholtz C, Scharf SM. Circadian rhythm disruption in severe sepsis: the effect of ambient light on urinary 6-sulfatoxymelatonin secretion. *Intensive Care Med.* 2012;38(5):804-10.
180. Perras B, Kurowski V, Dodt C. Nocturnal melatonin concentration is correlated with illness severity in patients with septic disease. *Intensive Care Med.* 2006;32(4):624-5.
181. da Silveira Cruz-Machado S, Pinato L, Tamura EK, Carvalho-Sousa CE, Markus RP. Glia-pinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). *PloS One* 2012;7(7):e40142.
182. Crespo E, Macias M, Pozo D, Escames G, Martin M, Vives F, et al. 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.* 1999;13(12):1537-46.
183. Escames G, Lopez L, Tapias V, Utrilla P, Reiter R, Hitos A, et al. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res.* 2006;40(1):71-8.
184. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I, Guerrero JM, et al. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res.* 2005;39(4):400-8.
185. Lowes DA, Almawash AM, Webster NR, Reid VL, Galley HF. Melatonin and structurally similar compounds have differing effects on inflammation and

mitochondrial function in endothelial cells under conditions mimicking sepsis. *Br J Anesth.* 2011;107(2):193-201.

186. Escames G, López LC, Ortiz F, Ros E, Acuña-Castroviejo D. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Expt Gerontol.* 2006;41:1165-73.

187. Escames G, Acuña-Castroviejo D, Lopez LC, Tan DX, Maldonado MD, Sanchez-Hidalgo M, et al. Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock: experimental and clinical evidence. *J Pharm Pharmacol.* 2006;58(9):1153-65.

188. Volt H, Garcia JA, Doerrier C, Diaz-Casado ME, Guerra-Librero A, Lopez LC, et al. Same molecule but different expression: aging and sepsis trigger NLRP3 inflammasome activation, a target of melatonin. *J Pineal Res.* 2016;60(2):193-205.

189. Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, Tan DX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, et al. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res.* 2001;50(6):756-60.

190. Nakagawa H, Okumura N. Coordinated regulation of circadian rhythms and homeostasis by the suprachiasmatic nucleus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010;86(4):391-409.

191. Cederroth CR, Albrecht U, Bass J, Brown SA, Dyhrfeld-Johnsen J, Gachon F, et al. Medicine in the Fourth Dimension. *Cell Metab.* 2019;30(2):238-50.

192. Kim P, Oster H, Lehnert H, Schmid SM, Salamat N, Barclay JL, et al. Coupling the Circadian Clock to Homeostasis: The Role of Period in Timing Physiology. *Endocr Rev.* 2019;40(1):66-95.

193. Dibner C. The importance of being rhythmic: Living in harmony with your body clocks. *Acta Physiol (Oxf).* 2019:e13281.

194. Duguay D, Cermakian N. The crosstalk between physiology and circadian clock proteins. *Chronobiol Int.* 2009;26(8):1479-513.
195. Cha HK, Chung S, Lim HY, Jung JW, Son GH. Small Molecule Modulators of the Circadian Molecular Clock With Implications for Neuropsychiatric Diseases. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:496.
196. Goriki A, Hatanaka F, Myung J, Kim JK, Yoritaka T, Tanoue S, et al. A novel protein, CHRONO, functions as a core component of the mammalian circadian clock. *PLoS Biol.* 2014;12(4):e1001839.
197. Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:517-49.
198. Kozlov A, Nagoshi E. Decoding *Drosophila* circadian pacemaker circuit. *Curr Opin Insect Sci.* 2019;36:33-8.
199. Labrecque N, Cermakian N. Circadian Clocks in the Immune System. *J Biol Rhythms.* 2015;30(4):277-90.
200. Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, O'Neill LA. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* 2014;40(2):178-86.
201. Curtis AM, Fagundes CT, Yang G, Palsson-McDermott EM, Wochal P, McGettrick AF, et al. Circadian control of innate immunity in macrophages by miR-155 targeting *Bmal1*. *PNAS* 2015;112(23):7231-6.
202. Tang X, Guo D, Lin C, Shi Z, Qian R, Fu W, et al. hCLOCK induction by hypoxia promotes inflammatory responses by activating the NFκB pathway. *Mol Med Rep.* 2017;15(3):1401-6.

203. Griffin P, Dimitry JM, Sheehan PW, Lananna BV, Guo C, Robinette ML, et al. Circadian clock protein Rev-erbalpha regulates neuroinflammation. PNAS 2019;116(11):5102-7.
204. Steinmayr M, Andre E, Conquet F, Rondi-Reig L, Delhay-Bouchaud N, Auclair N, et al. staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. PNAS 1998;95(7):3960-5.
205. Bellet MM, Masri S, Astarita G, Sassone-Corsi P, Della Fazia MA, Servillo G. Histone Deacetylase SIRT1 Controls Proliferation, Circadian Rhythm, and Lipid Metabolism during Liver Regeneration in Mice. J Biol Chem. 2016;291(44):23318-29.
206. Okada K, Yano M, Doki Y, Azama T, Iwanaga H, Miki H, et al. Injection of LPS causes transient suppression of biological clock genes in rats. J Surgical Res. 2008;145(1):5-12.
207. Straub RH, Cutolo M. Circadian rhythms in rheumatoid arthritis: implications for pathophysiology and therapeutic management. Arthritis Rheum. 2007;56(2):399-408.
208. Carlson DE, Chiu WC. The absence of circadian cues during recovery from sepsis modifies pituitary-adrenocortical function and impairs survival. Shock 2008;29(1):127-32.
209. Carrascal L, Nunez-Abades P, Ayala A, Cano M. Role of Melatonin in the Inflammatory Process and its Therapeutic Potential. Curr Pharm Des. 2018;24(14):1563-88.
210. Hardeland R. Melatonin and inflammation-Story of a double-edged blade. J Pineal Res. 2018;65(4):e12525.



211. Libri V, Del Gobbo V, Villani N, Calio R, Nistico G. Influence of pineal gland lesion on interleukin-2 production and natural killer activity in C57BL/6 mice. *Pharmacol Res.* 1990;22 Suppl 3:52.
212. Drazen DL, Nelson RJ. Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. *Neuroendocrinology* 2001;74(3):178-84.
213. Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, Gonzalez-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res.* 2013;54(1):1-14.
214. Bang J, Chang HW, Jung HR, Cho CH, Hur JA, Lee SI, et al. Melatonin attenuates clock gene cryptochrome1, which may aggravate mouse anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *Rheumatol Int.* 2012;32(2):379-85.
215. Acuna-Castroviejo D, Rahim I, Acuna-Fernandez C, Fernandez-Ortiz M, Solera-Marin J, Sayed RKA, et al. Melatonin, clock genes and mitochondria in sepsis. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(21):3965-87.
216. World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2013;310(20):2191-4.
217. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990;186:407-21.
218. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol.* 1998;161(5):2524-32.

219. Dean RT, Thomas SM, Vince G, Wolff SP. Oxidation induced proteolysis and its possible restriction by some secondary protein modifications. *Biomed Biochim Acta*. 1986;45(11-12):1563-73.
220. Pandey KB, Mishra N, Rizvi SI. Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. *Clin Biochem*. 2010;43(4-5):508-11.
221. Angelousi A, Nasiri-Ansari N, Spilioti E, Mantzou E, Kalotyxou V, Chrousos G, et al. Altered expression of circadian clock genes in polyglandular autoimmune syndrome type III. *Endocrine* 2018;59(1):109-19.
222. Cuesta M, Cermakian N, Boivin DB. Glucocorticoids entrain molecular clock components in human peripheral cells. *FASEB J*. 2015;29(4):1360-70.
223. Lech K, Ackermann K, Revell VL, Lao O, Skene DJ, Kayser M. Dissecting Daily and Circadian Expression Rhythms of Clock-Controlled Genes in Human Blood. *J Biol Rhythms*. 2016;31(1):68-81.
224. Coiffard B, Diallo AB, Cilver A, Mezouar S, Hammad E, Vigne C, et al. Circadian rhythm disruption and sepsis in severe trauma patients. *Shock* 2019;52(1):29-36.
225. Liu J, Malkani G, Shi X, Meyer M, Cunningham-Runddles S, Ma X, et al. The circadian clock Period 2 gene regulates gamma interferon production of NK cells in host response to lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *Infect Immun*. 2006;74(8):4750-6.
226. Narasimamurthy R, Hatori M, Nayak SK, Liu F, Panda S, Verma IM. Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *PNAS* 2012;109(31):12662-7.

227. Castanon-Cervantes O, Wu M, Ehlen JC, Paul K, Gamble KL, Johnson RL, et al. Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption. *J Immunol.* 2010;185(10):5796-805.
228. Elliott R, Nathaney A. Typical sleep patterns are absent in mechanically ventilated patients and their circadian melatonin rhythm is evident but the timing is altered by the ICU environment. *Aust Crit Care.* 2014;27(3):151-3.
229. Gay PC. Sleep and sleep-disordered breathing in the hospitalized patient. *Resp Care* 2010;55(9):1240-54.
230. Venegas C, Garcia JA, Escames G, Ortiz F, Lopez A, Doerrier C, et al. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res.* 2012;52(2):217-27.
231. Muxel SM, Pires-Lapa MA, Monteiro AW, Cecon E, Tamura EK, Floeter-Winter LM, et al. NF-kappaB drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. *PLoS One.* 2012;7(12):e52010.
232. Markus RP, Cecon E, Pires-Lapa MA. Immune-pineal axis: nuclear factor kappaB (NF-kB) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):10979-97.
233. Muxel SM, Laranjeira-Silva MF, Carvalho-Sousa CE, Floeter-Winter LM, Markus RP. The RelA/cRel nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) dimer, crucial for inflammation resolution, mediates the transcription of the key enzyme in melatonin synthesis in RAW 264.7 macrophages. *J Pineal Res.* 2016;60(4):394-404.

