

GRUPO DE INVESTIGACIÓN CTS-101: COMUNICACIÓN INTERCELULAR
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
PARQUE TECNOLÓGICO DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA



**MECANISMOS MOLECULARES DE LA
ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LA
MELATONINA: PARTICIPACIÓN DEL
RECEPTOR NUCLEAR ROR α**

**HUAYQUI SOL VOLT VALDIVIA
TESIS DOCTORAL**

Programa de Doctorado en Biomedicina

Granada, 2016

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Huayqui Sol Volt Valdivia

ISBN: 978-84-9125-723-3

URI: <http://hdl.handle.net/10481/43487>

El doctorando **Huayqui Sol Volt Valdivia** y los directores de la tesis **Dr. Darío Acuña Castroviejo, Dra. Germaine Escames y Dr. Luis Carlos López** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 7 de Enero de 2016

Director/es de la Tesis

Handwritten signature of Darío Acuña Castroviejo, consisting of the letters 'D. AWW' in a stylized, bold font with a horizontal line underneath.

Fdo.: Darío Acuña Castroviejo

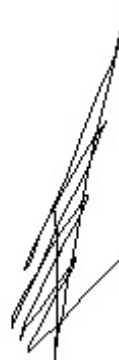
Handwritten signature of Germaine Escames, a cursive signature with a horizontal line underneath.

Fdo.: Germaine Escames

Handwritten signature of Luis Carlos López, a signature with a circular flourish and a horizontal line underneath.

Fdo.: Luis Carlos López

Doctorando

Handwritten signature of Huayqui Sol Volt Valdivia, a signature with a vertical line and a horizontal line intersecting it.

Fdo.: Huayqui Sol Volt Valdivia

MECANISMOS MOLECULARES DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LA MELATONINA: PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR NUCLEAR ROR α

Memoria que presenta el licenciado en Biología

D. Huayqui Sol Volt Valdivia

como aspirante al grado de Doctor

Fdo: **Huayqui Sol Volt Valdivia**

Vº Bº de los Directores de la Tesis Doctoral

Fdo: Dr. Darío Acuña Castroviejo
Doctor en Medicina
Catedrático de Fisiología de la UGR

Fdo: Dr. Luis Carlos López
Doctor en Biología
Investigador Ramón y Cajal

Fdo: Dra. Germaine Escames
Doctora en Farmacia
Prof. Titular de Fisiología de la UGR

Universidad de Granada

2016

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

CERTIFICA QUE D^o. **Huayqui Sol Volt Valdivia**, Licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección, el trabajo titulado **“Mecanismos moleculares de la actividad antiinflamatoria de la melatonina: Participación del receptor nuclear RORalfa”** reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 07 de Enero de 2016

V^o B^o Director

Handwritten signature of D. Acuña, consisting of the letters 'D. AWW' in a stylized, cursive script, underlined.

Darío Acuña Castroviejo

El interesado

Handwritten signature of Huayqui Sol Volt Valdivia, consisting of several overlapping, diagonal lines forming a scribbled shape.

Huayqui Sol Volt Valdivia

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

CERTIFICA QUE D^o. **Huayqui Sol Volt Valdivia**, Licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección, el trabajo titulado **“Mecanismos moleculares de la actividad antiinflamatoria de la melatonina: Participación del receptor nuclear RORalfa”** reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 07 de Enero de 2016

V^o B^o Director



Germaine Escames

El interesado



Huayqui Sol Volt Valdivia

D. LUIS CARLOS LÓPEZ, Investigador Ramón y Cajal de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE D^o. **Huayqui Sol Volt Valdivia**, Licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección, el trabajo titulado **“Mecanismos moleculares de la actividad antiinflamatoria de la melatonina: Participación del receptor nuclear RORalfa”** reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 07 de Enero de 2016

V^o B^o Director



Luis Carlos López

El interesado



Huayqui Sol Volt Valdivia

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

Durante la realización del siguiente trabajo, el Ldo. Huayqui Sol Volt Valdivia fue financiado por las siguientes fuentes:

- Ayudas para contratos predoctorales de Formación del Profesorado Universitario (FPU).

Duración: Diciembre 2011 – Noviembre 2015

- Becas de movilidad internacional de estudiantes de doctorado. Universidad de Granada y CEI BioTic Granada.

Duración: Septiembre-Noviembre 2014

Proyectos de investigación que han financiado este estudio:

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

Entidad Financiadora: ISCIII

Entidades Participantes: Universidad de Granada

Referencia del Proyecto: PI08-1664

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

Investigador Principal: Acuña-Castroviejo D.

Número de Investigadores Participantes: 6

2. Título del Proyecto: MicroRNAs, déficit de melatonina y activación del inflamasoma NLRP3 durante el envejecimiento.

Entidad Financiadora: ISCIII

Entidades Participantes: Universidad de Granada

Referencia del Proyecto: PI13-00981

Duración, Desde: 1-1-2014 **Hasta:** 31-12-2016

Investigador Principal: Acuña-Castroviejo D.

Número de Investigadores Participantes: 6

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

Entidad Financiadora: ISCIII

Entidades Participantes:

Referencia del Proyecto: RD12/0043/0005

Duración, Desde: 01-01-2013 **Hasta:** 31-12-2016

Investigador Principal: Acuña-Castroviejo D.

Número de Investigadores Participantes: 45

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

Volt H, García JA, Doerrier C, Díaz-Casado ME, Guerra-Librero A, López LC, Escames G, Tresguerres JA, Acuña-Castroviejo D. Same molecule but different expression: aging and sepsis trigger NLRP3 inflammasome activation, a target of melatonin. *J Pineal Res.*, 2015, doi: 10.1111/jpi.12303

Otras publicaciones relacionadas con esta Tesis Doctoral

Doerrier C, García JA, Volt H, Díaz-Casado M, Luna-Sánchez M, Fernández-Gil B, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. Permeabilized myocardial fibers as model to detect mitochondrial dysfunction during sepsis and melatonin effects without disruption of mitochondrial network. *Mitochondrion.*, 2015, doi: 10.1016/j.mito.2015.12.010

García JA, Volt H, Venegas C, Doerrier C, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. Disruption of the NF- κ B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor- α and blocks the septic response in mice. *FASEB J.*, 2015; 29 (9): 3863-75

Doerrier C, García JA, Volt H, Díaz-Casado M, Lima-Cabello E, Ortiz F, Luna-Sánchez M, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. Identification of mitochondrial deficits and melatonin targets in liver of septic mice by high-resolution respirometry. *Life Sciences*, 2015; 121: 158-165.

Ortiz F, Acuña-Castroviejo D, Doerrier C, Dayoub JC, López LC, Venegas C, García JA, López A, Volt H, Luna-Sánchez M, Escames G. Melatonin blunts the mitochondrial/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis. *J. Pineal Res.*, 2015; 58 (1): 34-49.

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

Venegas C, García JA, Doerrier C, Volt H, Escames G, López LC, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Analysis of the daily changes of melatonin receptors in the rat liver. *J. Pineal Res.*, 2013; 54 (3): 313-321.

Aportaciones a congresos relacionados con la presente tesis doctoral:

Comunicación oral

XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). Experimental basis for the “Inflamaging” theory. 2014. Granada (España). **Volt H**, García JA, Díaz-Casado ME, Doerrier C, Lima-Cabello E, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

The 2014 Ageing Summit. The Immunology of ageing. Effects of Melatonin on the age-dependent NF- κ B/NLRP3 activation during Sepsis. 2014. London (UK). **Volt H**, Doerrier C, García JA, López LC, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

Póster

The 2014 Ageing Summit. Effects of Melatonin on the age-dependent NF- κ B/NLRP3 activation during Sepsis. 2014. London (UK). **Volt H**, Doerrier C, García JA, López LC, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

I Workshop de jóvenes biotecnólogos. Effects of Melatonin on the age-dependent dysregulation of the NF- κ B/NLRP3 during Sepsis. 2013. Granada (España). **Volt H**, Doerrier C, García JA, López LC, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

Joint FEPS and Spanish Physiological Society Scientific Congress 2012. Modulation of the NF- κ B pathway by melatonin in septic aged mice. 2012. Santiago de Compostela (España). **Volt H**, García JA, Doerrier C, Venegas C, López LC, Bullejos-Peregrín J, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

AGRADECIMIENTOS

Hace ya cinco años que entré por primera vez en el grupo de investigación capitaneado por Darío Acuña. Cinco años cargados de cosas buenas y no tan buenas, logros y fracasos, que han permitido mi desarrollo tanto en lo profesional como en lo personal, haciéndome crecer como persona. Cinco años que se reflejan, en parte, en esta tesis doctoral, cuya culminación no hubiese sido posible sin el apoyo de muchísimas personas y, claro está, sin mi propia perseverancia y disciplina.

En primer lugar quiero agradecer a Darío, por haber confiado en mí desde el primer momento y haberme permitido formar parte de su grupo de investigación, pudiendo realizar así mi tesis doctoral. Agradecerle que siempre haya estado ahí cuando le he necesitado, por su contribución a este trabajo, por estar siempre dispuesto al diálogo y por mostrarme día a día cuán necesaria es la constancia y el esfuerzo en el mundo de la investigación.

A Germaine, por estar siempre dispuesta a ayudar y por ser una gran tutora durante toda mi etapa docente, enseñándome las bases de un buen profesor de universidad.

A Luis Carlos, por estar siempre dispuesto a escuchar y ayudar, y cuyos conocimientos, tanto científicos como burocráticos, han contribuido facilitando distintos aspectos de esta tesis doctoral.

A los miembros de mi Tribunal de tesis, por aceptar formar parte de éste.

A todos mis compañeros de laboratorio, pues sin ellos nada de esto sería posible, ya que no sólo han sido mi apoyo durante estos últimos años, animándome y sobre todo aguantándome, sino que también se han convertido en mi pequeña familia como resultado de las innumerables horas que hemos compartido día tras día. Entre ellos tengo que destacar a mi gran maestro Yoda, compañero y amigo, el Dr. García Santos, sin él no sería el científico

que soy hoy. No digo que conseguir un título de doctor en biomedicina sea fácil, pero sin duda sin él hubiese sido muchísimo más complicado. A mi Elena, por ser más que una compañera, una amiga, y porque a pesar de que los “viejos” se hayan ido yendo, siempre nos hemos tenido el uno al otro. A la gran jefa del laboratorio, la Dra. Rusanova, gracias por las incontables charlas que hemos tenido durante los últimos años. A los miembros pseudoexiliados: Marta, Carol, Roberto Carlos, Carmen, Laura, Jose, Roberto, Elena Lima, Anilla, Carla, Francis, Javi... gracias por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, y por mostrarnos tal y como sois, simplemente fantásticos. A los miembros recientemente adquiridos: Bea, Agustín, Eliana, Ying, Ana, Sergio, Cristina, Ibtí, Rammy, Hanène, Javi, Violeta, Manu... sangre nueva con ganas de conocer, preguntar, experimentar y salir de fiesta.

A mis compañeros de carrera Paloma, Charli, Nacho, Irene, Fernando, Lidia, Fede, Merche... gracias por haber compartido conmigo los mejores años de mi vida.

A la peña de fútbol de los viernes a las ocho, por esas buenas pachanguitas y porque no importa que cada dos por tres me lesione... vale la pena por esa de hora de deporte y diversión que pasamos juntos.

A todos mis amigos desperdigados por el mundo; en Ibiza, Vero, Patri, Javi, Ruso, Yani, Josean, David, Cris, Ángel, Iris, Eli, Candy, Marta, Raquel, Benji, Samu, Eric, Juanan, Carol...; en Barcelona, Toni, Ali, Piticlin, Daya, Naroa, Laura, Marta, Agnès, Belén, Tamara...; en UK e Irlanda, Carmen, Ana, Dave, Davide, Saioa, Patri, Damian, Amina, Randy...; en Mallorca, Raquel; en Almería, Beuchi; en Chile, Nico, Julian, Chantal, Lautaro, Dafnys... a todos, gracias por estar ahí y porque no importa donde nos lleve la vida, siempre podremos contar los unos con los otros.

A mis amigos granadinos: Nacho, Cris, Diego, Fran, Adri y Jezú, gracias por todas las risas, debates, los clásicos, la Champions y noches de juerga; Nacho, gracias por esas tardes de litros y tapas, esas guitarras, toda la música compartida y por siempre estar ahí para apoyarme...y esta guapoco...

A mi gran amiga y compañera de piso durante casi todos los años de tesis, Alison, gracias por tu risa y frescura, por tu apoyo y consejo, y por poder siempre contar contigo para todo, menos para asuntos científicos, claro...

A Paula, porque por más que ya no estés conmigo, siempre serás una de las personas más importantes de mi vida y la que mejor comprende lo que ha significado la consecución de esta tesis doctoral; porque durante los últimos cuatro años has estado siempre conmigo en los buenos y malos momentos, apoyándome y ayudándome, dándome fuerzas y amor cuando más lo he necesitado...gracias mi niña.

A mi familia de Chile y de Suecia, porque siempre estáis en mi corazón.

Y por último, y no por eso menos importante...mi mayor agradecimiento va dirigido a mi familia. Me considero una persona muy afortunada de haber vivido lo que he vivido y de tener lo que tengo, y todo eso se lo debo a mis padres. A mi madre, por ser mi gran maestra de la vida, y por estar siempre ahí mostrándome en todo momento tu amor y apoyo incondicional. A mi padre, porque desde que era pequeño me inculcaste la inquietud científica, el orden y la meticulosidad, y porque pese a que ya no estás entre nosotros, siempre vas conmigo a todas partes. A mi hermana, sin lugar a dudas la mejor hermana del mundo, por tu apoyo, gran corazón y correcciones gramaticales varias.

A todos ellos y a todos los que habéis formado parte de mi vida, de todo corazón, mil gracias.