234. Alamili M, Bendtzen K, Lykkesfeldt J, Rosenberg J, Gogenur I. Effect of melatonin on human nighttime endotoxaemia: randomized, double-blinded, cross-over study. *In Vivo*. 2014;28(6):1057-63.
235. Lorente L, Martin MM, Abreu-Gonzalez P, Perez-Cejas A, Lopez RO, Ferreres J, et al. Serum melatonin levels during the first seven days of severe sepsis diagnosis are associated with sepsis severity and mortality. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018;36(9):544-9.
236. Acuna-Castroviejo D, Bueno-Larano P. Comment on "Serum melatonin levels are associated with mortality in severe septic patients" by Lorente et al. *J Crit Care* 2015;30(5):1133. doi.org/10.1016/j.jcrc.2015.03.023.

**ANEXOS**



**Shock 2019; DOI : 10.1097/SHK.0000000000001433**

**Daily changes in the expression of clock genes in sepsis and their relation with sepsis outcome and urinary excretion of 6-sulfatoximelatonin**

Carlos Acuña-Fernández<sup>1,\*</sup>, Jorge Solera Marín<sup>1</sup>, María E Díaz-Casado<sup>2</sup>, Iryna Rusanova<sup>2</sup>, Beneharo Darias-Delbey<sup>1</sup>, Luis Pérez-Guillama<sup>1</sup>, Javier Florido-Ruiz<sup>2</sup>, Darío Acuña-Castroviejo<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad of Anesthesiology y Reanimación, Hospital Universitario de Canarias, Carreterra de Ofra, s/n, 38320 San Cristóbal de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Universidad de Granada, Granada, Spain

<sup>3</sup>CIBERfes, Ibs.Granada, and UGC de Laboratorios Clínicos, Complejo Hospitalario de Granada, Granada, Spain

**\*Corresponding authors and address for reprints:**

Carlos Acuña Fernández, MD. Unidad of Anesthesiology y Reanimación, Hospital Universitario de Canarias, Carreterra de Ofra, s/n, 38320 San Cristóbal de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, Spain. Telf.: +34-658226935. E-mail: cacufer89@gmail.com.

Darío Acuña-Castroviejo, MD, PhD. Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Universidad de Granada, Avenida del Conocimiento s/n; 18016 Granada, Spain. Tel.: +34-958241000 ext. 20169. E-mail: dacuna@ugr.es

**Short title:** clock genes and sepsis

**Funding statement:** This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III through the projects PI13-00981, PI16-00519, and CB/10/00238 (Co-funded by European Regional Development Fund/European Social Fund) "Investing in your future"); the Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo, Junta de Andalucía, Spain (CTS-101), and from Pfizer S.L.U, Madrid, Spain.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no competing interests.



## **Abstract**

**Background:** Whereas the circadian system controls the daily production of melatonin and the daily activity of the immune system, increasing evidences support the association between circadian misalignment with the alterations in the immune response and melatonin rhythm during sepsis. The aim of this study was to analyze the daily changes in clock genes expression and the urinary excretion of 6-SM (6-sulfatoxymelatonin, the major melatonin metabolite), and their connection with the innate immune activity, oxidative status in blood, and clinical outcome during sepsis.

**Methods:** Healthy volunteers, non-septic ICU patients, and septic ICU patients, were evaluated. The expression of *bmal1*, *per2*, *clock*, and *cry1* genes was determined by PCR in blood; 6-SM was assessed in urine by ELISA; plasma cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , and IL-10 were determined by a multiplex array method, and lipid peroxidation (LPO) and protein oxidation (AOPP) by spectrophotometry. Hematological and biochemical data, and clinical scores of the patients, were also recorded.

**Results:** Clock gene rhythm was maintained in non-septic patients but blunted in septic ones, whereas the innate immune and the oxidative stress responses were significantly higher in the latter. 6-SM excretion was also more elevated in septic than in non-septic patients, and it correlated with the degree of the immune response and oxidative status. 6-SM also correlated with SOFA and procalcitonin in the patients. Proinflammatory cytokines, LPO, and AOPP were normalized in the patients once recovered from sepsis.

**Conclusion:** Our data suggest a relationship between clock genes rhythm disruption, the immune response and the oxidative status, with 6-SM acting as a compensatory response. ICU conditions are not a main clock disrupter because the significant differences found in the responses of septic versus non-septic patients under the same ICU environment.

**Keywords:** septic patients; clock genes; chronodisruption; innate immunity; 6-sulfatoximelatonin; oxidative stress; cytokines

## **Introduction**

Sepsis is life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection [1-3]. Sepsis and septic shock are major healthcare problems, affecting millions of people around the world each year, and killing as many as one in four (and often more) [4-7]. There is no effective therapy that minimizes significantly the mortality and morbidity of sepsis, but early identification and management improves its outcome.

It is known that sepsis courses with a state of chronodisruption, affecting the pattern of melatonin production that has been associated with alterations in the sleep/wake cycle of septic patients [8; 9]. Alterations in the urinary excretion of 6-sulfatoxymelatonin (6-SM), a hepatic metabolite of melatonin that constitutes the 90% of the melatonin excreted in the urine, have been also reported in septic ICU patients [8; 10]. Some authors, however, showed that the circadian rhythm of 6-SM in urine is maintained in non-septic ICU patients [8], suggesting that the environmental light is not the only factor affecting melatonin disruption in septic patients. Moreover, it is known that the innate immunity is under the control of the circadian clock, and it is disrupted in sepsis [11; 12]. With these data in mind, one can suggest a complex relationship between clock genes, melatonin production, and the exaggerated response of the innate immunity in sepsis.

The alteration of melatonin production in septic patients may be explained by the septic process itself, by the light conditions in the ICUs, and/or by medication in these patients. In turn, melatonin administration exerts profound antiseptic properties, recovering mice from septic shock and multiorgan failure, and increasing significantly

their survival [13-15]. The mechanism of action of the anti-inflammatory effects of melatonin in sepsis has been recently deciphered, and it involves the inhibition of both NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome pathways of the innate immunity, recovering the mitochondrial function and ATP production [16; 17]. The effects of melatonin were dependent of its ability to resynchronize the expression of the clock genes, mainly *bmal1/clock/per/cry*. BMAL1/CLOCK controls the synthesis of PER and CRY, which forms PER/CRY heterodimers that repress BMAL1/CLOCK complex, leading to the inhibition of its transcriptional activity. The resulting PER/CRY reduction releases the BMAL1/CLOCK activity. This 24-hr cycle of the molecular clock maintains the innate immunity under control [11]. The loop of the clock proteins BMAL1/CLOCK/PER/CRY controls the circadian production of the pineal melatonin that, in turn, feedback these genes to maintain them 'on time'. Moreover, BMAL1 directly reduces inflammation because it decreases circulating inflammatory cells and binds CLOCK, preventing the latter from acetylating p65 and inducing pro-inflammatory cytokines [18; 19]. Additionally, BMAL1 induces the expression of NAMPT, responsible for the synthesis of NAD<sup>+</sup>, which is the substrate of sirtuins; among them, SIRT1 deacetylates p65, reducing the ability of the latter to bind DNA and, thus, reducing its transcriptional activity, leading to a reduction in the innate immune response [16]. Finally, PER2 and CRY1 collaborate in this response because of the inhibition of BMAL1 by the former, and the regulation of proinflammatory cytokines by CRY1 [11; 20; 21]. Additionally, *bmal1* enhances the mitochondrial function through the acetylation of mitochondrial complex I [22]. Thus, the relationship between clock genes, inflammation, and melatonin becomes critical in sepsis.

We hypothesized that the alteration in the clock genes in sepsis is related to the degree of the inflammatory response. So, we consider it of interest to evaluate the relationships between clock genes, innate immunity, and nocturnal 6-SM in septic ICU patients, and to compare them with non-septic ICU patients and healthy control volunteers. Our results confirm the inflammation-dependent chronodisruption in septic patients compared to non-septic ones, and support an overproduction of melatonin in sepsis as compensatory response to inflammation.

## **Materials and Methods**

### *Subjects of study*

The study was carried out on a total of 56 subjects, classified as healthy volunteers (HV,  $n = 12$ , 7 men and 5 women, aged 25 to 68 years); non-septic ICU control patients (CP,  $n = 24$ , 16 men and 8 women, aged 30 to 75 years), and septic ICU patients (SP,  $n = 20$ , 13 men and 7 women, aged 40 to 81 years). Septic patients were analyzed at the acute phase of sepsis (SP.A), according with the Surviving Sepsis Campaign criteria from 2012 and the procalcitonin levels, and after they recovered from the septic condition (SP.R), when the patients had procalcitonin levels lower than 0.5-1 ng/mL [1-3; 23; 24]. The range of interval between SP.A and SP.R was 3-7 days. In all cases, peritoneal fluid and blood (if fever) were submitted to the Biopathology laboratory for microbiological analysis, but the treatment started just when sepsis was diagnosed accordingly with the criteria above comment, and empirical antibiotics were used at this time. Once the microbiological analysis was received, antibiotic therapy was modified accordingly, if necessary.

To track the clinical evolution of the patients, the following clinical data were recorded: 1) preoperative suspected diagnoses; 2) time, date, and surgical technique used (laparotomy); 3) postoperative diagnoses; 4) clinical criteria of sepsis [3]. To assess the

clinical severity of the patients, the following scores were used: SAPS III, simplified acute physiologic score, which evaluates the prognosis of sepsis; SOFA, sepsis-related organ failure assessment; PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, which is the ratio between PO<sub>2</sub> and the fraction of inspired oxygen, FiO<sub>2</sub> (Kirby's index), and Glasgow scale, which evaluates the conscious state.

Control patients group consisted in non-septic patients who had undergone surgery and were hospitalized in the same ICU and environmental conditions as septic patients.

Same criteria of inclusion and exclusion were applied for septic patients and patients of the control group, except for the absence of sepsis in the latter. The criteria for inclusion of septic patients comprised patients of both sexes aged between 18-85 years, which were under programmed or urgent laparotomy due to abdominal disease (peritonitis in all cases). All patients or authorized relatives signed an informed consent. The exclusion criteria include patients below 18 or above 85 years old; patients that do not signed the informed consent, and patients previously operated from central neural processes. The study was approved by the Canary Islands University Hospital Ethical's Committee of Clinical Assays (ref n°: 2015\_25), according to the 1983 revised Helsinki Declaration of 1975.

### *Samples and preparation*

For biochemical routine analysis, blood samples were obtained from the venous catheter placed in both control patients (CP) and in the acute phase of sepsis (SP.A) patients, and directly by antecubital vein puncture in control healthy subjects (HV) at 09:00 hr. In septic patients, a second blood sample was taken when they recovered from the septic state (SP.R) at 09:00 hr. For the study of the expression of clock genes, the subjects of study were sampled at 08:00, 13:00, 18:00, and 23:00 hours. Samples were

centrifugated at 3,000 g for 10 min and plasma was separated and frozen at -80°C until the biochemical analysis were performed. Urine from patient's groups was collected during the night (from 00:00 hr to 06:00 hr) from each subject of the study, the total volume was noted, and an aliquot of 5 mL was frozen at at -80°C until the determination of 6-SM. Healthy volunteers collected the urine in a container provided by the laboratory from the same period, noted the total volume, fill a 5 mL tube, and bring the tube to the lab next morning, when it was frozen at at -80°C.

#### *Quantitative real-time PCR (qPCR) of mRNA*

Because it was not possible to obtain the four-time samples for PCR in some patients, the whole blood of 12 healthy volunteers, 15 from 24 non-septic ICU patients, and 15 from 20 septic ICU patients, were collected to study the gene expression of the clock genes: *bmal1*, *clock*, *per2* and *cry1*. The collection of whole blood was made from the venous catheter placed in these patients, or from the antecubital vein in healthy subjects using the PAXgene Blood RNA Tube (Becton Dickinson, S.A.U., Madrid, Spain), which contains an additive that stabilized the gene transcription profile. Immediately after blood collection, the PAXgene Blood RNA Tube were inverted 8-10 times and stored upright at room temperature (18°C to 25°C) for a minimum of 2 hours before freezing at -20°C until RNA extraction. Total intracellular RNA was extracted using the PAXgene Blood RNA kit IVD (Qiagen Iberia SL. Madrid, Spain) in accordance with the manufacturer's procedure. Total RNA was quantified by optical density at 260/280 nm by nanodrop spectrophotometry, and RNA integrity was checked by electrophoresis in 1.5% agarose. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 400 ng of total RNA using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen Iberia SL.) according to the manufacturer's instructions. cDNA from each blood sample was frozen to -80°C in aliquots of 25 ng each one. At the time of PCR, one aliquot was thawed and used for each PCR. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed with the QuantiNova SYBR Green PCR kit (Qiagen Iberia SL) by the standard curve method. 20 µL PCR mixture contained 20 ng of cDNA template, 200 nmoL

of each primer and 10  $\mu$ L of Power SYBR Green PCR Master Mix. Primer sequences are depicted in supplementary materials (Table S1). PCRs amplification were as follows: 2 min at 95°C before 40 thermal cycles, each consisting of denaturation at 95°C for 5 s and annealing/extending at 60°C for 10 s, followed by melting curve. GAPDH was used as control. The relative changes in gene expression were analyzed by the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method using healthy volunteers' group as calibrator sample.

#### *Determination of plasma cytokines*

The Affimetrix's ProcartaPlex Simplex Kit refs EPX010-10224-901 for IL-1 $\beta$ ; EPX010-10213-901 for IL-6; EPX010-10204-901 for IL-8; EPX010-10215-901 for IL-10, and EPX010-10223-901 for TNF $\alpha$  (Labclinics, S.A., Barcelona, Spain), was used to profile expression of these cytokines. The assay was performed according to the manufacturers instructions. Briefly, 50  $\mu$ L of working solution containing multiple microbeads labeled with specific antibodies against each of the aforementioned cytokines were added into each well, washed twice with 200  $\mu$ L of wash buffer and filtered to dryness. Then 25  $\mu$ L thawed plasma aliquots diluted 1:4 with the specific Linco-Plex sample diluents were added to each well and incubated for 60 min at room temperature. After a wash step (twice) with 200  $\mu$ L wash buffer, the beads were incubated with 25  $\mu$ L of the detection antibody cocktail for 30 min at room temperature, each antibody specific to a single cytokine. After another two-time wash step with 200  $\mu$ L wash buffer, the beads were incubated with 25  $\mu$ L of the streptavidin–phycoerythrin solution for 30 min at room temperature and washed twice again. The beads were resuspended in each well with 100  $\mu$ L of buffer and the concentration of each cytokine was determined using the array reader. A parallel standard curve was constructed for each cytokine. Levels are expressed in ng/L.



#### *Measurement of lipid and protein oxidation in plasma*

Plasma samples were thawed and centrifugated at 5,000 g for 5 min, and 200  $\mu$ L of the supernatants were used for LPO measurements. For this purpose, a commercial LPO assay kit that estimated both malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxyalkenals (4HDA) was used (Bioxytech LPO-568 assay kit; OxisResearch, Portland, OR, USA) [25]. LPO concentrations are expressed in nmol/mL. Advanced oxidation protein products (AOPP) were measured by spectrophotometry on a microplate reader calibrated with chloramine-T solution that absorbs at 340 nm in the presence of potassium iodide [26]. In test wells, 200  $\mu$ L of plasma diluted 1/5 in PBS was placed on a 96-well microliter late, and 20  $\mu$ L of acetic acid was added. In standard wells, 10  $\mu$ L of 1.16 M potassium iodide was added to 200  $\mu$ L of chloramine-T solution with concentrations ranging from 3.12  $\mu$ M to 100  $\mu$ M, followed by 20 mL of acetic acid. The absorbance of the reaction mixture was immediately read at 340 nm on the microplate reader against a blank containing 200  $\mu$ L of PBS, 10  $\mu$ L of potassium iodide, and 20  $\mu$ L of acetic acid. The AOPP concentrations were expressed as nmol/mL of chloramine-T equivalents.

#### *Measurement of urinary excretion of 6-sulfatoximelatonin*

6-SM was determined using a solid phase ELISA commercial kit (RE54031, IBL Int., Hamburg, Germany). Briefly, 50  $\mu$ L standard, control and patient sample were placed into the respective wells of a microtiter plate. Then, 50  $\mu$ L of freshly enzyme conjugate solution were added into each well, followed by 50  $\mu$ L of melatonin sulfate antiserum. Plates were incubated 2 h at room temperature on an orbital shaker (500 rpm) and washed 4 x 250  $\mu$ L of diluted wash buffer. After that, 100  $\mu$ L of tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution were added into each well, and incubated for 30 min at room temperature on an orbital shaker (500 rpm). Once incubation finished, the reaction was

stopped by adding 100  $\mu\text{L}$  of TMB stop solution in each well. The optical density was measured in a spectrophotometer at 600-650 nm within 60 min after pipetting of the stop solution. The obtained optical densities of the standards were plotted against their concentrations (1.7 ng/mL to 420 ng/mL), and the concentration of the samples was calculated from the standard curve. The concentration of 6-sulfatoximelatonin was expressed as ng/6 h, considering 6 hours as the timing of nocturnal urine collection in all subjects [8].