A mis padres

ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

AANAT: Atrialquilamina N-acetiltransferasa

AF: Secuencia de función de activación

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

AMK: N1-acetil-5-metoxikinuramina

ANK: Repeticiones ricas en ankirina

AP-1: Proteína activadora 1

ASC: Proteína que contiene un dominio tipo CARD

ASMT: N-acetilserotonina O-metiltransferasa

Bax: Proteína X asociada a Bcl2

Bmal1: Receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos 1

Bcl2: Células B/linfoma 2

CaM: Calmodulina

CARD: Dominio de reclutamiento y activación de caspasas

CAT: Catalasa

CBP/p300: Proteína de unión a CREB/p300

cDNA: DNA copia

Clock: Gen circadiano locomotor de salida de ciclos kaput

CLP: Punción y ligadura cecal

CLRs: Receptores tipo lectina C

COX-2: Ciclooxygenasa de tipo 2

Cry: Criptocromo

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño

DBD: Dominio de unión al DNA

ETS: Sistema de tranferencia de electrones

G6PDH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GPx: Glutación peroxidasa

GRd: Glutación reductasa

GRR: Repeticiones ricas en glicina

GSH: Glutación

GSSG: Glutación oxidado

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HDAC3: Histona deacetilasa de tipo 3

HIF-1 α : Factor de hipoxia inducible 1 tipo alfa

IFN: Interferón

IFNR: Receptor IFN

I κ B: Inhibidor kappaB

IKK: Quinasa del inhibidor kappaB

IL: Interleuquina

i-mtNOS: iNOS mitocondrial

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

IRAK: Quinasas asociadas al receptor de la IL-1

IRF: Factor regulador del interferón

IRF3: Factor regulador de interferón 3

KDa: Kilodaltons

LBD: Dominio de unión a ligando

LBP: Proteína de unión a LPS

LOO \cdot : Radical peróxido

LPS: Lipopolisacárido

LRR: Repeticiones ricas en leucina

Lys: Lisina

LZ: Dominio cremallera de leucina

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MD-2: Proteína de diferenciación mieloide-2

MPT: Poro de transición mitocondrial

mtDNA: DNA mitocondrial

MyD88: Factor de diferenciación mieloide 88

NACHT: Dominio de unión a nucleótidos

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NADP: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NAMPT: Nicotinamida fosforibosiltransferasa

NMNAT: Nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa

NAS: N-acetil-serotonina

NES: Secuencias de exporte nuclear

NF- κ B: Factor de transcripción nuclear kappaB

NLRP3: Proteína 3 de la familia NLR

NLRs: Receptores tipo NOD	PTX3: Pentraxina3
NLS: Secuencia de localización nuclear	PYD: Dominio pirin
NMN: Nicotinamida mononucleótido	Q: Ubiquinona
NMNAT: Nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa	QH2: Ubiquinol
NO•: Óxido nítrico	Rev-Erba: Subfamilia 1 de receptor nuclear, grupo D, miembro 1
NOD: Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos	RHD: Dominio homólogo a Rel
O₂^{•-}: Anión superóxido	RIG-I: Ácido retinoico inducible del gen 1
OH-: Grupo hidroxilo	RIP2: Proteína 2 de interacción con el receptor
ONOO-: Peroxinitritos	RLRs: Receptores tipo RIG-I
p/v: Peso/volumen	RNS: Especies reactivas de nitrógeno
P2X7: Receptor purinérgico	RORα: Receptor huérfano relacionado con RAR tipo alfa
p53: Proteína supresora de tumores p53	RORE: Elemento de respuesta de ROR
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos	ROS: Especies reactivas de oxígeno
Per: Período	Ser: Serina
PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa	SIRS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
PKA: Proteína quinasa A	SIRT1: Sirtuína 1
PKC: Proteína quinasa C	SOD: Superóxido dismutasa
PPARγ: Factor proliferador de peroxisomas	Sp-1: Proteína específica 1
PRR: Receptores de reconocimiento de patrones	UCI: Unidad de cuidados intensivos

TD: Dominio de transactivación

TIR: Dominio homólogo al del receptor de IL-1

TLRs: Receptores tipo *Toll*

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

TNFR: Receptores del TNF

TPH: L-triptófano hidroxilasa

TRAF6: Factor 6 asociado al receptor del TNF

TRIF: Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR e induce IFN-beta

TXNIP: Proteína tiorredoxina interactiva

γ GCS: Gamma-glutamilcisteina sintasa

*“No serán ni los banqueros, ni los políticos, ni los abogados los que salvarán el mundo, si no
ustedes, los biólogos”*

Michael Volt

“And everything under the sun is in tune, but the sun is eclipsed by the moon”

Roger Waters

RESUMEN

La insuficiencia cardiaca es uno de los componentes más importante del fallo multiorgánico que se produce durante la sepsis. Esta patología se asocia con una alta tasa de mortalidad y morbilidad en la unidad de cuidados intensivos de los hospitales, siendo su incidencia y susceptibilidad desproporcionadamente elevadas en los pacientes con edades avanzadas. Hoy en día se sabe que el envejecimiento se acompaña de una activación en la respuesta inmune que promueve el establecimiento de un estado inflamatorio crónico de bajo grado conocido con el término de *inflammaging*. Esta condición, asociada a la edad, agrava significativamente el pronóstico de las personas mayores a la sepsis y nos ayuda a entender por qué los modelos animales envejecidos son más sensibles a los efectos letales de esta patología. Debido a que la sepsis constituye un cuadro clínico específico y que actualmente no existe ninguna terapia eficaz, es de suma importancia comprender la desregulación que tiene lugar en la respuesta inmune innata durante el envejecimiento, para poder entender mejor lo que ocurre durante la sepsis en organismos envejecidos.

Estudios previos han demostrado la importancia que tiene el factor nuclear kappaB (NF- κ B) durante el proceso de envejecimiento y en la fisiopatología de la sepsis; en este sentido, el reconocimiento de la señal inflamatoria por sus receptores específicos inicia una cascada de señalización que finaliza en la translocación nuclear y posterior activación transcripcional de NF- κ B. En consecuencia, se induce la expresión de numerosos genes, incluidos citoquinas y enzimas de carácter pro-inflamatorio, inmunoreceptores o moléculas de adhesión. Asimismo, esta condición inflamatoria se asocia con una profunda disfunción mitocondrial y consecuente apoptosis, lo que favorece la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), ATP y DNA mitocondrial (mtDNA) al citosol. Tras su liberación, estas señales asociadas al daño celular serán reconocidas por el inflamasoma NLPR3, un complejo multiproteico que participa en la activación de la caspasa-1 y, en consecuencia, en la producción de las formas

maduras de las citoquinas pro-inflamatorias, incluida IL-1 β . Así, la activación paralela de las vías de la inmunidad innata dependientes de NF- κ B y del inflamasoma NLRP3, conduce a una sobreproducción de IL-1 β , TNF α y otros mediadores pro-inflamatorios, los cuales se encuentran significativamente elevados durante el proceso inflamatorio asociado a la edad y a la sepsis.

Por otro lado, estudios previos han demostrado que las alteraciones que tienen lugar en la expresión de los genes reloj durante el envejecimiento se asocian al estado de *inflammaging*, a través de la caída en los niveles de NAD⁺ y a la reducción en la actividad deacetilasa de SIRT1, lo que impide la inactivación de NF- κ B. Por tanto, el proceso séptico debería incrementar la cronodisrupción que se da con la edad, exacerbando la respuesta inflamatoria y el daño asociado.

La falta de una estrategia terapéutica eficaz contra la sepsis puede deberse a la existencia de la vía de la inmunidad innata dependiente de la conexión mitocondria/inflamasoma NLRP3, además de la vía clásica dependiente de NF- κ B. Por tanto, para modular el proceso séptico se necesita de un medicamento capaz de atenuar todo el bucle de la inmunidad innata representado por la conexión entre los genes reloj/NF- κ B/NLRP3, y que evite al mismo tiempo la producción de ROS de origen mitocondrial. La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) cumple totalmente estos criterios; es un potente antioxidante y depurador de radicales libres; se acumula en la mitocondria a altas concentraciones, donde mantiene su homeostasis; muestra potentes propiedades antisépticas, modulando la vía de activación de la inmunidad innata dependiente de NF- κ B. Asimismo, recientemente hemos demostrado que la melatonina también es capaz de inhibir la activación del inflamasoma NLRP3 durante la sepsis.

De acuerdo con estos antecedentes, hemos estudiado en el corazón de ratones envejecidos el papel del inflamasoma NLRP3 en el establecimiento del *inflammaging* y durante la

respuesta inmunitaria exacerbada que se da en la sepsis, evaluando al mismo tiempo, los mecanismos moleculares involucrados en la acción anti-inflamatoria de la melatonina.

Para ello, los objetivos de este trabajo fueron:

- 1) Evaluar en ratones C57BL/6 de 18 meses de edad, controles y con sepsis, la activación del inflammasoma NLRP3 mediante el análisis de la expresión y contenido de sus principales componentes (NLRP3 y ASC), activación de la caspasa-1 y maduración de la IL-1 β , comparando estos parámetros con ratones controles C57BL/6 de 3 meses de edad.
- 2) Estudiar en ratones C57BL/6 de 18 meses de edad, controles y con sepsis, la activación de NF- κ B mediante su presencia en el núcleo, unión al DNA y niveles de expresión y contenido proteico de marcadores pro-inflamatorios. Comparar estos parámetros con ratones controles C57BL/6 de 3 meses de edad.
- 3) Estudiar en ratones C57BL/6 de 18 meses de edad, controles y con sepsis, el estado de los genes reloj, la expresión y actividad de los principales enzimas antioxidantes, así como la función mitocondrial a través del análisis en la actividad de los complejos respiratorios, y la vía apoptótica intrínseca. Comparar con ratones controles C57BL/6 de 3 meses de edad.
- 4) Evaluar los efectos protectores del tratamiento agudo con melatonina sobre todos los parámetros mencionados anteriormente, así como sus posibles mecanismos de acción y dianas moleculares, en ratones sépticos C57BL/6 de 18 meses de edad.

Los resultados mostrados en esta tesis doctoral ayudan a comprender mejor los mecanismos que subyacen durante el proceso de *inflammaging*, confirmando que la edad produce, en primer lugar, una disrupción del bucle Clock/Bmal1/SIRT1/NF- κ B, una activación secundaria de la respuesta inmune dependiente de NF- κ B, con el consiguiente deterioro mitocondrial y estrés oxidativo asociado, que finalmente termina con la activación

del inflamasoma NLRP3, la amplificación de la respuesta inflamatoria y, en última instancia, la activación de los procesos apoptóticos y la pérdida de la capacidad funcional de la célula. A la vista de estos resultados, proponemos el término *chronoinflammaging*, como el proceso asociado al envejecimiento responsable del estado inflamatorio subclínico observado en los ratones de edad avanzada.

Por su parte, la sepsis incrementó aún más las alteraciones observadas durante el *inflammaging*, produciendo una respuesta inflamatoria desproporcionada en el corazón de los ratones envejecidos. Por tanto, el estado pro-inflamatorio de bajo grado asociado al proceso de envejecimiento contribuye a la elevada susceptibilidad y mortalidad de las personas mayores frente a la sepsis.

Nuestros datos también demuestran que la administración de melatonina contrarresta totalmente la respuesta a la sepsis, reduciendo la inflamación, el estrés oxidativo, y la disfunción mitocondrial hasta los niveles mostrados por los ratones envejecidos no sépticos. Sin embargo, esta terapia no contrarresta el efecto del *inflammaging*, evidenciando una importante dualidad en los efectos de la melatonina; por un lado, dosis bajas administradas de forma crónica previenen el estado inflamatorio de bajo grado asociado a la edad, y por otro, dosis altas administradas de forma aguda contrarrestan el proceso inflamatorio asociado a la sepsis, sin afectar al estado inflamatorio basal de los ratones envejecidos.

En conjunto, nuestros resultados sugieren al *chronoinflammaging* como la base molecular y bioquímica del proceso de envejecimiento, e identifican al inflamasoma NLRP3 como una nueva diana molecular de la melatonina durante la sepsis en ratones de edad avanzada, proporcionando una justificación para su uso terapéutico en enfermedades inflamatorias dependientes del inflamasoma NLRP3.

SUMMARY

Cardiac impairment during sepsis is an important component of multiple organ failure in the elderly. Sepsis is associated with high mortality and morbidity in the critical care units, and its incidence and susceptibility are disproportionately elevated in aged patients, with significantly high mortality rate during sepsis. It is now recognized the existence of a low-level inflammation during aging, which results of the innate immune system dysregulation, the so-called “inflammaging”. This condition may help to understand why aged mice are more sensitive to the lethal effects of sepsis. Because sepsis constitutes a specific pathophysiological and clinical picture, with not current effective therapy in elderly, it is important firstly to realize the innate immunity dysregulation during aging, to understand what happen during sepsis.

Previous reports show that nuclear factor kappa B (NF- κ B) plays a critical role during aging and sepsis pathogenesis, which trigger its nuclear translocation and transcriptional activity, inducing the expression of pro-inflammatory cytokines and enzymes, immunoreceptors or adhesion molecules. Inflammation also courses with mitochondrial dysfunction and apoptosis, favoring reactive oxygen species (ROS), ATP and mitochondrial DNA (mtDNA) release to the cytosol, promoting the NLRP3 inflammasome assembly, a multiprotein complex that activates caspase-1. Once activated, caspase-1 processes the NF- κ B-dependent pro-inflammatory cytokines including pro-IL-1 β to their mature forms. Thus, the activation of both NLRP3 inflammasome and NF- κ B innate immunity pathways leads to overproduction of IL-1 β , TNF α and other pro-inflammatory mediators, all of which rise during the inflammatory process associated with age and sepsis in elderly.

Furthermore, previous studies have shown that alterations in the clock genes expression during aging are associated with an enhanced proinflammatory state through a drop in NAD⁺ levels and reduction in the SIRT1 deacetylase ability, impeding its inactivation of NF-

κ B. Therefore, sepsis should increase chronodisruption, exacerbating the inflammatory response and the associated damage.

The lack of an effective therapeutic strategy for sepsis may be now explained by the existence of the NLRP3/mitochondrion innate immune pathway besides the classic NF- κ B pathway. Therefore, to control the septic process we need a drug able to blunt the whole innate immune loop represented by the clock genes/NF- κ B/NLRP3 connection, and avoiding mitochondrial-deriving ROS at the same time. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) fulfills these criteria; it is a potent antioxidant and free radical scavenger; it is actively taken up by the mitochondria where it maintains their homeostasis, and exerts potent antiseptic properties acting against the NF- κ B-dependent innate immune pathway activation. Recently, we showed that melatonin also blunts the NLRP3 inflammasome activation.

According to this background, we assess whether the NLRP3 inflammasome is involved in the inflammaging process itself, and also in the amplified response to sepsis in heart of aged mice. Moreover, we evaluated the molecular mechanism(s) involved in the anti-inflammatory actions of melatonin.

The objectives of this research were:

- 1) To assess the NLRP3 inflammasome activation and to study the cooperation between NF- κ B/NLRP3 signaling pathways.
- 2) To determine NF- κ B signaling pathway activation through its nuclear content, DNA binding and proinflammatory mediators levels.
- 3) To evaluate clock genes expression, antioxidant enzymes activity and mitochondrial function.

4) To evaluate the protective effects of an acute treatment of melatonin and the mechanism(s) involved in its therapeutic action.

The results of this thesis help to understand the mechanisms underlying the inflammaging process, supporting a primary effect of age on clock genes/SIRT1/NF- κ B disruption, a secondary activation of the NF- κ B-dependent immunity, a subsequent mitochondrial impairment and oxidative stress, ending with the activation of the NLRP3 inflammasome and amplifying the inflammatory response of aging. The ultimate goal of these changes here showed in mouse heart is the initiation of apoptosis and loss functional capacity. With these results, a **chronoinflammaging** theory has been proposed.

Sepsis further increases the alterations observed during inflammaging, yielding a disproportionate inflammatory response in the heart of aged mice. Thus, the low-grade proinflammatory status associated with aging contributes to the elevated susceptibility and mortality of sepsis in aged population.

Our data also illustrate that melatonin administration counteracted the septic response, reducing inflammation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction at the levels of non-septic aged mice, but this therapy did not counteract the inflammaging response. These results account for an important duality of melatonin effects, i.e., chronic, low-doses of melatonin prevent inflammaging, whereas acute, high doses of melatonin counteract septic inflammation without affect the basal inflammatory status of aged mice.