### *Biochemical analysis*

Biochemical parameters were analyzed in the clinical analysis service of the Canary Islands University Hospital by routine methods. Metabolic impairment was assessed by measuring the changes in serum concentrations of glucose as marker for carbohydrate metabolism alteration. Liver status was assessed by measuring the serum concentrations of bilirubin, aspartate aminotransferase (AST), a non-specific marker for hepatic parenchymal injury, and alanine aminotransferase (ALT), a specific marker for hepatic parenchymal injury. Renal status was assessed by measuring the serum concentration of creatinine as indicator of glomerular filtration rate, urea and uric acid as indicators of impaired excretory function of the kidney and/or increased catabolism, and electrolytes balance. Moreover, lactate, SVCO<sub>2</sub>, and procalcitonin, as indexes of sepsis severity, were determined. Serum procalcitonin is commonly used to assist in the diagnosis of acute infection and to help in defining the duration of antimicrobial therapy. Various procalcitonin-based algorithms have been used to direct de-escalation of antimicrobial therapy in severe infections and sepsis [23; 24]. Moreover, prothrombin activity (TP) and fibrinogen as markers of microcirculation status (both of them are altered in the coagulopathy concomitant with sepsis during the acute phase of sepsis), were also

analyzed. Leukocyte and PMNs values were assessed as indexes of sepsis severity. Hematocrit, hemoglobin, erythrocytes, and calcium, were also measured.

### *Statistical analysis*

All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed by unpaired one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni as post-hoc test. Statistical analyses were done using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

### *Clock genes expression*

To analyze whether sepsis affects the peripheral clock, the expression of clock genes was done in blood samples of the subjects of study at 08:00, 13:00, 18:00, and 23:00 hours (Figure 1). Healthy volunteers and control patients showed a peak in *bmal1* expression at 18:00 hr, although the levels of *bmal1* expression were significantly higher in the latter (Figure 1A). The rhythm of *bmal1* was blunted in acute septic patients (SP.A) and in recovered septic patients (SP.R) patients. Regarding *clock* gene expression (Figure 1B), there were not significant rhythm detected, and the levels of *clock* were significant higher in healthy volunteers and control patients than in septic patients. The expression of *per2* peak at 23:00 hr in healthy volunteers and control patients, with the levels of *per2* in control patients significantly higher than in healthy volunteers subjects (Figure 2C). Septic patients showed few changes in the daily levels of *per2*. The expression of *cry1* in healthy volunteers and control groups had a peak at 23:00 hr, although in this case, the levels of *cry1* in healthy volunteers subjects were

significantly higher than in control patients (Figure 1D). Acute septic patients and recovered septic patients had a parallel changes in *cry1* expression along the time, trending to increase at 23:00 hr.

#### *Levels of pro- and anti-inflammatory cytokines*

To analyze the role of the innate immunity in the evolution of the patients, plasma pro- and anti-inflammatory cytokines were measured (Figure 2). IL-1 $\beta$  was higher in control patients than in healthy volunteers, and sepsis further enhanced its levels (Figure 2A); after recovery of sepsis, the levels of IL-1 $\beta$  decreased to the normal range found in healthy volunteers. TNF $\alpha$  showed lower levels in control patients than in healthy volunteers; sepsis produced a further increase in its levels, which were reduced in patients recovered from sepsis (Figure 2B). IL-6 was also higher in control patients than in healthy volunteers, and sepsis further increased its levels (Figure 2C); the levels of IL-6 returned to control in patients recovered from sepsis. Likewise, IL-8 increases in control and septic patients compared with healthy volunteers, and then it decreased in patients recovered from sepsis (Figure 2D). The anti-inflammatory cytokine IL-10 was elevated in control and septic patients, decreasing its levels in patients recovered from sepsis (Figure 2E). In all cases, the levels of the cytokines were higher in acute septic patients than in the other groups.

#### *Oxidative damage to lipids and proteins in plasma*

The presence of oxidative stress in septic patients was analyzed. Two markers of oxidative damage to macromolecules in plasma, i.e., lipid peroxidation, LPO, and advanced oxidation protein products, AOPP, were measured. Whereas the former typically reflects the degree of oxidative damage to membrane lipids and, thus, the degree of cell membrane damage [25], AOPP reflect not only oxidative damage to

proteins but also constitute novel mediators of inflammation and monocyte activation [26]. The results, depicted in the Figure 4, suggest that, although LPO was elevated in control patients compared with healthy volunteers subjects, its levels increased much more significantly in septic patients, decreasing to control values after their recovery (Figure 3A). A similar behaviour was detected in AOPP levels, with a significant increase in sepsis, and further reduction after sepsis recovery (Figure 3B).

#### *Urinary excretion of 6-SM*

To gain insights into the function of the circadian system and its relationship with the evolution of the septic patients, the urinary excretion of 6-SM was assessed (Figure 4). Urinary 6-SM levels were lower in control patients than in healthy volunteers. In septic patients, the levels of 6-SM in acute septic patients increased significantly compared with both healthy volunteers and control groups. After recovery of sepsis, there was an important further increase in the excretion of 6-SM, reaching the highest values at this time.

#### *Correlation analysis between 6-SM and markers of inflammation*

Regression analysis between urinary 6-SM excretion and cytokines is shown in the Figure 5. No significant correlations were found between 6-SM and IL-6, TNF $\alpha$ , LPO, or AOPP in healthy volunteers (Figure 5A-D). Significant positive correlation was found between 6-SM and IL-6 and TNF $\alpha$  at the moment of sepsis (Figure 5E-F). Patients recovered from sepsis lost the correlation between 6-SM and IL-6, and reduced the significance of the correlation between 6-SM and TNF $\alpha$  (Figure 5I,J). After recovery of sepsis, patients showed a negative correlation between 6-SM, LPO, and AOPP (Figure 5K,L), whereas no correlation was found in sepsis (Figure 5G,H).

### *Hematological and biochemical data*

Routine analysis of main hematological and biochemical data was carried out in the subjects of the study (Table 1). Hemoglobin and hematocrit were lower in control and septic patients than in controls. Leukocytes increased in acute septic patients' group, whereas the proportion of PMN cells enhanced in all groups. Glucose increased in control and acute septic patients compared with healthy volunteers, recovering normal values in recovered septic patients. Bun, creatinine, sodium and potassium did not change significantly in any group, whereas calcium decreased in all groups of patients. Total bilirubin, AST, and ALT showed minor changes, and lactate increased in acute septic patients, decreasing in patients recovered from sepsis. Prothrombin decreased and fibrinogen increased in control and septic patients compared with controls, and their remained elevated in patients recovered from sepsis. Septic patients also showed high levels of procalcitonin that decreased after their recover from sepsis.

### *Clinical scores of the patients*

Table 2 shows the different scores used for evaluating the severity of the septic condition in the patients studied. SAPS, the simplified acute physiology score, and SOFA, which describes the organ dysfunction/failure, which were elevated in septic patients compared with healthy volunteers, decreasing after recovery of sepsis. Glasgow score decreased in septic patients compared healthy volunteers, and it was normalized in recovered septic patients. PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> and cVSO<sub>2</sub> did no change significantly. Doses of norepinephrine administrated to septic patients are also indicated. Minor changes were observed in systolic and diastolic blood pressures, heart rate, and respiratory rate. Nocturnal urine volume production higher in recovered septic group.

### *Correlation analysis between 6-SM and markers of clinical outcome*

Regression analysis between 6-sulfatoxymelatonin excretion and clinical parameters that changed significantly along the study is shown in Figure 6. Healthy volunteers did not show significant correlation between 6-SM and procalcitonin levels (Figure 6A). Procalcitonin and 6-sulfatoxymelatonin were positively correlated in control and acute septic patients (Figure 6B-C), and inversely correlated in recovered septic patients (Figure 6D). A significant negative correlation between SOFA and 6-sulfatoxymelatonin was found in control, acute septic, and recovered septic groups of patients (Figure 6E-G).

### **Discussion**

A main discovery of this study is the relationship between the alteration in the expression of clock genes and the degree of inflammation, a result supported because control patients had less inflammation and less chronodisruption than the septic ones. Also, the negative correlation between 6-SM and SOFA, the shift from positive to negative correlation between 6-SM and procalcitonin, and the negative correlation between 6-SM, LPO and AOPP at the time of sepsis recovery, support the compensatory response of melatonin against the septic process. These data were further sustained by the presence of highest levels of 6-SM in recovered septic patients. Of interest is that, in addition to light, other factors affect melatonin production because control and septic patients, who were under the same light schedule, had different 6-SM levels.

We analyzed the changes in the daily expression of the clock genes *bmal1*, *clock*, *per2*, and *cry1*. Although some authors did not find major circadian changes in clock genes in

blood [27], our data shows daily changes in *bmal1* with maximal expression at 18:00 hr, without circadian changes in clock, whereas *per2* and *cry1* peak several hour later [28; 29]. In agreement with recent data, our results also showed higher levels of *per2* expression in non-septic (CP) than in septic patients [12]. Thus, the reduction of *bmal1* expression here found, together with the subsequent decrease in *per2* and *cry1*, can favor the NF- $\kappa$ B-dependent inflammatory response in septic patients [11; 20; 21]. In turn, the acute inflammatory process may disrupt the molecular clock, with IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  suppressing the transcriptional activity of BMAL1/CLOCK [30].

With these data in mind, it can be suggested that an acute bacterial infection may act first to repress clock genes, which further favor the systemic inflammation, supporting a negative effect of the latter on the clock [12; 31]. This hypothesis is supported because control patients developed significant less inflammation than septic patients, and the inflammatory condition in control patients was insufficient to repress the molecular clock. In fact, IL-6, a cytokine related to acute phase of inflammation stimulating T and B lymphocytes, and IL-8, which is related to neutrophils mobilization, were significantly lower in control than in septic patients. These findings, and the enhanced rhythm and expression of clock genes in control patients could be a compensatory response to control inflammation. So, control patients could maintain circadian clock rhythm [32]. In addition, it would appear that the chronic disruption of the molecular clock imposed by the environmental conditions in the ICUs was not a primary event for chronodisruption, because control patients and septic patients were under the same light schedule. Of note, the rhythm of clock genes does not return to normally in patients recovered from sepsis, probably because the inflammation is not fully controlled at this time, a finding supported by the levels of IL-8 and TNF $\alpha$  above controls in these



patients [33]. IL-10, which is associated with anti-inflammatory functions by inhibiting cytokine synthesis, was elevated in all groups compared to healthy subjects, and it remained elevated in patients recovered from sepsis, suggesting the persistence of this compensatory mechanism beyond the end of the inflammatory status. Overall, the cytokine changes are compatible with the inhibition of the NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome cascade activation in recovered septic patients, a finding also related to the inhibitory effect of melatonin on the innate immunity both in experimental and clinical conditions [16; 17; 34-36].

Oxidative stress runs parallel to inflammation, and it increased from control to acute septic patients, returning to normal values in recovered septic patients, compared with healthy volunteers. LPO reflect the damage to membrane lipids [25], and AOPP is a marker of oxidative damage to plasma proteins [37]. The changes on LPO and AOPP support the enhanced tissue injury during sepsis. But AOPP is also related to inflammation and monocyte activation in chronic renal failure, [26] and we showed here for the first time that AOPP also correlates well with the course of sepsis, doing it a feasible marker for improvement of sepsis.

The relation of melatonin with sepsis comes from many years ago. Our group demonstrated by the first time the efficacy of melatonin against sepsis in 1999 [34]. The increased melatonin production is compatible with a loss of its circadian rhythm elsewhere reported, probably due to the chronodisruption observed in critically ill patients [8; 10]. Since NF- $\kappa$ B induces the production of melatonin, it is reasonable that during sepsis, both pineal and extrapineal tissues, mainly immunocompetent cells, produce more melatonin for protective purposes [38; 39]. Since NF- $\kappa$ B induces the

production of melatonin, it is reasonable that during sepsis, pineal and extrapineal tissues, mainly immunocompetent cells produce more melatonin for protective purposes [40; 41]. This explains the positive correlation between 6-SM with IL-6 and TNF $\alpha$  during sepsis. Other researchers suggested that melatonin at night had not effect to ameliorate human endotoxemia [42], or even had a role in sepsis mortality in severe septic patients [43], a report rebutted by the authors [44]. In contrast, experimental models of endotoxemia support the high efficiency of melatonin to blunt the NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome connection, normalization of the mitochondrial function in sepsis, and recovering animals from septic shock and multiorgan failure [14; 16; 17; 45; 46]. The data support the pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock [35]. Moreover, clinical studies have demonstrated the utility of melatonin therapy in septic patients [36]. Finally, the negative correlation between 6-SM, LPO and AOPP seen in patients recovered from sepsis supports the antioxidant role of melatonin able to restore the redox conditions in these patients.

Biochemical data showed a prothrombin enhancement in recovered septic patients, suggesting an improvement in vascular coagulation. Procalcitonin displayed a significant increase in acute septic patients, returning to basal levels in recovered septic patients. Both parameters fit well the evolution of sepsis towards a better clinical condition. SAPS III, SOFA, PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub>, and Glasgow assessed clinical evolution of the septic subjects, and all of them reflected that all were recovered from sepsis, whereas control patients had minimal changes in these scores. These scores correlated with 6-SM. Our data showed a negative correlation between SOFA and 6-SM in the control and sepsis. In the case of procalcitonin, we found a positive correlation between its levels and 6-SM in the control and septic groups, which becomes in a negative

correlation in recovered septic patients. Together, these data suggesting an association of high levels of melatonin with lower critical condition of the patients.

In summary, the results of this study support the existence of a major chronodisruption process during sepsis accompanied by a significant increase in the urinary excretion of 6-SM. These changes suggest modifications in the normal function of the biological clock, that is probably affected by inflammatory mediators during sepsis [12]. The degree of clock disruption, including *bmal1* and *per2*, parallels with the severity of the inflammatory process. The changing levels 6-SM and their correlation with markers of inflammation, oxidative stress and clinical outcome, may also support a beneficial effect of the endogenous melatonin response during the septic course. The present study has undoubtedly some limitations, one of which is the lack of analysis of clock genes expression during the night to analyze further phase alterations of the rhythm. Ethical issues of the Hospital limited the study to the conditions here reported.

## **Acknowledgments**

We are indebted to the physicians and nurses of the ICU of the Canary Island's University Hospital for their collaboration in the collection of data and blood samples.

## **References**

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, et al.: The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315:801-810, 2016.
2. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, Angus DC, Rubenfeld GD, Singer M & Sepsis Definitions Task F: Developing a New

- Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315:775-787, 2016.
3. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, Rubenfeld G, Kahn JM, Shankar-Hari M, Singer M, et al.: Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315:762-774, 2016.
  4. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J & Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29:1303-1310, 2001.
  5. Dellinger RP: Cardiovascular management of septic shock. *Crit Care Med* 31:946-955, 2003.
  6. Martin GS, Mannino DM, Eaton S & Moss M: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348:1546-1554, 2003.
  7. Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, Francois B, Martin-Loeches I, Lipman J, Reinhart K, Antonelli M, Pickkers P, Njimi H, et al.: Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med* 2:380-386, 2014.
  8. Mundigler G, Delle-Karth G, Koreny M, Zehetgruber M, Steindl-Munda P, Marktl W, Ferti L & Siostrzonek P: Impaired circadian rhythm of melatonin secretion in sedated critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 30:536-540, 2002.
  9. Li CX, Liang DD, Xie GH, Cheng BL, Chen QX, Wu SJ, Wang JL, Cho W & Fang XM: Altered melatonin secretion and circadian gene expression with increased proinflammatory cytokine expression in early-stage sepsis patients. *Mol Med Rep* 7:1117-1122, 2013.
  10. Verceles AC, Silhan L, Terrin M, Netzer G, Shanholtz C & Scharf SM: Circadian rhythm disruption in severe sepsis: the effect of ambient light on urinary 6-sulfatoxymelatonin secretion. *Intensive Care Med* 38:804-810, 2012.
  11. Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P & O'Neill LA: Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* 40:178-186, 2014.
  12. Coiffard B, Diallo AB, Cilver A, Mezouar S, Hammad E, Vigne C, Nicolino-Nrunet C, Dignat-George F, Baumstarck K, Boucekine M, et al. (2019) Circadian rhythm disruption and sepsis in severe trauma patients. In *Shock*
  13. Crespo E, Macias M, Pozo D, Escames G, Martin M, Vives F, Guerrero JM & Acuña-Castroviejo D: 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, 1999.
  14. Escames G, Lopez L, Tapias V, Utrilla P, Reiter R, Hitos A, Leon J, Rodriguez M & Acuna-Castroviejo D: Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res* 40:71-78, 2006.
  15. Escames G, Lopez LC, Ortiz F, Ros E & Acuna-Castroviejo D: Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: Effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol* 41:1165-1173, 2006.
  16. Garcia JA, Volt H, Venegas C, Doerrier C, Escames G, Lopez LC & Acuna-Castroviejo D: Disruption of the NF-kappa B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor-alpha and blocks the septic response in mice. *FASEB J.* 29:3863-3875, 2015.
  17. Volt H, Garcia JA, Doerrier C, Diaz-Casado ME, Guerra-Librero A, Lopez LC, Escames G, Tresguerres JA & Acuna-Castroviejo D: Same molecule but different

expression: aging and sepsis trigger NLRP3 inflammasome activation, a target of melatonin. *J Pineal Res* 60:193-205, 2016.

18. Spengler ML, Kuropatwinski KK, Comas M, Gasparian AV, Fedtsova N, Gleiberman AS, Gitlin, Ii, Artemicheva NM, Deluca KA, Gudkov AV, et al.: Core circadian protein CLOCK is a positive regulator of NF-kappaB-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E2457-2465, 2012.

19. Gibbs JE, Blaikley J, Beesley S, Matthews L, Simpson KD, Boyce SH, Farrow SN, Else KJ, Singh D, Ray DW, et al.: The nuclear receptor REV-ERBalpha mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:582-587, 2012.

20. Liu J, Malkani G, Shi X, Meyer M, Cunningham-Runddles S, Ma X & Sun ZS: The circadian clock Period 2 gene regulates gamma interferon production of NK cells in host response to lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *Infect Immun* 74:4750-4756, 2006.

21. Narasimamurthy R, Hatori M, Nayak SK, Liu F, Panda S & Verma IM: Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:12662-12667, 2012.

22. Cela O, Scrima R, Pazienza V, Merla G, Benegiamo G, Augello B, Fugetto S, Menga M, Rubino R, Fuhr L, et al.: Clock genes-dependent acetylation of complex I sets rhythmic activity of mitochondrial OxPhos. *Biochim Biophys Acta* 1863:596-606, 2016.

23. Prkno A, Wacker C, Brunkhorst FM & Schlattmann P: Procalcitonin-guided therapy in intensive care unit patients with severe sepsis and septic shock--a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 17:R291, 2013.