Together, our results suggest that, although with different strengths, chronoinflammaging constitutes the biochemical substrate of aging and sepsis, and identify the NLRP3 inflammasome as a new molecular target for melatonin, providing a rationale for its use in NLRP3-dependent diseases.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. ENVEJECIMIENTO	3
1.1 CONCEPTO Y TEORÍAS	3
2. SISTEMA INMUNITARIO, RESPUESTA INFLAMATORIA Y SU PAPEL DURANTE EL ENVEJECIMIENTO	7
2.1 REACCIÓN INFLAMATORIA Y ENVEJECIMIENTO	7
2.2 SEPSIS Y ENVEJECIMIENTO	10
2.3 ACTIVACIÓN DE LA INMUNIDAD INNATA: RECEPTORES Y EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO	13
3. NF-κB: REGULADOR CLAVE DE LA RESPUESTA INMUNE E INFLAMATORIA	19
3.1 MIEMBROS Y ESTRUCTURA DE LA FAMILIA NF- κ B/Rel	19
3.2 INHIBICIÓN Y ACTIVACIÓN DE NF- κ B	21
3.3 PAPEL DE NF- κ B DURANTE EL ENVEJECIMIENTO	24
3.4 PAPEL DE NF- κ B DURANTE LA SEPSIS	27
4. FAMILIA DE RECEPTORES NLR DE LA INMUNIDAD INNATA: IMPORTANCIA DEL INFLAMASOMA NLRP3	31
4.1 RECEPTORES TIPO NOD	31
4.2 INFLAMASOMA NLRP3	32
4.2.1 PAPEL DEL INFLAMASOMA NLRP3 DURANTE EL ENVEJECIMIENTO	35
4.2.2 PAPEL DEL INFLAMASOMA NLRP3 DURANTE LA SEPSIS	36
5. MELATONINA: RELACIÓN CON EL ENVEJECIMIENTO Y PAPEL TERAPÉUTICO EN LA SEPSIS	39
5.1 SÍNTESIS DE LA MELATONINA	40
5.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MELATONINA	42
5.2.1 UNIÓN A RECEPTORES: IMPORTANCIA DEL RECEPTOR NUCLEAR ROR	43
5.2.3 UNIÓN A PROTEÍNAS CITOSÓLICAS	46
5.2.4 ACCIÓN ANTIOXIDANTE DIRECTA E INDIRECTA	46

5.2.5 ACCIÓN SOBRE LA MITOCONDRIA	49
5.3 PAPEL DURANTE EL ENVEJECIMIENTO	49
5.3 PAPEL TERAPÉUTICO EN LA SEPSIS	54
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
III. MATERIALES Y MÉTODOS	63
1. ANIMALES, PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO Y TRATAMIENTOS	65
1.1 ANIMALES	65
1.2 MODELO DE INDUCCIÓN DE SEPSIS	65
1.3 TRATAMIENTOS Y GRUPOS EXPERIMENTALES	66
2. AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN CITOSÓLICA Y NUCLEAR	67
3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	68
3.1 EXTRACCIÓN DE RNA	68
3.2 REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA	69
3.3 RT-PCR CUANTITATIVA	70
4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA POR WESTERN BLOT	73
5. DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO CELULAR	76
5.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA DEPENDIENTE DE COBRE Y ZINC (Cu-Zn-SOD; SOD1)	76
5.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx) CITOSÓLICA	79
5.3 DETERMINACIÓN DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA (GRd) CITOSÓLICA	80
5.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA (CAT)	81
6. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ANALÍTICOS POR ELISA	82
6.1 CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD DE UNIÓN AL DNA DE NF-κB p65	82
6.2 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE NAD ⁺	84
7. ANÁLISIS DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL	86
8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS MITOCONDRIALES	87
8.1 COMPLEJOS I, II, III Y IV	87

8.2 COMPLEJOS I + III Y II + III	90
9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	91
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	92
III. RESULTADOS	93
1. EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO, LA SEPSIS Y EL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LA VÍA DEL INFLAMASOMA NLRP3	97
2. EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO, LA SEPSIS Y EL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LA VÍA INFLAMATORIA DEPENDIENTE DE NF- κ B	98
3. EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO, LA SEPSIS Y EL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL	101
4. EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO, LA SEPSIS Y EL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE CITOSÓLICA	102
5. EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO, LA SEPSIS Y EL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LA CONEXIÓN GENES RELOJ/ROR α /SIRT1	105
6. EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO, LA SEPSIS Y EL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LA VÍA APOPTÓTICA MITOCONDRIAL	106
IV. DISCUSIÓN	109
V. CONCLUSIONS	121
VI. BIBLIOGRAFÍA	125
VII. ANEXOS	161

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Causas, propósito fisiológico y consecuencias patológicas de la inflamación _____	9
FIGURA 2. Interrelación entre el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis e infección _____	11
FIGURA 3. Comunicación entre los PRR y amplificación de la respuesta inflamatoria _____	15
FIGURA 4. Efectos del envejecimiento sobre la señalización de la inmunidad innata dependiente de los PRR _____	17
FIGURA 5. Miembros de la familia NF- κ B/Rel _____	21
FIGURA 6. Estructura de I κ B α _____	22
FIGURA 7. Vía de activación canónica de NF- κ B _____	24
FIGURA 8. La activación de NF- κ B juega un papel central en la fisiopatología del shock séptico _____	28
FIGURA 9. Sistemas antioxidantes enzimáticos citosólicos _____	29
FIGURA 10. Representación esquemática del ensamblaje y activación de los componentes del inflamasoma NLRP3 _____	33
FIGURA 11. Modelos implicados en la activación del inflamasoma NLRP3 _____	34
FIGURA 12. Cooperación entre NF- κ B e inflamasoma NLRP3 en la respuesta inmune innata durante la sepsis _____	37
FIGURA 13. Estructura química de la melatonina _____	39
FIGURA 14. Síntesis de la melatonina a partir del triptófano en la glándula pineal _____	41
FIGURA 15. Mecanismos de acción de la melatonina _____	42
FIGURA 16. Estructura de los miembros de la subfamilia de receptores nucleares ROR/RZR _____	45
FIGURA 17. Cascada antioxidante de la melatonina _____	47
FIGURA 18. Mecanismo básico del reloj circadiano en mamíferos _____	51
FIGURA 19. SIRT1 y el reloj circadiano en el envejecimiento _____	54
FIGURA 20. Diagrama del modelo experimental utilizado _____	66

FIGURA 21. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la vía del inflamasoma NLRP3	98
FIGURA 22. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la vía inflamatoria dependiente de NF- κ B	100
FIGURA 23. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la función mitocondrial	101
FIGURA 24. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la capacidad antioxidante citosólica	103
FIGURA 25. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la conexión genes reloj/ROR α /SIRT1	104
FIGURA 26. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la vía apoptótica mitocondrial	107
FIGURA 27. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la expresión de <i>Bax</i> , <i>Bcl2</i> y <i>Bax/Bcl2</i>	108
FIGURA 28. Efectos anti-inflamatorios de la melatonina: dianas moleculares dependientes del receptor nuclear ROR α	119

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Condiciones programadas en el termociclador para la transcripción inversa	70
TABLA 2. Condiciones de RT-PCR para el análisis de expresión de los genes descritos	72
TABLA 3. Programa de ciclos de RT-PCR cuantitativa	73
TABLA 4. Condiciones de Western Blot para el análisis del contenido de las proteínas descritas	75

INTRODUCCIÓN

1. ENVEJECIMIENTO

El conocimiento de la biología básica del proceso de envejecimiento es fundamental para afrontar uno de los mayores retos que plantea la sociedad del siglo XXI, el incremento exponencial en el porcentaje y número absoluto de personas mayores.

Las Naciones Unidas han pronosticado que la población mundial mayor de 60 años aumentará más de tres veces, llegando a alcanzar los 2 mil millones de individuos, durante la primera mitad del siglo XXI, y que para 2050 excederá el tamaño de la población mundial de individuos jóvenes, es decir, de aquellas personas menores de 15 años de edad. Este crecimiento sin precedentes de la población envejecida se observa tanto en los países en vías de desarrollado como en los desarrollados, y se debe en parte, al aumento en la esperanza de vida que paso de ser de 65,3 años en 1990 a 71,3 en 2013 (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2015). En España, según el Instituto Nacional de Estadística (INE), entre 1992 y 2013, la esperanza de vida ha pasado de 73,9 a 80 años en los hombres, y de 81,2 a 85,6 años en las mujeres. Estos cambios demográficos están obligando a los países a pensar en las medidas de protección social y financieras necesarias para enfrentar la creciente población anciana. Por su parte, los países en desarrollo encaran la doble tarea que implica impulsar el estándar de vida de su población y mantener al mismo tiempo a generaciones completas que ya no puedan hacer un aporte a ese proceso.

1.1. CONCEPTO Y TEORÍAS

El envejecimiento es un proceso multifactorial que conduce inexorablemente a la muerte. A medida que nos hacemos mayores, la disminución progresiva de la capacidad fisiológica y la menor habilidad a la hora de responder a las constantes presiones ambientales, conducen a una mayor susceptibilidad y vulnerabilidad a las enfermedades relacionadas con la edad y al propio proceso de envejecimiento en sí.

Hay que aclarar que los términos envejecimiento y senescencia a menudo son utilizados de forma sinónima, aunque estrictamente el envejecimiento consiste en el paso del tiempo, desde el desarrollo embrionario hasta la senectud, mientras que la senescencia implica una disminución de la homeostasis, deterioro progresivo y aumento en la vulnerabilidad del organismo (Troen, 2003).

Durante la vejez se dan varias características distintivas que representan denominadores comunes en los diferentes organismos, en especial en los mamíferos. Estas características son la inestabilidad genómica, el acortamiento de los telómeros, las alteraciones epigenéticas, la pérdida de la proteostasis, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular, el agotamiento de células madre y la alteración en las comunicaciones intercelulares (Lopez-Otin y cols., 2013). En este sentido, el mayor reto al que se enfrenta la ciencia es poder diseccionar la interconexión entre las distintas características distintivas del envejecimiento y su contribución relativa al proceso, con el objetivo final de identificar dianas terapéuticas para mejorar la calidad de vida de las personas mayores.

El envejecimiento es uno de los procesos más multifactoriales y complejos que existen en los organismos vivos, de forma que los intentos de comprensión de las causas que lo originan han contribuido a un gran número de definiciones y teorías. Históricamente, estas teorías han sido divididas en dos categorías generales; las que afirman que el proceso de envejecimiento sería el resultado de la suma de alteraciones que ocurren de forma aleatoria y se acumulan a lo largo del tiempo (**teorías estocásticas**), y las que suponen que el envejecimiento estaría predeterminado (**teorías deterministas** o genéticas y del desarrollo). Ambas teorías no resultan excluyentes entre sí, tal y como evidencian las teorías mitocondrial y de los radicales libres. De hecho, es probable que haya un momento a lo largo de la vida en el que se refleje una disminución en las influencias génicas con un incremento de los efectos estocásticos (Troen, 2003).

Entre las muchas teorías que intentan explicar las causas del envejecimiento, quizás la más importante es la que sugiere la participación de los radicales libres de oxígeno (HARMAN, 1956; HARMAN, 1972). De acuerdo con esta idea, el envejecimiento resulta de los efectos perjudiciales fortuitos causados por las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) en los tejidos. En este sentido, la conexión entre el proceso de envejecimiento, las patologías asociadas a este y el daño oxidativo, se basa principalmente en tres grandes evidencias: 1) todos los organismos aerobios generan constantemente una alta tasa de intermediarios reactivos resultado de la reducción del oxígeno; 2) los productos del daño oxidativo se acumulan de manera exponencial en los organismos senescentes bajo condiciones fisiológica normales, siendo esta acumulación mucho mayor en condiciones fisiopatológicas; 3) aquellos factores que promueven el estrés oxidativo pueden aumentar considerablemente la mortalidad y morbilidad, acelerando el proceso, mientras que los factores antioxidantes pueden reducir la tasa de envejecimiento y, la incidencia y severidad de las patologías relacionadas con la edad (Poeggeler, 2005).

En base a todo esto, la teoría de los radicales libres fue modificada años más tarde para destacar el papel de las mitocondrias como el principal origen y diana de estos intermediarios reactivos (Miquel y colbs., 1980), surgiendo así la teoría mitocondrial de radicales libres (MFRTA, del inglés *Mitochondrial Free Radical Theory of Aging*). Esta teoría propone que el envejecimiento está causado por la toxicidad de las ROS, a través de un círculo vicioso en el cual el daño producido en los componentes de las mitocondrias por estas ROS conduce a la generación de más ROS, y a una pérdida gradual de la capacidad bioenergética, que promoverá la senescencia celular y finalmente la muerte (Fleming y colbs., 1982; Wallace, 1992). La teoría se basa en numerosas observaciones, entre las que se incluyen: 1) la existencia de una fuerte correlación entre la edad cronológica, los niveles de producción de ROS y el daño oxidativo; 2) la función mitocondrial se va perdiendo gradualmente

durante el envejecimiento; 3) las alteraciones en la función mitocondrial incrementan la producción de ROS; 4) varias enfermedades dependientes de la edad se asocian con un incremento severo del estrés oxidativo (Hekimi y colbs., 2011). En base a todo esto, se acepta que el envejecimiento está estrechamente asociado a la producción de ROS de origen mitocondrial y al daño relacionado con esta producción (Balaban y colbs., 2005).

Como último punto de este primer apartado, cabe destacar que con el aumento de la esperanza de vida, los individuos se encuentran expuestos por más tiempo a distintos antígenos que, junto con el envejecimiento del sistema inmunitario, favorecen el establecimiento de un estado inflamatorio crónico de bajo grado que se acompaña con un aumento en la expresión de varios mediadores pro-inflamatorios. Esta situación, denominada *inflammaging* (Franceschi y colbs., 2000), describe el estado inflamatorio característico del proceso de envejecimiento asociado a una exposición crónica a factores de estrés, como los antígenos, que conducirán a una desregulación del sistema inmunológico. Esta desregulación en la respuesta inmunitaria asociada a la edad se conoce con el término de **inmunosenescencia** (Franceschi y colbs., 1999). En base a esto, Chung y colaboradores sugirieron la hipótesis inflamatoria del envejecimiento, la cual postula que durante la vejez se produce un desbalance entre los factores anti-inflamatorios y pro-inflamatorios a favor de éstos últimos, dando lugar a un estado pro-inflamatorio persistente que ocasiona daño en los tejidos (Chung y colbs., 2001; Chung y colbs., 2002).

De acuerdo con estas últimas teorías inmunológicas del envejecimiento, y al demostrado estado pro-inflamatorio que acompaña a la edad, buena parte del estudio presentado en esta tesis doctoral intentará dilucidar, a nivel molecular, el papel que juegan una serie de marcadores clave en la respuesta inflamatoria que acompaña al proceso de envejecimiento.

2. SISTEMA INMUNITARIO, RESPUESTA INFLAMATORIA Y SU PAPEL DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

La inmunidad innata y adaptativa son los principales mecanismos de defensa de los organismos superiores contra las amenazas inherentes y ambientales. Curiosamente, a medida que envejecemos se produce una respuesta inflamatoria persistente como consecuencia de una desregulación en el funcionamiento del sistema inmunitario, involucrando múltiples tipos de células, tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa, que varían en función del tejido y del estado de activación celular (Shaw y cols., 2013). De la amplia gama de factores que contribuyen a este estado, la sobrecarga antigénica crónica parece jugar el papel más importante, afectando al sistema inmunológico a lo largo de toda la vida a través de la activación progresiva de macrófagos y células relacionadas (Franceschi y cols., 1999; De y cols., 2006). Esta desregulación en la respuesta inmunitaria asociada a la edad, la inmunosenescencia, se traduce en una mayor susceptibilidad a los procesos infecciosos, al cáncer y en una reducción de la respuesta a la vacunación (Cannizzo y cols., 2011), contribuyendo al proceso inflamatorio crónico referido como *inflammaging* (Franceschi y cols., 2000).

2.1. REACCIÓN INFLAMATORIA Y ENVEJECIMIENTO

La inflamación es una respuesta local del sistema inmunitario desencadenada u originada en un organismo frente al daño causado en sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos o cualquier otro agresor de naturaleza física, química, biológica o mecánica (Nathan, 2002). Desde un punto de vista fisiológico, todo proceso inflamatorio debe interpretarse como un intento del organismo para eliminar el estímulo perjudicial al tiempo que se inicia una compleja red de interacciones moleculares y celulares que facilitan los procesos de recuperación de la homeostasis y la reparación tisular (Henson, 2005; Barton,

2008). Sin embargo, si la eliminación, resolución y reparación del daño no se organizan de forma apropiada, la respuesta inflamatoria se activa de forma persistente y desmesurada, perdiéndose así su valor adaptativo (beneficioso para la eficacia biológica del organismo y su eficacia reproductora), adquiriendo un carácter perjudicial asociado a un daño tisular permanente.

El análisis de este concepto nos permite establecer dos grandes consideraciones; la primera hace referencia al papel que juega el proceso inflamatorio a la hora de establecer una nueva conexión entre la respuesta inmune innata y adquirida. Así, las células del sistema de la inmunidad innata detectan y señalizan la presencia de daño, iniciándose una cascada inflamatoria que, además de contener al elemento agresor, permite la activación específica del sistema adaptativo. Por tanto, los signos clásicos de la inflamación aguda (tumefacción, rubor, calor y dolor) son iniciados por la inmunidad innata, si bien las células del sistema adaptativo contribuyen y potencian tales efectos ya que la inflamación surge igualmente como mecanismo efector adaptativo tras el reconocimiento del “elemento extraño” (Henson, 2005; Barton, 2008). La segunda consideración se basa en el diferente propósito fisiológico y consecuencias patológicas que, en función del estímulo, muestra la respuesta inflamatoria **(Figura 1)** (Medzhitov, 2008); como hemos dicho con anterioridad, todo proceso inflamatorio tiene un enorme valor fisiológico siempre que se desencadene de forma organizada, rápida y controlada en cuanto al daño que genera, lo que le permitirá la eliminación, resolución y reparación del daño, resolviendo la infección y recuperando la homeostasis del organismo. Sin embargo, si la respuesta inflamatoria no se controla de forma adecuada no sólo falla en su propósito de eliminar al estímulo nocivo, sino que además va a persistir en el organismos, adquiriendo nuevas características que hacen de esta respuesta inflamatoria una mayor causa de daño al hospedador que el propio estímulo que la originó inicialmente (Medzhitov, 2008).

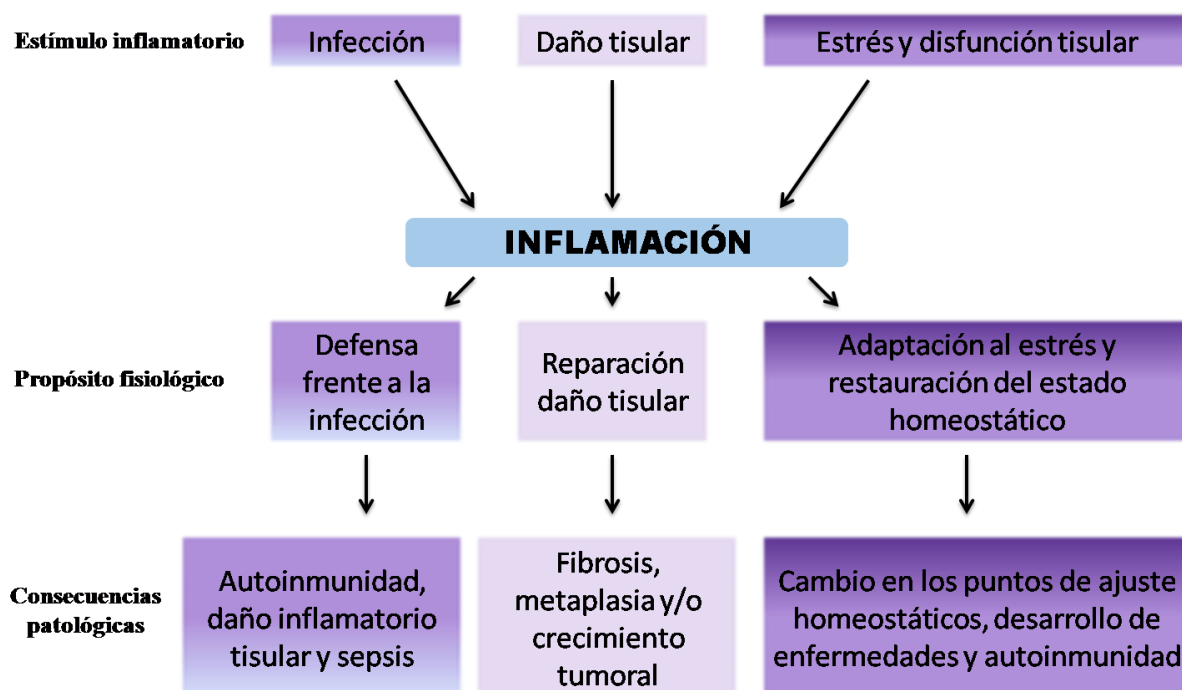


Figura 1. Causas, propósito fisiológico y consecuencias patológicas de la inflamación. En función del estímulo, la respuesta inflamatoria tiene diferentes propósitos fisiológicos y consecuencias patológicas. De los posibles estímulos, sólo la inflamación asociada a infección se acopla con una activación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

Un ejemplo claro de respuesta inflamatoria permanente asociada a daño tisular, es la que se da durante el proceso de envejecimiento. A medida que nos vamos haciendo mayores, se produce un incremento 2-4 veces mayor en los niveles séricos de mediadores pro-inflamatorios como citoquinas y proteínas de fase, reflejando así, la reacción inflamatoria crónica de bajo grado que acompaña a la edad (Franceschi y cols., 2000). La principal causa de este estado pro-inflamatorio es la sobrecarga antigénica crónica (Franceschi y cols., 1999; De y cols., 2006), que sumado a la carga genética, potencian la aparición de enfermedades inflamatorias relacionadas con el proceso de envejecimiento. Ahora bien, hay que tener en cuenta que la esperanza de vida global para el ser humano, en ambos sexos, aumentó de 65,3 años en 1990 a 71,5 años en 2013 (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2015), por lo que, en las últimas décadas, el sistema inmunitario se ha visto obligado a mantener un estado de activación durante más tiempo. Así, este período prolongado de

activación produce una serie de cambios en las células del sistema inmunológico que conducen a un proceso inflamatorio permanente que ocasionará inexorablemente un daño tisular y la aparición de enfermedades crónicas vinculadas a la edad, como son la enfermedad de Alzheimer, la aterosclerosis, la diabetes, la sarcopenia y el cáncer, todas ellas con un importante componente inflamatorio (Vasto y cols., 2007).

2.2. SEPSIS Y ENVEJECIMIENTO

Como podemos observar en la **figura 1**, de los 3 posibles estímulos iniciadores de la respuesta inflamatoria, sólo la respuesta inflamatoria inducida por un proceso infeccioso se acopla con la activación de la respuesta inmune en un estado patológico.

Un ejemplo clásico de estado inflamatorio patológico asociado a la respuesta inmune es la sepsis y sus complicaciones (sepsis severa, shock séptico y el síndrome de disfunción orgánica múltiple). La sepsis se define como una respuesta inflamatoria sistémica desproporcionada del huésped frente a la infección, aunque no específica de ésta al observarse igualmente en agresiones severas como quemaduras, traumatismos severos o pancreatitis (**Figura 2**), conduciendo a una reacción inflamatoria desregulada y generalizada que puede afectar a órganos alejados del foco inicial de infección, causando fallo multiorgánico y eventualmente la muerte (Matot y Sprung, 2001).

A pesar de las diversas revisiones sobre los conceptos clínicos de la sepsis y sus posteriores complicaciones, de las mejoras en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), y de la constante búsqueda de terapias más efectivas, la heterogeneidad etiológica mostrada por la sepsis provoca que, aún hoy en día, se asocie a ella una alta tasa de mortalidad (Ulloa y cols., 2009; Wheeler y cols., 2009).

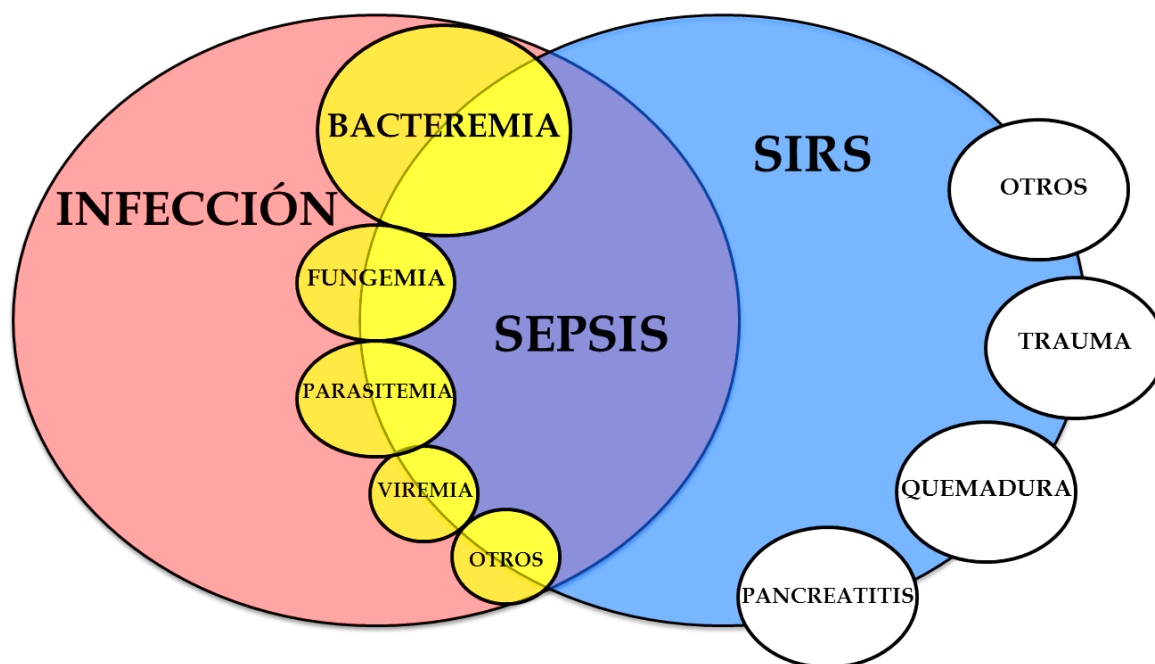


Figura 2. Interrelación entre el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis e infección. El término sepsis implica una respuesta inflamatoria como resultado de una infección. Es evidente que este tipo de respuesta, conocida como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, del inglés *Systemic Inflammatory Response Syndrome*), puede darse en ausencia de un estímulo infeccioso, como ocurre en agresiones severas como quemaduras, pancreatitis, trauma múltiple y lesión de los tejidos, quemaduras, isquemia o shock hemorrágico. Adaptada de Bone y colaboradores (Bone y colbs., 1992).

La sepsis es un problema particularmente grave en la población geriátrica, tal y como queda reflejado en la elevada tasa de incidencia y mortalidad que presentan las personas con edades avanzadas frente a esta patología (Angus y colbs., 2001). Desde 2001, la sepsis ha sido la décima causa de muerte en los pacientes mayores de 65 años en los EEUU (Starr y Saito, 2014). Además, las personas mayores constituyen la mayor proporción (58-65%) de los pacientes con sepsis (Angus y colbs., 2001; Martin y colbs., 2006; Dombrovskiy y colbs., 2007). Angus y colaboradores determinaron que la incidencia de la sepsis grave se incrementa más de 100 veces con la edad (de 0,2 casos por cada 1.000 niños, a 5,3 casos por cada 1.000 pacientes de entre 60 y 64 años, y 26,2 casos por cada 1.000 pacientes mayores de 85 años) y que la mortalidad aumenta del 10% en niños al 26% en pacientes de entre 60 y 64 años, y al 38% en aquellos mayores de 85 años (Angus y colbs., 2001). Por otro lado, Martin y

colaboradores encontraron que la incidencia de la sepsis (todos los casos, no sólo la sepsis severa) se incrementa de forma exponencial en todas las edades adultas con una tasa de letalidad del 27,7% para las personas mayores de 65 años frente al 17,7% para aquellos menores de 65 años (Martin y colbs., 2006). Estos investigadores también reportaron que los ancianos eran un 26% más propensos a morir durante la primera semana de hospitalización por sepsis que sus homólogos más jóvenes (Martin y colbs., 2006). Además, Dombrovskiy y colaboradores reportaron que en el año 2003 la tasa de incidencia de la sepsis grave fue de 7,05-7,15 casos por cada 100.000 niños, de 161-197 casos por cada 100.000 personas con edades comprendidas entre los 50 y 64 años, de 442,2-596,7 casos por cada 100.000 personas con edades comprendidas entre los 65 a 79 años, y de 912-1320 casos por cada 100.000 personas mayores de 85 años (Dombrovskiy y colbs., 2007). Cabe destacar que muchos de los pacientes ancianos que mueren como consecuencia de una infección, no se documentan como "sepsis" ya que a menudo reciben cuidados paliativos en lugar de ser enviados a la UCI para el tratamiento agresivo (Starr y Saito, 2014). A nivel nacional, el análisis de altas hospitalarias del año 2001 en la Comunidad de Madrid describe una incidencia de 14,1 episodios de sepsis grave por cada 10.000 habitantes, siendo máxima en los mayores de 84 años con una incidencia de 230,8 casos por cada 10.000 habitantes. La edad media fue de 62,5 años, y la mortalidad media del 33%, con un coste hospitalario que asciende a 70 millones de euros, 26 de los cuales se destinan a la atención de pacientes que no sobreviven a la patología (Inigo y colbs., 2006).

Todos estos datos epidemiológicos nos ayudan a entender por qué, a nivel experimental, los ratones con edades avanzadas son más propensos a morir por sepsis que los jóvenes, asociándose este hecho a una mayor sensibilidad de los ratones envejecidos a la infección bacteriana invasiva, y a un mayor proceso inflamatorio sistémico y local (Hyde y colbs., 1990; Turnbull y colbs., 2009). Por otro lado se ha podido observar que la susceptibilidad de los pacientes con edades avanzadas a la infección aumenta como consecuencia directa del

marcado descenso en la función inmune humoral y celular que acompaña al envejecimiento, lo cual implica defectos en la función de las células B y T y, en definitiva, una menor habilidad para ejecutar una respuesta rápida, específica y efectiva frente a nuevos patógenos (Opal y cols., 2005). Igualmente, esta mayor susceptibilidad y mortalidad está causada por el incremento en la expresión y actividad de la óxido nítrico sintasa inducible citosólica y mitocondrial (iNOS e i-mtNOS respectivamente), estrés oxidativo y fallo severo hepático y pulmonar que acompaña al envejecimiento (Escames y cols., 2006b).

2.3. ACTIVACIÓN DE LA INMUNIDAD INNATA: RECEPTORES Y EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO

El sistema inmune innato es capaz de reconocer estructuras antigénicas altamente conservadas en diversos microorganismos que, en su conjunto, reciben el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Estos PAMPs son reconocidos por receptores propios del sistema inmune innato que reciben el nombre de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptor*). Todos los PRR presentan, desde un punto de vista estructural, un dominio específico para el reconocimiento de PAMPs y una región de interacción proteína-proteína esencial para iniciar los procesos de señalización celular (Medzhitov, 2007). Los distintos tipos de PRR se pueden agrupar según las diferencias funcionales que presentan:

- a) **PRR secretados** y presentes tanto en fluidos corporales como en el espacio extracelular, entre los que se incluyen receptores del complemento, proteína C reactiva, proteína componente P amiloide sérico o la proteína relacionada con la pentraxina PTX3.
- b) **PRR transmembrana**, entre los que se encuentran los receptores de tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll-like Receptors*) y los receptores tipo lectina C (CLRs, del inglés *C-type*

Lectin Receptors), expresados ambos sobre la membrana celular o sobre lisosomas/endosomas, y gracias a los cuales se lleva a cabo el reconocimiento inmune sobre células no infectadas para desencadenar, en consecuencia, una respuesta efectora antimicrobiana (Iwasaki y Medzhitov, 2010).

- c) **PRR citosólicos**, incluidos los receptores tipo RIG-I (RLRs, del inglés *Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like Receptors*) y los receptores NLRs (del inglés *Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat containing Receptors*). Ambos actúan como sensores intracelulares detectando la presencia de virus, productos microbianos, sustancias relacionadas con el estrés celular o partículas cristalinas de origen no infeccioso. De este modo, los PRR citosólicos median la respuesta inmune una vez que la célula está infectada, cooperando asimismo con los PRR transmembrana a la hora de dar continuidad a la señalización intracelular asociada a la presencia de un elemento “extraño” (Martinon y colbs., 2009; Pichlmair y Reis e Sousa, 2007).

Un aspecto clave a considerar es que la respuesta inmune a un determinado patógeno no se limita exclusivamente a su reconocimiento por un único PRR, sino que implica cooperaciones complejas entre distintos receptores, células inmunes y mediadores. Además, un mismo patógeno presenta múltiples PAMPs que serán reconocidos por diferentes tipos de PRR, sin olvidar que un mismo PAMP puede ser reconocido por diferentes PRR. Por lo tanto, la conexión que se establece entre los diferentes PRR va a mostrar tanto un efecto cuantitativo (las respuestas sinérgicas entre PRR permiten responder eficientemente a bajas concentraciones del PAMP) como cualitativo (la activación de un PRR por su PAMP específico desencadena la activación de otros PRR relacionados), lo que se traduce en un aumento en la capacidad del hospedador de detectar cualquier patógeno y responder de forma eficiente (Ishii y colbs., 2008) (**Figura 3**).