24. Westwood M, Ramaekers B, Whiting P, Tomini F, Joore M, Armstrong N, Ryder S, Stirk L, Severens J & Kleijnen J: Procalcitonin testing to guide antibiotic therapy for the treatment of sepsis in intensive care settings and for suspected bacterial infection in emergency department settings: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess* 19:v-xxv, 1-236, 2015.

25. Esterbauer H & Cheeseman KH: Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186:407-421, 1990.

26. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drueke T & Descamps-Latscha B: Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 161:2524-2532, 1998.

27. Angelousi A, Nasiri-Ansari N, Spilioti E, Mantzou E, Kalotyrou V, Chrousos G, Kaltsas G & Kassi E: Altered expression of circadian clock genes in polyglandular autoimmune syndrome type III. *Endocrine* 59:109-119, 2018.

28. Lech K, Ackermann K, Revell VL, Lao O, Skene DJ & Kayser M: Dissecting Daily and Circadian Expression Rhythms of Clock-Controlled Genes in Human Blood. *J Biol Rhythms* 31:68-81, 2016.

29. Cuesta M, Cermakian N & Boivin DB: Glucocorticoids entrain molecular clock components in human peripheral cells. *FASEB J* 29:1360-1370, 2015.

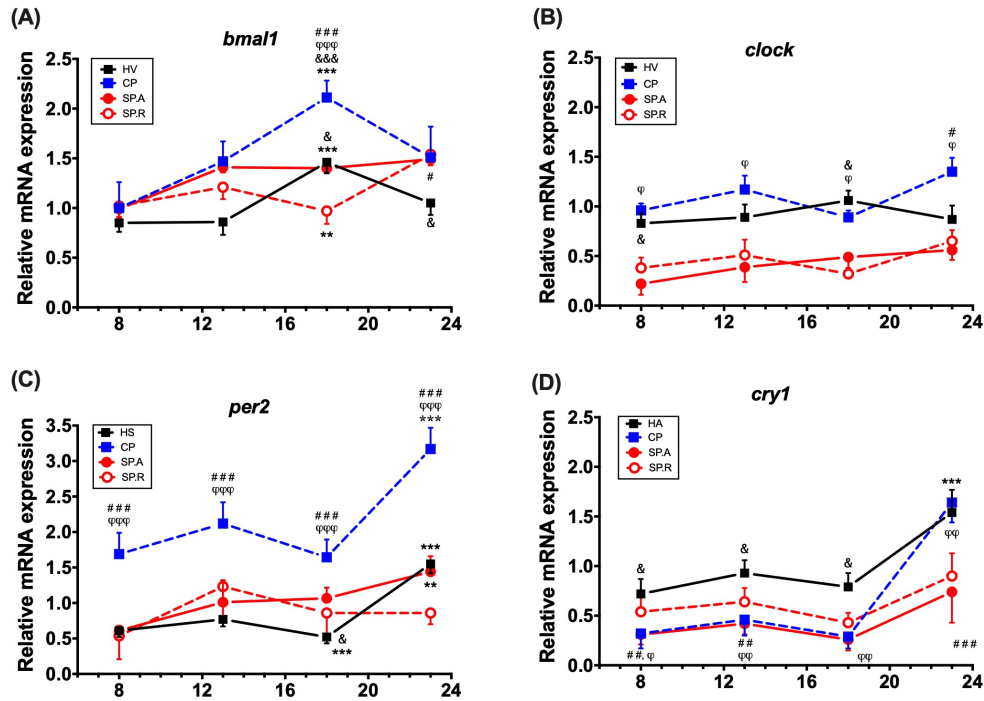
30. Okada K, Yano M, Doki Y, Azama T, Iwanaga H, Miki H, Nakayama M, Miyata H, Takiguchi S, Fujiwara Y, et al.: Injection of LPS causes transient suppression of biological clock genes in rats. *J Surg Res* 145:5-12, 2008.

31. Castanon-Cervantes O, Wu M, Ehlen JC, Paul K, Gamble KL, Johnson RL, Besing RC, Menaker M, Gewirtz AT & Davidson AJ: Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption. *J Immunol* 185:5796-5805, 2010.

32. Elliott R & Nathaney A: Typical sleep patterns are absent in mechanically ventilated patients and their circadian melatonin rhythm is evident but the timing is altered by the ICU environment. *Aust Crit Care* 27:151-153, 2014.
33. Gay PC: Sleep and sleep-disordered breathing in the hospitalized patient. *Respir Care* 55:1240-1254, 2010.
34. Crespo E, Macias M, Pozo D, Escames G, Martin M, Vives F, Guerrero J & Acuna-Castroviejo D: 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 Journal* 13:1537-1546, 1999.
35. Escames G, Acuña-Castroviejo D, López LC, Tan DX, Maldonado MD, Sánchez-Hidalgo M, León J & Reiter RJ (2006) Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock. In *J Pharm Pharmacol. Polonia*. pp 1153-1165
36. Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, Tan DX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, Cordaro S, Corona G, Trimarchi G & Barberi I: Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res* 50:756-760, 2001.
37. Witko-Sarsat V, Nguyen Khoa T, Jungers P, Druke T & Descamps-Latscha B: Advanced oxidation protein products: oxidative stress markers and mediators of inflammation in uremia. *Adv Nephrol Necker Hosp* 28:321-341, 1998.
38. Venegas C, Garcia JA, Escames G, Ortiz F, Lopez A, Doerrier C, Garcia-Corzo L, Lopez LC, Reiter RJ & Acuña-Castroviejo D: Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal. Res.* 52:217-227, 2012.
39. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Diaz-Casado ME, Lima-Cabello E, Lopez LC, Rosales-Corral S, Tan DX & Reiter RJ: Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci* 71:2997-3025, 2014.
40. Markus RP, Cecon E & Pires-Lapa MA: Immune-pineal axis: nuclear factor kappaB (NF-kB) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. *Int J Mol Sci* 14:10979-10997, 2013.
41. Muxel SM, Laranjeira-Silva MF, Carvalho-Sousa CE, Floeter-Winter LM & Markus RP: The RelA/cRel nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) dimer, crucial for inflammation resolution, mediates the transcription of the key enzyme in melatonin synthesis in RAW 264.7 macrophages. *J Pineal Res* 60:394-404, 2016.
42. Lorente L, Martin MM, Abreu-Gonzalez P, De La Cruz T, Ferreres J, Sole-Violan J, Labarta L, Diaz C, Jimenez A & Borreguero-Leon JM: Serum melatonin levels are associated with mortality in severe septic patients. *J Crit Care* 30:860 e861-866, 2015.
43. Alamili M, Bendtzen K, Lykkesfeldt J, Rosenberg J & Gogenur I: Effect of melatonin on human nighttime endotoxaemia: randomized, double-blinded, cross-over study. *In Vivo* 28:1057-1063, 2014.
44. Acuna-Castroviejo D & Bueno-Larano P: Comment on "Serum melatonin levels are associated with mortality in severe septic patients" by Lorente et al., *J Crit Care* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2015.03.023>. *J Crit Care* 30:1133, 2015.
45. Escames G, Lopez LC, Ortiz F, Lopez A, Garcia JA, Ros E & Acuña-Castroviejo D: Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J.* 274:2135-2147, 2007.
46. Ortiz F, Garcia JA, Acuna-Castroviejo D, Doerrier C, Lopez A, Venegas C, Volt H, Luna-Sanchez M, Lopez LC & Escames G: The beneficial effects of melatonin against heart mitochondrial impairment during sepsis: inhibition of iNOS and preservation of nNOS. *J. Pineal Res.* 56:71-81, 2014.

34. Acuña Castroviejo D, Rahim I, Acuña-Fernández C, Fernández-Ortiz M, Solera-Martín J, Sayed RKA, Díaz-Casado ME, Rusanova I, López LC & Escames G. Melatonin, clock genes and mitochondria in sepsis. *Cell Mol Life Sci* 74:3965-3987, 2017.