No obstante, una respuesta inflamatoria desproporcionada puede causar muerte celular y daño tisular en el propio hospedador, con la consecuente liberación de componentes celulares al medio extracelular. Estos componentes o señales de peligro reciben de forma conjunta el nombre de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, del inglés *Damage-Associated Molecular Patterns*), e incluyen tanto proteínas celulares (HMGB1, del inglés *High-mobility group protein B1*, interleuquina-1, SAP130, del inglés *Histone deacetylase dependent SIN3A*) como moléculas relacionadas con ácidos nucleicos (DNA, ATP o ácido úrico). A pesar de mostrar un papel importante a la hora de combatir a los patógenos, estos DAMPs pueden ser reconocidos por algunos de los PRR especificados anteriormente, lo que desencadena no sólo una mayor respuesta inflamatoria contra el patógeno sino también un fallo importante en la regulación de las vías inflamatorias (Matzinger, 1998; El y cols., 2007; Jounai y cols., 2012).

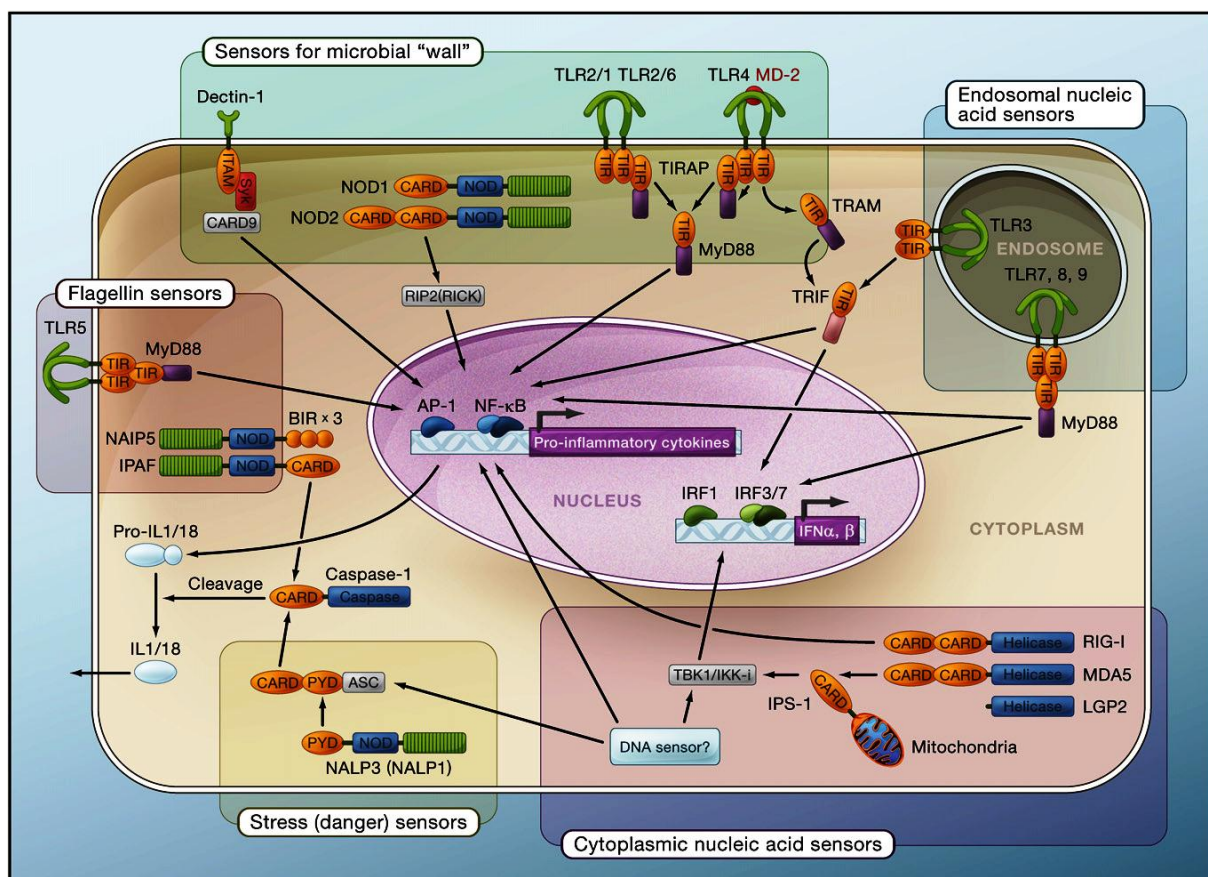


Figura 3. Comunicación entre los PRR y amplificación de la respuesta inflamatoria (Ishii et al, 2008).

Los mecanismos que subyacen durante el proceso inflamatorio basal asociado al envejecimiento parecen implicar cambios en el número y funciones de las células de la inmunidad innata, con alteraciones en la expresión y cascada de señalización iniciada por la activación de los PRR, que conducen finalmente a una secreción descontrolada de mediadores pro-inflamatorios. Así, la cascada de señalización iniciada por estos receptores juega un papel crucial en la conexión entre la respuesta innata y adaptativa a través de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas coestimuladoras. Durante el envejecimiento, se ha observado que se produce una disminución en la expresión de los TLR en células del sistema inmune innato (Shaw y cols., 2013). De hecho, uno de los primeros estudios que evaluaron la función de los TLR en ratones C57BL/6 envejecidos mostró una disminución general en la expresión génica de todos estos receptores (TLR1-TLR9) y una inducción en la producción de TNF α e IL-6 dependientes de TLR en macrófagos peritoneales y esplénicos, así como una reducción en el contenido proteico de TLR4 (Renshaw y cols., 2002). Estos datos proporcionan una evidencia clara del deterioro en la función de los TLR, con el consiguiente aumento de la respuesta inflamatoria debido al aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias durante el envejecimiento (**Figura 4**).

Por otro lado, se conoce muy poco sobre los efectos que tiene la edad en el funcionamiento de los PRR citosólicos NLRs. En concreto, un estudio de 2013 con ratones envejecidos deficientes en NLRP3 (del inglés *NACHT-, LRR- and PYD domains-containing Protein 3*) demostró la implicación del inflamasoma NLRP3 en la inflamación sistémica asociada a la edad en tejido adiposo y cerebro, de manera que la ausencia de esta proteína mejoró la tolerancia a la glucosa, así como las pruebas de memoria y aprendizaje en los ratones de edad avanzada (Youm y cols., 2013). A parte de este trabajo, las revisiones de Shaw y colaboradores (Shaw y cols., 2013) y, Feldman y colaboradores (Feldman y cols., 2015), reportaron la posible conexión existente entre la activación del inflamasoma NLRP3, mediada por el reconocimiento de DAMPs, y el establecimiento del estado inflamatorio

crónica de bajo grado que acompaña al envejecimiento y a las enfermedades asociadas a este proceso.

En conjunto, todos estos hallazgos relacionan muy bien la desregulación en la activación de la inmunidad innata y el proceso pro-inflamatorio permanente que se da con la edad (Figura 4).

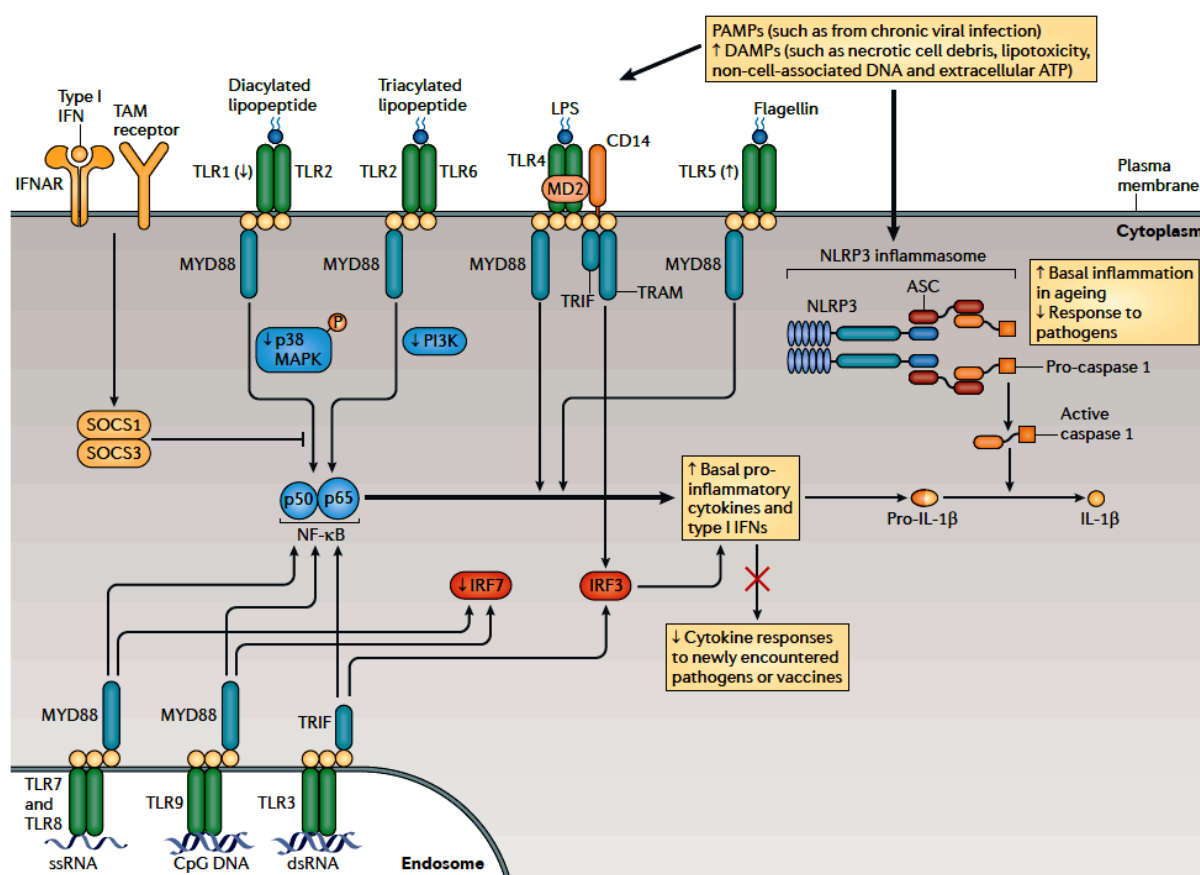


Figura 4. Efectos del envejecimiento sobre la señalización de la inmunidad innata dependiente de los PRR. Representación de las vías de señalización mediadas por TLR y NLRP3 durante el envejecimiento, el cual cursa con niveles altos de PAMPs y DAMPs. dsRNA, ARN de doble cadena; IFN, interferón; IFNAR, receptor IFN α/β ; IL-1 β , interleuquina-1 β ; IRF, factor regulador IFN; LPS, lipopolisacárido; MD2, factor de diferenciación mieloide 2; MYD88, proteína 88 de respuesta primaria a diferenciación mieloide; NF- κ B, factor nuclear kappa B; PI3K, fosfoinositol 3-quinasa; SOCS, supresor de la señalización de citoquinas; ssARN, ARN de cadena sencilla; TAM, TYRO3, AXL y MER, molécula adaptadora relacionada con TRIF-; TRIF, proteína adaptadora inductora de IFN β con dominio TIR (Shaw y cols., 2013).

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

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

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

En mamíferos, la familia de factores de transcripción NF- κ B/Rel consta de cinco miembros identificados como p105/p50, p100/p52, p65 (RelA), c-Rel y RelB. Estas distintas subunidades tienen la capacidad para formar homo o heterodímeros *in vivo*, con excepción de RelB que sólo forma heterodímeros *in vitro*. Una vez formados, estos dímeros se unen a sitios específicos presentes en el DNA, denominados sitios *kappaB*, constituidos por 9-10 pares de bases de gran variabilidad: 5'-GGGRNWYYCC-3', donde: R es adenina o guanina,

N es cualquier nucleótido, W es adenina o timina e Y es citosina o timina (Gilmore, 2006). Sin embargo, los distintos homo y heterodímeros muestran diferente habilidad a nivel transcripcional. Así, por ejemplo, los heterodímeros p65/p50, que constituyen la forma mayoritaria, promueven fuertemente la transcripción de genes (efecto que es consecuencia de la actividad de p65, limitándose el papel de p50 a facilitar la unión al DNA), mientras que los homodímeros p50/p50 reprimen la transcripción génica tras su unión a los sitios *kappaB* (Schmitz y Baeuerle, 1991; Grimm y Baeuerle, 1993). Como rasgo común, todos los miembros de la familia comparten un dominio N-terminal homólogo a Rel altamente conservado (RHD, del inglés *Rel Homology Domain*) constituido por secuencias de 300 aminoácidos que resultan clave en la dimerización de los diferentes miembros, unión al DNA e interacción con los inhibidores I κ B (**Figura 5**). En dicho dominio también se identifica una secuencia de localización nuclear (NLS, del inglés *Nuclear Localization Sequence*) que permite a estas proteínas translocarse al núcleo y llevar a cabo su función transcripcional (Gilmore, 1990). Por otro lado, las diferencias presentes en las secuencias de la región C-terminal permiten clasificar a la familia NF- κ B/Rel: c-Rel, p65 y RelB contienen un dominio C-terminal de activación de la transcripción susceptible de sufrir modificaciones post-translacionales que potencian su unión al DNA y actividad transcripcional. Por el contrario, NF- κ B1 (p105/p50) y NF- κ B2 (p100/p52) presentan en esta región repeticiones ricas en ankirina que actúan como sitios de interacción proteína-proteína (**Figura 5**). Además, NF- κ B1 y 2 son sintetizados como largos polipéptidos de 105 y 100 KDa, respectivamente, que serán “rotos” post-transcripcionalmente para generar las subunidades de unión al DNA p50 y p52 (Betts y Nabel, 1996).

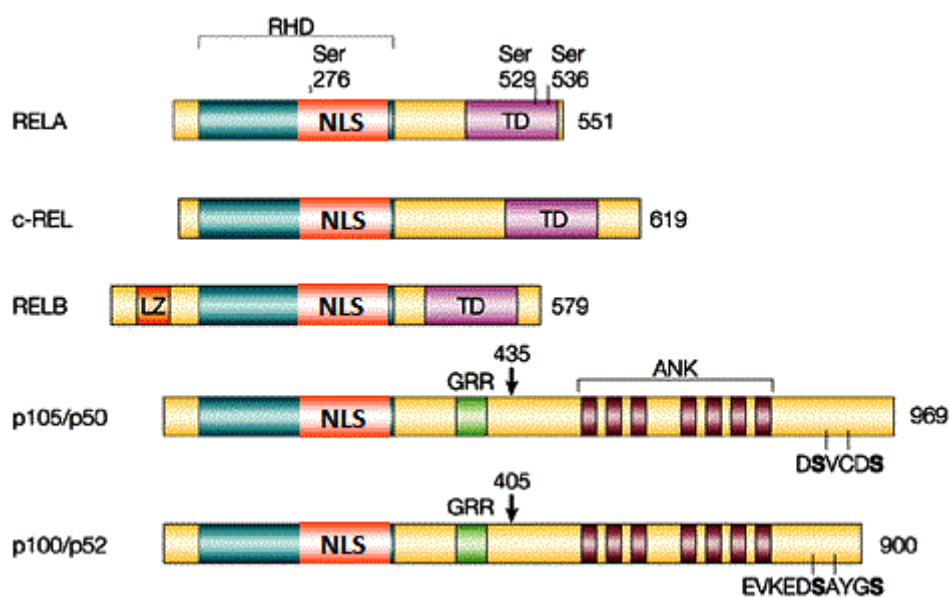


Figura 5. Miembros de la familia NF-κB/Rel. El número de aminoácidos de cada proteína en humanos se indica a la derecha. En RELA (p65) se indica los principales residuos que sufren modificaciones post-traslacionales clave para su activación transcripcional (Ser276, Ser529 y Ser536). En p105/p50 y p100/p52 se indican los sitios donde tiene lugar su procesamiento proteolítico, en los residuos 435 y 405 (flechas negras), generando las subunidades de NF-κB p50 y p52, respectivamente. La región rica en glicina (GRR) y los sitios C-terminal de fosforilación inducible (secuencias DSVCS y EVKEDSAYGS para p105 y p100, respectivamente) son necesarios para el procesamiento proteolítico. RHD, dominio homólogo a Rel; NLS, secuencia de localización nuclear; TD, dominio de transactivación; LZ, dominio cremallera de leucina; ANK, repeticiones ricas en ankirina (Li y Verma, 2002).

3.2. INHIBICIÓN Y ACTIVACION DE NF-κB

Los miembros de la familia NF-κB/Rel son activados por una amplia variedad de estímulos, incluyendo citoquinas de carácter pro-inflamatorio como TNFα o IL-1β, mitógenos de células B o T, bacterias y sus productos bacterianos como el LPS, virus y proteínas virales, RNA de doble cadena o incluso situaciones de estrés físico o químico (Karin y Ben-Neriah, 2000). El correcto reconocimiento de estos ligandos por sus receptores específicos conlleva la activación de NF-κB, la cual puede llevarse a cabo mediante dos posibles vías de activación, canónica y no canónica. De estas dos vías, describiremos brevemente la primera, ya que es la

que se activa principalmente en respuesta a productos bacterianos y señales pro-inflamatorias, con un papel clave en la patogénesis de enfermedades inflamatorias, incluida la sepsis. En esta vía, la translocación nuclear de los heterodímeros p50/p65 tiene lugar gracias a la fosforilación y posterior degradación del inhibidor I κ B α .

En células en estado de reposo, los dímeros de NF- κ B residen en el citosol en forma inactiva gracias a su unión con proteínas inhibidoras pertenecientes a la familia I κ B, principalmente la isoforma I κ B α . Este inhibidor presenta 6 repeticiones de ankirina a través

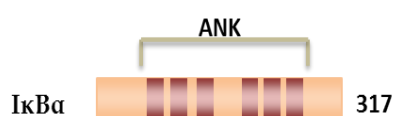


Figura 6. Estructura de I κ B α . ANK, repeticiones ricas en ankirina

de las cuales se une al dominio RHD de NF- κ B (**Figura 6**), enmascarando la secuencia NLS para así evitar su translocación nuclear (Verma y cols., 1995). Además, el efecto de este inhibidor sobre NF- κ B no sólo es

citoplasmático ya que es capaz de entrar al núcleo, posiblemente gracias a la presencia de NLS (Malek y cols., 2001), y secuestrar a NF- κ B deacetilado y no unido a histonas, transportándolo al citoplasma gracias a la existencia de secuencias de exporte nuclear (NES, del inglés *Nuclear Export Signal*) en I κ B α (Chiao y cols., 1994; Arenzana-Seisdedos y cols., 1995; Arenzana-Seisdedos y cols., 1997; Chen y cols., 2001).

Como podemos observar en la **figura 7**, tras el reconocimiento del ligando por su receptor específico, LPS para TLR4 e IL-1 para IL-1R, se desencadena el reclutamiento y fosforilación de una serie de quinasas específicas serina/treonina esenciales para permitir la transmisión de señales desde el receptor al carecer éste de actividad quinasa intrínseca (Janssens y Beyaert, 2003). La activación de estas quinasas adaptadoras permitirá la fosforilación y activación de las subunidades catalíticas α y β del complejo IKK (del inglés *I κ B Kinase Complex*). Estas subunidades van a fosforilar al inhibidor I κ B α en residuos específicos de serina (Ser32 y Ser36) presentes en el extremo N-terminal, conduciendo a su ubiquitinación en residuos específicos de lisina (Lys21 y Lys22). Ambas modificaciones marcan al inhibidor

para su rápida degradación por el proteosoma 26S, lo que deja expuesta la secuencia NLS de NF- κ B, permitiendo su translocación al núcleo (Alkalay y cols., 1995; Lin y cols., 1995). Como evento final y, una vez en el interior del núcleo, el factor de transcripción NF- κ B sufre una serie de modificaciones, principalmente fosforilaciones y acetilaciones, que afectan a su habilidad para activar la transcripción de sus genes diana; en este sentido, numerosos estudios proponen que la fosforilación de p65 en su residuo Ser276 por la proteína quinasa A (PKA, del inglés *Protein Kinase A*) aumenta su actividad transcripcional al facilitar la interacción de p65 con el coactivador CBP/p300 (del inglés *CREB-Binding Protein and p300*), presentando éste una actividad histona acetiltransferasa intrínseca necesaria para abrir la estructura de la cromatina (Karin y Ben-Neriah, 2000). Más importante aún, el estado acetilado de p65 va a determinar la eficiencia de su interacción con I κ B α . Así, la acetilación de p65 en su residuo Lys310 mediada por CBP/p300 causa una débil interacción entre p65 e I κ B α , mientras que la subsecuente deacetilación por la interacción específica de p65 con histonas deacetilasas, como por ejemplo la histona deacetilasa HDAC3 (del inglés, *Histone Deacetylase Type 3*) o la deacetilasa dependiente de NAD⁺ sirtuina-1 (SIRT1, del inglés *Silent mating type Information Regulation 2 homolog*), hace que esta unión p65: I κ B α sea más estable, lo que permite a este complejo salir del núcleo y restaurar el *pool* citosólico p65: I κ B α (Chen y cols., 2001; Yeung y cols., 2004).

Finalmente, y como se deduce de lo comentado durante este apartado, el carácter inducible de la respuesta transcripcional dependiente de NF- κ B implica la existencia de diferentes mecanismos de retroalimentación negativa puestos en marcha tras el reconocimiento de la señal activadora. Además, dichos mecanismos se caracterizan por presentar marcadas diferencias en su reversibilidad y efectividad, lo que desencadena una respuesta bifásica en condiciones de estimulación crónica: una actividad transcripcional de NF- κ B completa y sin restricciones en una ventana temporal temprana, seguida de una fase de menor expresión génica dado que los principales reguladores negativos son genes diana

de NF- κ B (Renner y Schmitz, 2009). Tal y como hemos mencionado anteriormente, el principal mecanismo de retroalimentación negativa estudiado es el dependiente de la proteína inhibidora I κ B α , importancia que se fundamenta en: a) enmascaramiento de NLS de p65, con la consiguiente localización citoplasmática del complejo inactivo NF- κ B: I κ B α , y b) rápida transcripción de I κ B α dependiente de NF- κ B al determinarse la existencia de sitios *kappaB* en el promotor del gen I κ B α .

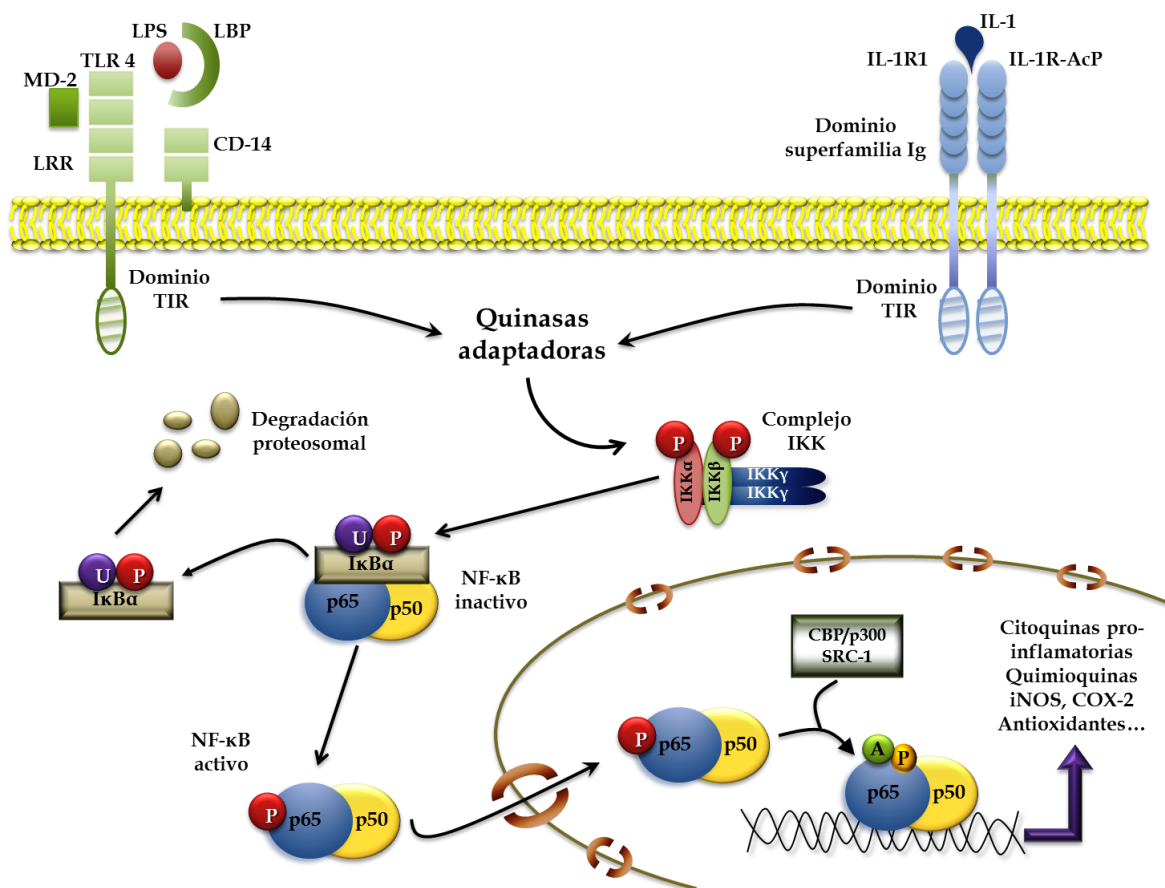


Figura 7. Vía de activación canónica de NF- κ B a partir de señales pro-inflamatorias clásicas como IL-1 β o lipopolisacárido (LPS). Ver texto para más detalles y nomenclatura de las principales moléculas implicadas. P, fosforilación; U, ubiquitinización; A, acetilación. Adaptado de Janssens y Beyaert, 2003.

3.3. PAPEL DE NF- κ B DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

En base a la idea de que la regulación transcripcional, junto con los factores de transcripción específicos, son la base de la morfogénesis tisular que tiene lugar durante el

desarrollo, se podría argumentar que si el envejecimiento está regulado genéticamente, deberían existir cambios a nivel transcripcional durante este proceso (Salminen y cols., 2008).

Hace casi 20 años atrás Helenius y colaboradores evaluaron, en extractos nucleares de varios tejidos procedentes de roedores jóvenes y viejos, la capacidad de unión al DNA de una serie de factores de transcripción (NF- κ B, AP-1 y Sp-1), encontrando un incremento significativo en la unión al DNA de los complejos de NF- κ B en todos los tejidos de los animales viejos, lo que indica una activación de la vía de este factor nuclear durante el envejecimiento (Helenius y cols., 1996a; Helenius y cols., 1996b). Sin embargo, el patrón de unión de los complejos de NF- κ B al DNA no presentó diferencias entre los animales jóvenes y viejos, indicando que el envejecimiento no afecta a la composición proteica de los componentes de este factor de transcripción, pero si a su capacidad transcripcional. Por otro lado, la capacidad de unión al DNA de AP-1 y Sp-1 no se modificó o se vio disminuida con la edad, demostrando la importancia que juega la activación de NF- κ B durante el proceso de envejecimiento, a diferencia de otros factores de transcripción relacionados también con la activación del sistema inmunitario. De acuerdo con esto, en un estudio posterior, Helenius y colaboradores observaron en hígado de rata envejecida que los niveles de los componentes de NF- κ B, p52 y p65, aumentaban de forma considerable en la fracción nuclear, pero sin modificarse en la citosólica (Helenius y cols., 2001).

Esta activación “constitutiva” de NF- κ B asociada a la edad ha sido demostrada también por otros estudios (Korhonen y cols., 1997; Spencer y cols., 1997; Kim y cols., 2000; Kim y cols., 2002b; Zhang y cols., 2013). Así, por ejemplo, Spencer y colaboradores demostraron una activación constitutiva de NF- κ B con la edad tanto en tejidos linfoides como células aisladas del sistema inmunitario. Además, mostraron que el tratamiento dietético con α -tocoferol y un agonistas de PPAR α (del inglés *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha*)

disminuía la expresión, dependiente de la unión de NF- κ B al DNA, de IL-6 e IL-12 (Spencer y cols., 1997). Kim y colaboradores también demostraron que los antioxidantes reducen la activación de NF- κ B asociada a la edad (Kim y cols., 2006). Estas observaciones sugieren que el estrés oxidativo desempeña un papel importante en la activación de NF- κ B durante el envejecimiento. Además, la activación constitutiva de NF- κ B observada en las células del sistema inmunitario, junto con la sobrecarga antigénica crónica, podrían ser unos de los factores causantes de la inmunosenescencia (Salminen y cols., 2008). Sin embargo, tal y como reportaron Giardina y Hubbard en una revisión de 2002, existen estudios en los que se demuestra que la pérdida de respuesta asociada a la edad por parte de los linfocitos T periféricos se debe a una reducción significativa en la activación de NF- κ B (Giardina y Hubbard, 2002). Esta disminución en la actividad de NF- κ B en células T envejecidas se puede explicar por una deficiencia que tiene lugar en una etapa previa a la degradación proteosomal del inhibidor I κ B α , y que involucra cambios en la actividad de la proteína quinasa A. Así, los linfocitos T envejecidos presentan una menor actividad proteosomal y, por tanto, menor capacidad para degradar a I κ B α , lo que se traduce en una menor translocación nuclear de NF- κ B (Giardina y Hubbard, 2002). Este último hallazgo, no obstante, nos da una idea tanto de la complejidad del proceso de envejecimiento como de la manera altamente específica en la que las células regulan su propia actividad de NF- κ B.

Otro enfoque que nos ayuda a entender el papel que tiene la vía de señalización dependiente de NF- κ B durante el proceso de envejecimiento, es a través del estudio de las interacciones de este factor de transcripción con las distintas redes de señalización relacionadas con la edad. En este sentido, la deacetilasa dependiente de NAD⁺ SIRT1, la cual actúa como factor de supervivencia y resistencia al estrés durante el envejecimiento (Donmez y Guarente, 2010), juega un papel clave al unirse físicamente al complejo NF- κ B, inhibiendo su actividad transcripcional mediante la deacetilación de la subunidad p65 (Yeung y cols.,

2004). Así, la disminución en los niveles de NAD⁺ que se da durante el envejecimiento, reduce drásticamente la actividad deacetilasa de SIRT1, lo que conduce a una mayor actividad transcripcional de NF-κB (Jenwitheesuk y cols., 2014).

En conjunto, todos estos datos evidencian que la señalización dependiente de NF-κB es una de las principales responsable del establecimiento del estado pro-inflamatorio crónico asociado con la edad, ya que este sistema de señalización integra la regulación intracelular de la respuesta inmune tanto en el envejecimiento como en las enfermedades relacionadas a este proceso.

3.4. PAPEL DE NF-κB DURANTE LA SEPSIS

El shock séptico es un síndrome clínico de etiología diversa causado por una enorme variedad de bacterias, productos bacterianos y citoquinas pro-inflamatorias, que una vez liberadas, muestran como diana final la activación de NF-κB. El nivel de activación de este factor nuclear se correlaciona positivamente con la severidad de la enfermedad al monitorizarse una actividad mayor en pacientes sépticos que no sobreviven en comparación con aquellos que sí lo hacen (Bohrer y cols., 1997; Arnalich y cols., 2000; Fan y cols., 2001). La importancia que juega la activación de NF-κB durante la patología de la sepsis en ratones queda más que demostrada con el trabajo de García y colaboradores (García y cols., 2015). Una vez activado, NF-κB media la transcripción de numerosos genes clave en la respuesta inmune innata, entre los que se incluyen citoquinas (factor estimulante de colonias de macrófagos, granulocitos, TNF α , IL-1 β , IL-2, 3, 12 o 18...), quimioquinas (IL-8, proteínas inflamatorias de macrófagos, CCL5,...), moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina...), inmunoreceptores, enzimas pro-oxidantes (óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), ciclooxigenasa-2 (COX-2), lipoxigenasa) o proteínas de la fase aguda, todos ellos con un papel clave en diferentes eventos implicados en la fisiopatología de la sepsis: aparición de los signos clásicos de inflamación, amplificación de la respuesta inflamatoria, coagulación

intravascular diseminada, hipotensión sistémica, menor contractibilidad cardíaca, hiperreactividad vascular y daño endotelial microvascular (Liu y Malik, 2006) (Figura 8).