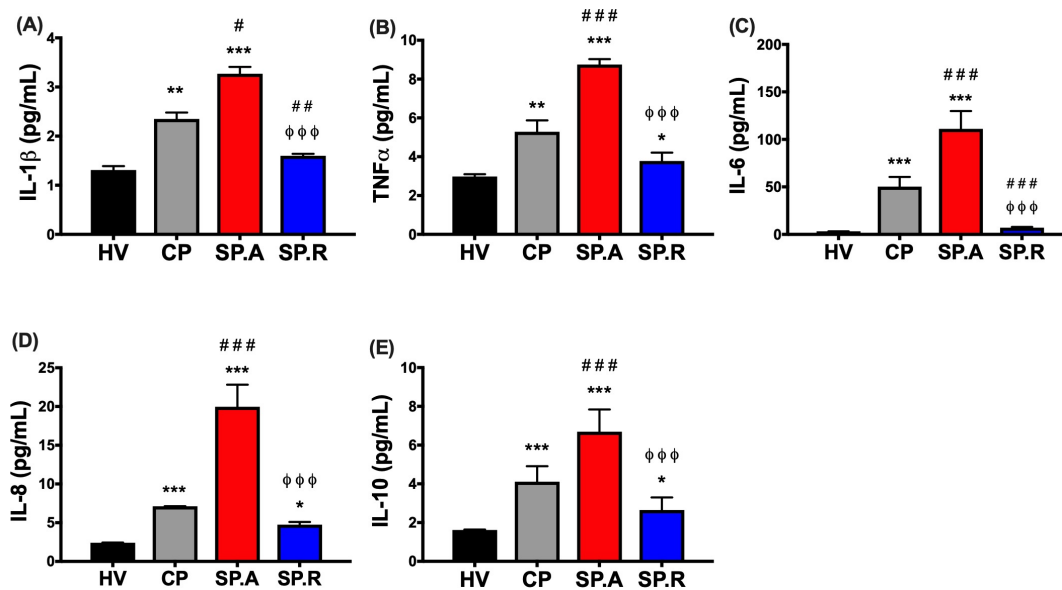
## Figures



**Figure 1: Daily expression of clock genes.**

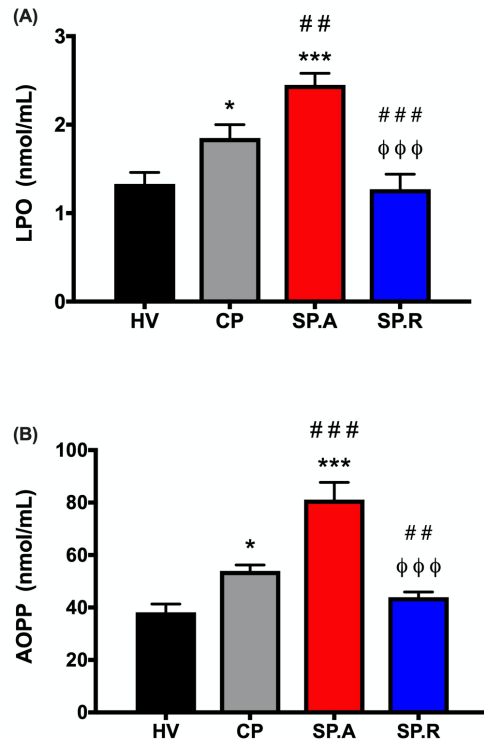
The relative mRNA expression of *Bmal1* (A), *clock* (B), *per2* (C), and *cry1* (D), was analyzed in total blood obtained from the subjects of study at 08:00, 13:00, 18:00, and 23:00 hours. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. HV = healthy volunteers; CP = control patients; SP.A = patients at the acute phase of sepsis; SP.R = patients recovered from sepsis. \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. other time points for each gen; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.05$ , and ### $p < 0.001$  vs. HV; & $p < 0.05$  vs. SP.A;  $\Phi p < .05$ ,  $\Phi\Phi p < 0.01$ , and  $\Phi\Phi\Phi p < 0.001$  vs. SP.R.





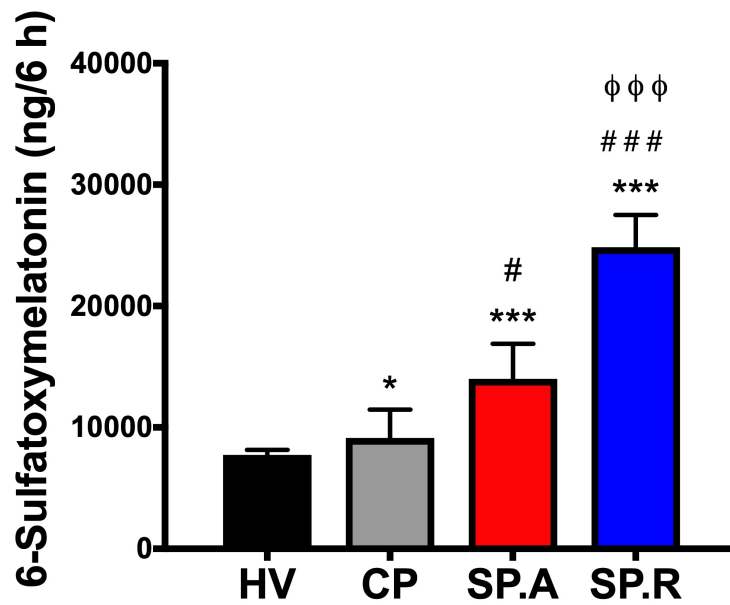
**Figure 2: Changes in pro- and anti-inflammatory cytokines levels in the studied groups compared with the levels in healthy volunteers (HV).**

Cytokines were measured in plasma by a multiplex system. Pro-inflammatory IL-1β (A), TNFα (B), IL-6 (C), IL-8 (D) cytokines, and IL-10 (E) anti-inflammatory cytokine, are shown. Data are expressed as means ± S.E.M. HV = healthy subjects; CP = control patients; SP.A = patients at the acute phase of sepsis; SP.R = patients recovered from sepsis. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. HV; # $P < 0.05$ , ### $P < 0.05$ , and ### $P < 0.001$  vs. CP; ΦΦΦ $P < 0.001$  vs. SP.A.



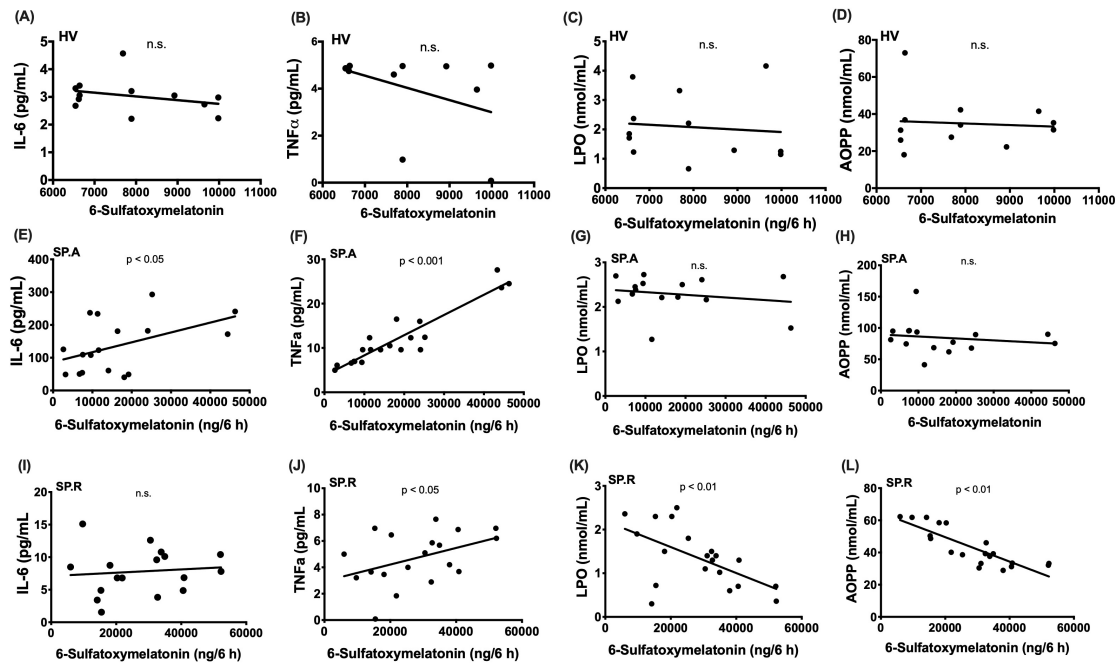
**Figure 3. Plasma levels of LPO and AOPP in the studied groups.**

LPO (A) was used as an index of lipid peroxidation, and AOPP (B) as an index of protein oxidation and also inflammation. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. HV = healthy subjects; CP = control patients; SP.A = patients at the acute phase of sepsis; SP.R = patients recovered from sepsis. \* $P < 0.05$ , and \*\*\* $P < 0.001$  vs. HV; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , and ### $P < 0.001$  vs. CP; φφφ $P < 0.001$  vs. SP.A.



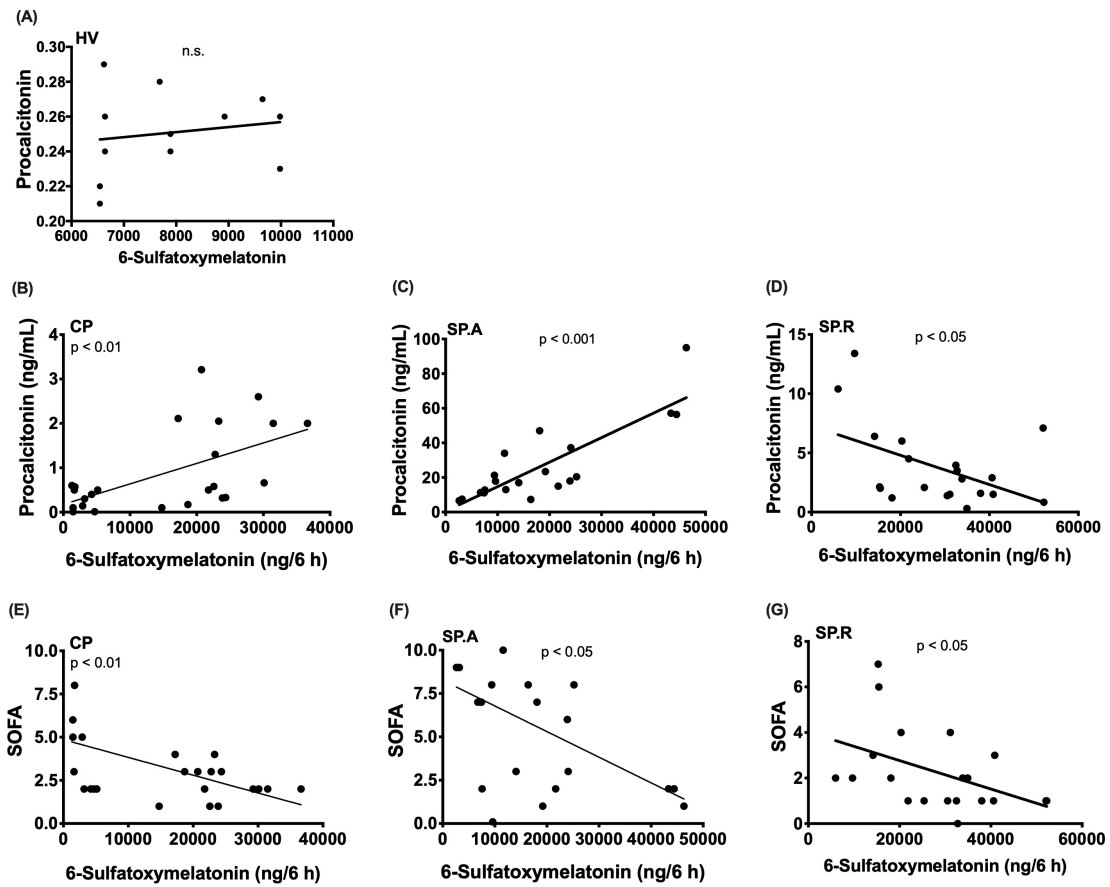
**Figure 4: Urinary excretion of 6-sulfatoxymelatonin in the studied groups.**

Nocturnal urine was collected, its total volume for a period of 6 hours noted, and one aliquot was used for the determination of the melatonin metabolite. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. HV = healthy subjects; CP = control patients; SP.A = patients at the acute phase of sepsis; SP.R = patients recovered from sepsis. \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  vs. HV; # $P < 0.05$ , and ### $P < 0.001$  vs. CP;  $\Phi\Phi\Phi P < 0.001$  vs. SP.A.



**Figure 5: Correlation analysis between 6-sulfatoxymelatonin and markers of inflammation and oxidative stress.**

Regression analysis was performed between the urinary excretion of 6-sulfatoxymelatonin and IL-6, TNF $\alpha$ , LPO, and AOPP in HV (A-D), SP.A (E-H) and SP.R (I-L) patients. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. HV = healthy subjects; CP = control patients; SP.A = patients at the acute phase of sepsis; SP.R = patients recovered from sepsis.



**Figure 6: Correlation analysis between 6-sulfatoxymelatonin and markers of clinical outcome of the patients.**

Regression analysis was performed between the urinary excretion of 6-sulfatoxymelatonin and procalcitonin and SOFA in HV (A), CP (B,E), SP.A (C, F), and SP.R (D, G) patients. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. HV = healthy subjects; CP = control patients; SP.A = patients at the acute phase of sepsis; SP.R = patients after recovery of their septic process.

**Table 1.** Hematological and biochemical data of the studied groups

Parameter	HV	CP	SP.A	SP.R
Hemoglobin, g/dL	15.35 ± 0.56	10.93 ± 0.38***	10.55 ± 0.49***	8.77 ± 0.46***.#
Hematocrit, %	45.0 ± 1.12	30.50 ± 1.48***	31.99 ± 1.43***	29.92 ± 0.72***
Leukocytes, x10 <sup>3</sup> /μL	7.05 ± 1.28	10.49 ± 1.14	15.63 ± 2.52**	11.86 ± 2.13
Neutrophils, %	55.68 ± 3.25	78.44 ± 2.06***	86.95 ± 1.40***	81.74 ± 1.68***
Glucose, mg/dL	95.54 ± 6.50	152.05 ± 7.35***	128.09 ± 10.64*	108.85 ± 5.54 <sup>#</sup>
Bun, mg/dL	30.12 ± 3.26	19.91 ± 5.45	20.79 ± 2.76	21.08 ± 4.01
Creatinine, mg/dL	0.93 ± 0.13	0.72 ± 0.12	0.71 ± 0.14	0.58 ± 0.05
Sodium, mEq/L	141.24 ± 0.92	139.47 ± 0.74	139.72 ± 1.07	138.97 ± 1.07
Potassium, mEq/L	4.3 ± 0.08	4.03 ± 0.11	4.14 ± 0.10	3.94 ± 0.08
Calcium, mg/dL	9.7 ± 0.11	7.65 ± 0.10***	7.57 ± 0.16***	7.72 ± 0.10***
Total bilirubin, mg/dL	0.75 ± 0.10	0.73 ± 0.13	0.91 ± 0.14 <sup>#</sup>	0.64 ± 0.11
GOT (AST), UI/L	30.08 ± 3.50	33.06 ± 9.40	33.13 ± 3.88 <sup>#</sup>	30.29 ± 4.57
GPT (ALT), UI/L	26.07 ± 4.23	39.03 ± 5.95	28.84 ± 3.60 <sup>#</sup>	30.12 ± 3.75
Lactate, mg/dL	1.55 ± 0.14	1.31 ± 0.13	2.31 ± 0.38 <sup>##</sup>	0.92 ± 0.12 <sup>Φ</sup>
Prothrombin, %	100.00 ± 2.22	76.01 ± 2.87***	74.57 ± 3.06***	82.99 ± 3.21**. <sup>Φ</sup>
Fibrinogen, mg/dL	275.36 ± 28.51	544.14 ± 36.85***	662.92 ± 46.56***	680.45 ± 52.60***
Procalcitonin, ng/mL	0.26 ± 0.08	0.30 ± 0.19	14.96 ± 2.17***.###	2.56 ± 0.73***. <sup>ΦΦΦ</sup>

HV, healthy volunteers; CP, control patients; SP.A, acute phase of septic patients; SP.R, recovery phase of septic patients; PMN, polymorphonuclear leukocytes; GOT (AST), aspartate aminotransferase; GPT (ALT), alanine aminotransferase. \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  vs. HS; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , and ### $P < 0.001$  vs. CP; <sup>Φ</sup> $P < 0.05$ , and <sup>ΦΦΦ</sup> $P < 0.001$  vs. SP.B.

**Table 2.** Clinical data of the studied groups

Parameter	HV	CP	SP.A	SP.R
SAPS	---	58.59 ± 2.48	79.95 ± 8.31 <sup>#</sup>	---
SOFA	---	2.61 ± 0.46	6.10 ± 1.16 <sup>###</sup>	2.25 ± 0.39 <sup>ΦΦ</sup>
Glasgow	15.00	15.00	10.79 ± 1.03 <sup>***,###</sup>	14.91 ± 1.07 <sup>ΦΦΦ</sup>
Fever, °C	36.72 ± 0.06	36.06 ± 0.05 <sup>*</sup>	37.06 ± 0.23 <sup>###</sup>	36.39 ± 0.30
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	---	291.06 ± 10.70	293.40 ± 31.89	301.31 ± 11.05
cVSO <sub>2</sub> (%)	---	72.20 ± 7.70	75.89 ± 8.00	71.58 ± 6.93
NE, µg/kg/min	0	0	0.53 ± 0.08 <sup>#</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>ΦΦΦ</sup>
SBP, mm Hg	120.50 ± 5.30	122.75 ± 4.44	103.30 ± 2.79 <sup>*,#</sup>	113.41 ± 6.79 <sup>*,#</sup>
DBP, mm Hg	70.44 ± 3.60	69.70 ± 4.03	58.86 ± 1.88 <sup>#</sup>	67.06 ± 1.41
HR, bpm	72.36 ± 6.50	89.52 ± 6.74	90.83 ± 6.11 <sup>#</sup>	84.20 ± 2.68
RR, bpm	16.51 ± 0.001	13.25 ± 0.36	14.49 ± 1.34	14.20 ± 1.99
Urine volume, mL/10 h	450.30 ± 60.61	515.96 ± 80.53	534.61 ± 63.98	832.82 ± 58.98 <sup>***,ΦΦ</sup>

HV, healthy volunteers; CP, control patients; SP.A, acute phase of septic patients; SP.R, recovery phase of septic patients; SAPS, simplified acute physiologic score; SOFA, sequential organ failure assessment; PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, Kirby's index; cVSO<sub>2</sub> central venous oxygen saturation; NE, norepinephrine dose; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HR, heart rate; RR, respiratory rate. <sup>\*</sup>*P* < 0.05, and <sup>\*\*\*</sup>*p* < 0.001 vs. HS; <sup>#</sup>*P* < 0.05, and <sup>###</sup>*P* < 0.001 vs. CP; <sup>ΦΦ</sup> *P* < 0.01, and <sup>ΦΦΦ</sup> *P* < 0.001 vs. SP.B.

Table S1. List of primer sequences used for clock genes PCR determination

Target gene	Primer Forward	Primer Reverse
Bmal1	ATCCTCAACTACAGCCAGAATG	TCGTGCTCCAGAACATAATCG
Clock	ACGACGAGAACTTGGCATTG	TCCGAGAAGAGGCAGAAGG
Per-2	CCCTTCCGCATGACGCCCTACCTG	GACCGCCCTTTCATCCACATCCTG
Cry1	GCTTGCTTCCTGACACGAG	GACAGCCACATCCAACCTCC
GAPDH	GTACTACACTGAATTCACCCCCACTG	TGCGGCATCTTCAAACCTCCAT