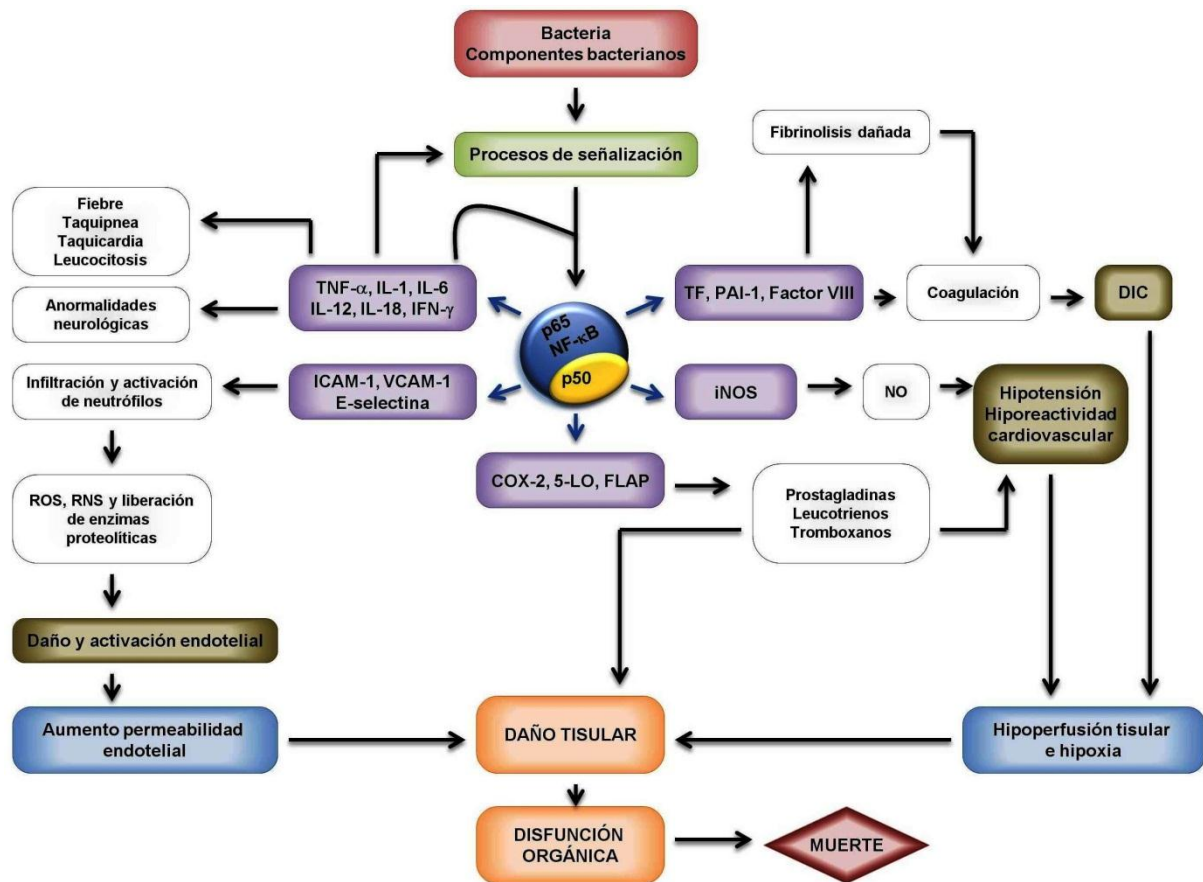


Figura 8. La activación de NF-κB juega un papel central en la fisiopatología del shock séptico. TF, factor tisular; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno-1 ; TNF α , factor de necrosis tumoral alfa; IL, interleuquina; IFN- γ , interferón gamma; ICAM-1, molécula de adhesión intercelular 1; VCAM-1, proteína de adhesión celular vascular; COX-2, ciclooxigenasa 2; 5-LO, 5-lipooxigenasa; FLAP, proteína activadora de la 5-lipooxigenasa; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible, NO, óxido nítrico; DIC, coagulación intravascular diseminada; ROS, especies reactivas de oxígeno; RNS, especies reactivas de nitrógeno. Adaptado de Liu y Malik, 2006.

El estrés oxidativo, definido como el desbalance entre la formación de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés *Reactive Nitrogen Species*) y su correcta eliminación por los sistemas antioxidantes endógenos (Figura 9), constituye otro importante nexo de unión entre NF-κB y la fisiopatología de la sepsis. En mamíferos, la mayoría de las ROS se forman durante la respiración celular, si bien también son producidas por los leucocitos

como parte de la defensa normal del huésped contra los microorganismos invasores (Webster y Nunn, 1988). No obstante, las ROS son importantes mensajeros intracelulares que participan activamente en la vía clásica de NF- κ B, bien como producto de su activación o como agente causal, demostrándose que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o hidroperóxidos orgánicos activan NF- κ B de forma temporal y dosis-dependiente (Zhou y cols., 2001; Horton, 2003). Asimismo, las diferentes citoquinas pro-inflamatorias cooperan a la hora de inducir la iNOS, generándose una sobreproducción de óxido nítrico (NO^\bullet) y RNS que aumentan aún más el daño celular durante el proceso séptico (Lanone y cols., 2000). Esta producción descontrolada desencadena una vasodilatación excesiva y depresión miocárdica durante el shock séptico (Weitzberg, 2005), menor depuración del H_2O_2 por la catalasa (Brown, 2001) y generación de nuevas ROS/RNS como los peroxinitritos (ONOO^-) al reaccionar con el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Lipton y cols., 1993). Todos estos eventos van a extender el daño oxidativo, afectando negativamente a la función celular.

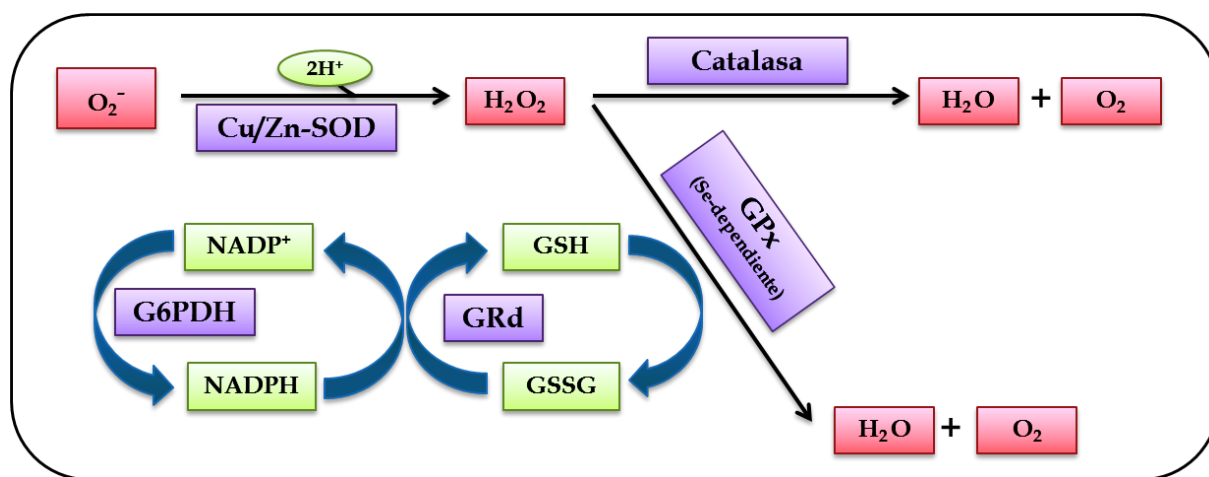


Figura 9. Sistemas antioxidantes enzimáticos citosólicos. La reducción univalente del oxígeno molecular origina la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$, el cual será dismutado a H_2O_2 por acción de la superóxido dismutasa dependiente de Cu/Zn (Cu/Zn-SOD). Este H_2O_2 puede ser depurado a H_2O y O_2 bien por acción de la catalasa o bien por acción de la glutatión peroxidasa (GPx). Esta última utiliza glutatión (GSH) para tal conversión y, en consecuencia, se oxida a GSSG, siendo necesario un sistema de reciclaje que restaure los niveles de GSH. Así, la glutatión reductasa (GRd) reduce el GSSG a GSH, requiriendo para ello el poder reductor del NADPH que pasa a NADP^+ , restableciéndose nuevamente los niveles de NADPH por acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

En la mitocondria, los elevados niveles de NO^\bullet producidos por la i-mtNOS reducen la transferencia de electrones a lo largo de la cadena de transporte electrónico y, como consecuencia del mayor escape de electrones, tiene lugar una mayor producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y ONOO^- . Tal situación de estrés oxidativo/nitrosativo mitocondrial causa la inhibición de los cuatro complejos respiratorios y la ATP sintasa, disminuyendo la síntesis de ATP y afectando profundamente a la función mitocondrial (Escames y cols., 2003; Escames y cols., 2006c).

En definitiva, dado que la respuesta inmune innata dependiente de la activación de NF- κ B controla procesos tan diversos, es necesario un mejor conocimiento de todos los mecanismos moleculares que desencadenan dicha activación para poder dar con una terapia efectiva contra la sepsis.

4. FAMILIA DE RECEPTORES NLR DE LA INMUNIDAD INNATA: IMPORTANCIA DEL INFLAMASOMA NLRP3

Como ya hemos mencionado, una respuesta inflamatoria desproporcionada puede causar muerte celular y daño tisular, con la consecuente acumulación de señales de peligro o DAMPs, al tiempo que se da la activación de la vía clásica de NF- κ B, tal y como ocurre durante el envejecimiento y la sepsis. Una vez liberados, estos DAMPs serán reconocidos, entre otros PRRs, por la familia NLRs. De este modo, los NLRs cooperan con los receptores transmembrana TLRs a la hora de activar la respuesta inmune innata y procesos de apoptosis mediante la formación de complejos de señalización, tales como inflamasomas y signalosomas NOD (del inglés, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*) (Martinon y cols., 2002).

4.1. RECEPTORES TIPO NOD

Los receptores tipo NOD, NOD1 y NOD2, son receptores citosólicos especializados en detectar la presencia de peptidoglucanos bacterianos liberados tras la fagocitosis de la bacteria, si bien las estructuras que detectan son diferentes. Así, NOD2 detecta muramil dipéptido, constituyente de la pared celular de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, mientras que NOD1 reconoce de forma exclusiva el ácido meso-diaminopimélico característico de bacterias Gram-negativas (Girardin y Philpott, 2004). Una vez activados, NOD1 y NOD2 inician una respuesta inflamatoria a través del reclutamiento de la proteína RIP2 (del inglés *Receptor Interactin Protein 2*). La oligomerización de RIP2 permite al signalosoma NOD unirse directamente a IKK γ , mediar su ubiquitinización ligada a K63 (Lys63) y su posterior degradación proteosomal; como consecuencia, se activan las subunidades catalíticas IKK α e IKK β que actuarán a nivel del inhibidor I κ B α , induciendo su

degradación por parte del proteosoma 26S y la consecuente translocación de NF- κ B al núcleo (Tattoli y cols., 2007).

4.2. INFLAMASOMA NLRP3

Tres miembros de la familia NLR, concretamente los receptores NLRP1, NLRP3 y NLRC4, junto con la proteína inducible por interferón AIM-2 (del inglés *Absent In Melanoma 2*), tienen la capacidad para formar inflamomas, que se definen como unos complejos multiproteicos de alto peso molecular que regulan la activación de las caspasas inflamatorias y, en consecuencia, la maduración de sus respectivos sustratos (Martinon y cols., 2002; Agostini y cols., 2004). Estas caspasas son producidas en forma de proenzimas inactivas catalíticamente que, una vez detectada la señal, se integran y dimerizan en el inflamoma, lo que desencadena su activación mediada por procesamiento proteolítico a fin de conducir a la maduración de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-18 e IL-33 (Martinon y cols., 2009).

De los diversos tipos de inflamoma, el mejor caracterizado y estudiado hasta el momento es el constituido por el receptor NLRP3 o NALP3, la proteína adaptadora ASC (del inglés *Apoptosis-associated Speck-like protein Containing a caspase recruitment domain*) y la cisteína-proteasa caspasa-1 (Agostini y cols., 2004). Como podemos observar en la **figura 10**, el receptor NLRP3 consta de 3 dominios claramente diferenciados: un dominio N-terminal denominado PYD (del inglés *Pyrin Domain*), un dominio central NATCH-NAD (dominio de oligomerización y unión a nucleótido) y un dominio C-terminal LRR (dominio con repeticiones ricas en leucina). NLRP3 se expresa constitutivamente y de forma inactiva en el citoplasma dada la interacción interna que se establece entre los dominios NATCH-NAD y LRR del receptor. Sin embargo, en presencia de las señales activadoras adecuadas, la proteína NLRP3 sufre importantes modificaciones conformacionales que exponen el dominio central NATCH-NAD, lo que permite la asociación de la proteína adaptadora ASC, a través de interacciones de tipo PYD, y la interacción con la pro-caspasa-1 mediante interacciones

tipo CARD (del inglés *Caspase Activation and Recruitment Domain*). Como consecuencia de estas modificaciones conformacionales e interacciones, se induce la actividad proteolítica de la caspasa-1 y el subsecuente procesamiento de las citoquinas pro-inflamatorias pro-IL1 β , pro-IL-18 y pro-IL33 a sus formas activas IL-1 β , IL-18 e IL-33, respectivamente (Dunne, 2011) (Figura 10).

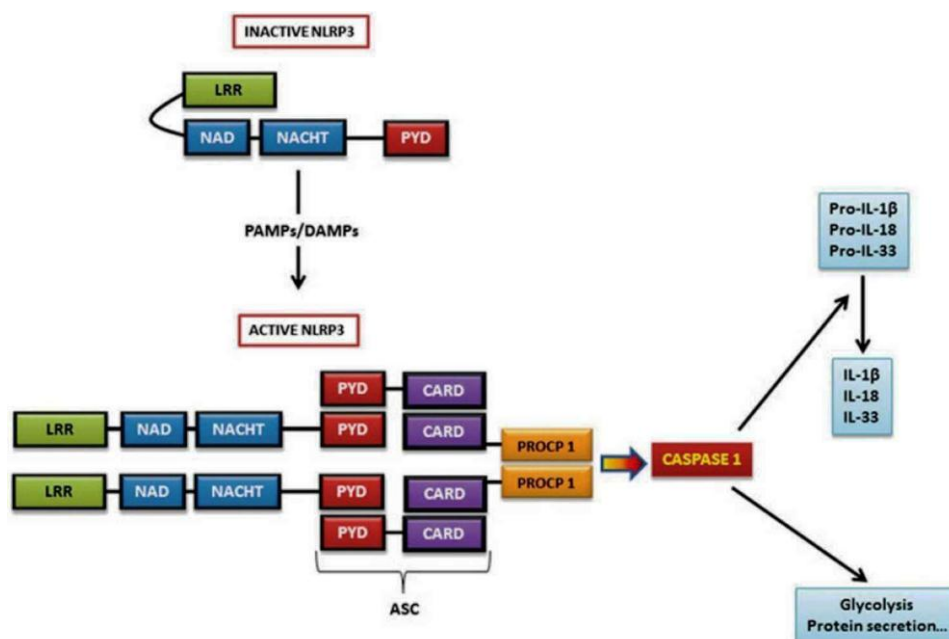


Figura 10. Representación esquemática del ensamblaje y activación de los componentes del inflamasoma NLRP3. Ver texto para más detalles (Escames y colbs., 2012).

Hoy en día se sabe que la activación del inflamasoma NLRP3 tiene lugar en respuesta a una amplia variedad de estímulos, tal y como se representa en la figura 11.

De acuerdo con todo lo comentado con anterioridad, la activación del inflamasoma, con la consecuente producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-18 e IL-33, requiere dos señales esenciales: la primera, definida como señal *priming* o señal preestimuladora, se asocia a una mayor transcripción y traducción de las citoquinas pro-inflamatorias pro-IL-1 β , pro-IL-18 y pro-IL-33, así como del propio receptor NLR que participará en la formación del inflamasoma; mientras tanto, la segunda señal, producida por un amplio número de estímulos diversos, dispara el ensamblaje de los diferentes componentes del inflamasoma, la

activación de la caspasa-1 y la consecuente secreción de las formas maduras de las citoquinas anteriormente mencionadas (Escames y cols., 2012).

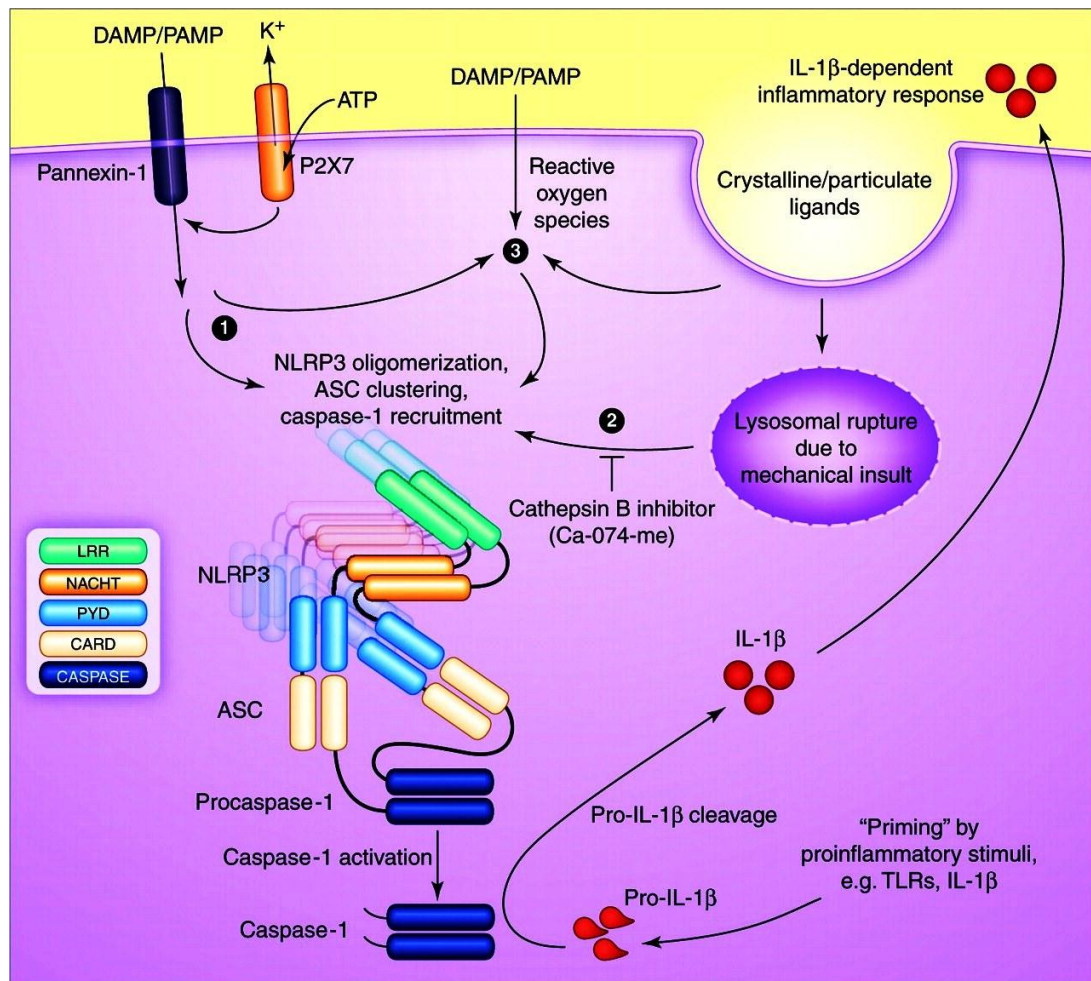


Figura 11. Modelos implicados en la activación del inflammasoma NLRP3. La oligomerización de NLRP3 junto con el reclutamiento de ASC y procaspasa-1, desencadenan la autoactivación de la caspasa-1, y la consecuente maduración y secreción de citoquinas pro-inflamatoria, tales como IL-1 β . Los mecanismos que desencadenan tales eventos permanecen en debate, sugiriéndose tres modelos que pueden no ser completamente exclusivos: (1) El inflammasoma NLRP3 se activa por ATP extracelular mediante uno de los siguientes mecanismos: activación de receptores purinérgicos P2X7 con el consecuente reclutamiento de hemicanales de panexina-1 y la formación de poros que permiten la entrada al citoplasma de factores extracelulares que son ligandos directos de NLRP3; o bien NLRP3 detecta directamente la salida de iones K⁺ o la pérdida de integridad de membrana. (2) Fagocitosis de partículas o estructuras cristalinas que conducen a la ruptura lisosomal y liberación del contenido lisosomal. Esta vía es sensible al inhibidor de la catepsina B, Ca-074-me, lo que sugiere que la catepsina B potencializa este proceso. (3) La producción de ROS, producidas bien en respuesta al reconocimiento de PAMPs/DAMPs o bien como consecuencia de la disfunción mitocondrial, conducen a la activación del inflammasoma NLRP3 (Schroder y cols., 2010).

4.2.1. PAPEL DEL INFLAMASOMA NLRP3 DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

La exposición a lo largo de la vida a diferentes antígenos y factores de estrés se traduce en una situación de estrés oxidativo crónico (Baylis y cols., 2013). Esta situación permite la liberación de ROS de origen mitocondrial, lo que provoca un mayor daño oxidativo en las biomoléculas de las células senescentes, contribuyendo fuertemente al deterioro celular asociado a la edad (Barja, 2014). Así, este proceso oxidativo que acompaña al envejecimiento conduce a la liberación y acumulación de DAMPs que inician un proceso inflamatorio a través de PRRs, tales como TLRs y NLRP3, desencadenando la activación del inflamasoma NLRP3, el incremento en los niveles de IL-1 β y una respuesta inflamatoria permanente (Feldman y cols., 2015). Además de las ROS, los cristales de colesterol también tiene la capacidad de activar al inflamasoma NLRP3 a través de mecanismos que implican la liberación lisosomal de catepsinas, ROS y salida de iones K⁺, desencadenando una respuesta inflamatoria como resultado de la liberación de IL-1 β (Rajamaki y cols., 2010; Duewell y cols., 2010). En este sentido, se sabe que el envejecimiento contribuye al desarrollo de aterosclerosis, una enfermedad arterial inflamatoria crónica caracterizada por la deposición de lípidos, y dado que los cristales de colesterol son abundantes en las lesiones ateroscleróticas, y que los niveles de IL-1 β se han relacionado con la aterogénesis, cabe la posibilidad de que los cristales de colesterol promuevan la inflamación de la pared arterial mediante la activación del inflamasoma NLRP3 (Rajamaki y cols., 2010; Duewell y cols., 2010). Aparte de la aterosclerosis, la posible relación existente entre la activación de este inflamasoma, a través del reconocimiento de DAMPs, y el establecimiento de la respuesta inflamatoria que acompaña a otras patologías asociadas al envejecimiento (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, degeneración macular asociada a la edad y gota), se discute en las revisiones de Shaw y colaboradores (Shaw y cols., 2013) y, Feldman y colaboradores (Feldman y cols., 2015).

A pesar de estos datos que relacionan los efectos de la edad sobre la activación del inflammasoma NLRP3, únicamente existe un estudio que presenta evidencias experimentales directas de la implicación de este inflammasoma con el proceso inflamatorio sistémico asociado al envejecimiento (Youm y cols., 2013). En este estudio, Youm y colaboradores demuestran que los ratones envejecidos deficientes en el receptor NLRP3 presentan, en comparación con ratones envejecidos normales, una disminución en la pérdida de masa ósea y una mejora en el control glucémico, funcionamiento del timo y, en las pruebas de memoria, aprendizaje y desempeño motor (Youm y cols., 2013). Estos datos proporcionan evidencias de que la inhibición de la actividad aberrante del inflammasoma NLRP3 durante el envejecimiento podría reducir el proceso inflamatorio característico de las enfermedades crónicas relacionadas con la edad. Por esta razón, decidimos evaluar el papel que ejerce el inflammasoma NLRP3 durante la activación de la respuesta inmune asociada al proceso de envejecimiento, considerando así su participación en el desarrollo del *inflammaging*.

4.2.2. PAPEL DEL INFLAMASOMA NLRP3 DURANTE LA SEPSIS

En un estudio reciente hemos identificado, por primera vez, la participación clave que tiene el inflammasoma NLRP3 durante el proceso inflamatorio asociado a la sepsis en corazón de ratón (García y cols., 2015), identificando claramente la presencia de las dos señales necesarias para la activación del inflammasoma: la señal *priming* o preestimuladora y la señal específica del receptor NLR (**Figura 12**).

Como ya hemos comentado antes, la estimulación de los receptores TLR4, IL-1R o receptores para TNF (TNFR, del inglés *TNF Receptors*) inducen la activación clásica de la vía dependiente de NF- κ B; tras la liberación de su inhibidor, NF- κ B se transloca al núcleo y regula la expresión de numerosos genes relacionados con las respuestas inmune e inflamatoria puestas en marcha durante la sepsis, entre los que se incluyen tanto citoquinas de carácter pro-inflamatorio como pro-IL-1 β , pro-IL-18 y TNF α , así como enzimas pro-

oxidantes como la iNOS y COX-2 (Zingarelli, 2005). Una vez activada, IL-1 β junto con TNF α muestran la habilidad para inducir la vía de NF- κ B, creándose de esta forma un ciclo vicioso por el cual se incrementa la severidad y duración de la respuesta inflamatoria a pesar de la puesta en marcha de numerosos mecanismos inhibidores que tratan de ponerle freno.

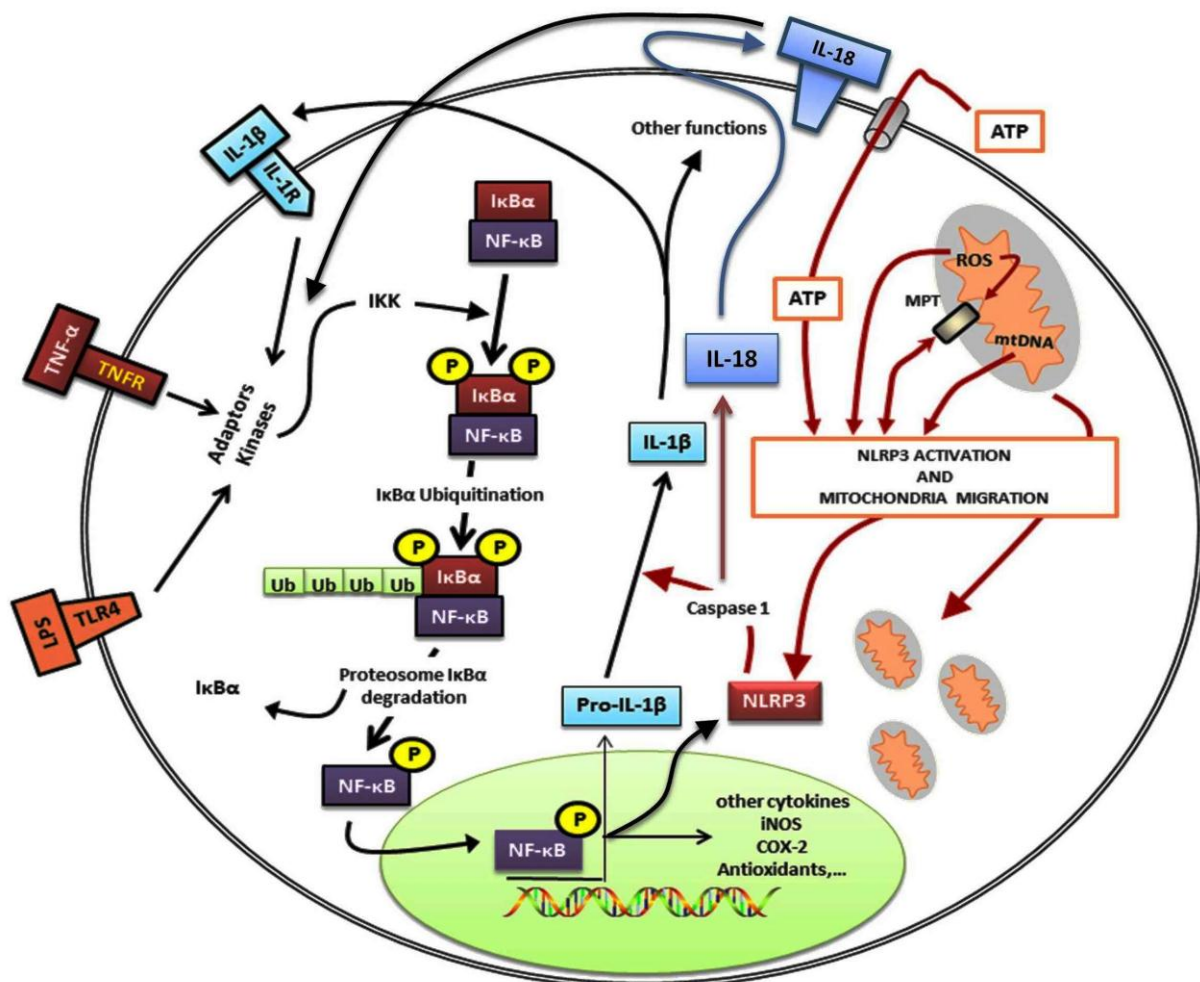


Figura 12. Cooperación entre NF- κ B e inflammasoma NLRP3 en la respuesta inmune innata durante la sepsis. Ver texto para más detalles (Escames et al., 2012).

De forma paralela, las condiciones responsables de activar la vía de NF- κ B son también inductoras de la sobreproducción de ROS, no sólo como consecuencia directa de la activación de los neutrófilos durante la respuesta inflamatoria (Janssen-Heininger y colbs., 2000), sino también como resultado del daño en la función mitocondrial asociado a la sepsis (Suliman y colbs., 2003; Suliman y colbs., 2005). En este sentido, nuestro grupo de investigación ha

demostrado ampliamente la disfunción mitocondrial durante la sepsis, junto con la generación de ROS y RNS debido al daño en los complejos respiratorios y, a la inducción de la actividad y expresión de la i-mtNOS, relacionando de forma directa la mortalidad asociada con esta patología (Escames y colbs., 2003; Escames y colbs., 2006c; Lopez y colbs., 2006b; Lopez y colbs., 2006a). En definitiva, la sepsis altera la estructura mitocondrial, desencadenando la apertura del poro MPT (del inglés *Mitochondrial Permeability Transition*) y la consecuente liberación de ROS y mtDNA al citoplasma, permitiendo la activación del inflammasoma NLRP3, responsable no sólo de producir IL-1 β madura con capacidad para activar y potenciar la vía de NF- κ B, sino también de facilitar la apertura del poro MPT, potenciando así su propia activación, y permitiendo una distribución perinuclear de las mitocondrias, la cual es una característica de numerosas patologías de carácter inflamatorio (Escames y colbs., 2012) (**Figura 12**).

En definitiva, la cooperación que se establece entre las vías de NF- κ B y NLRP3 durante la respuesta inflamatoria asociada a la sepsis en miocardio de ratón (García y colbs., 2015), nos lleva a evaluar el papel que juega esta conexión durante la respuesta inflamatoria desproporcionada que se da en los organismos envejecidos durante al sepsis (Hyde y colbs., 1990; Saito y colbs., 2003; Turnbull y colbs., 2009; Starr y Saito, 2014).

5. MELATONINA: RELACIÓN CON EL ENVEJECIMIENTO Y PAPEL TERAPÉUTICO EN LA SEPSIS

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina es una indolamina producida por la glándula pineal que, de manera indirecta, se relacionó con el aclaramiento de la piel del renacuajo (McCord CP and Allen FP, 1917). Esta indolamina se aisló por primera vez en 1958 a partir de extractos de glándula pineal de vaca (Lerner AB y colbs., 1958), y en 1959 se identificó su estructura química, proponiéndose el nombre de melatonina (Lerner AB y colbs., 1959). Desde un punto de vista químico, la melatonina es un cristal orgánico, de color blanco, con un peso molecular de 232,38 g/mol, cuyo punto de fusión se encuentra entre 116-118°C, poco soluble en agua y muy soluble en etanol (Szmuskowicz AW and Heinzelman RV, 1960).

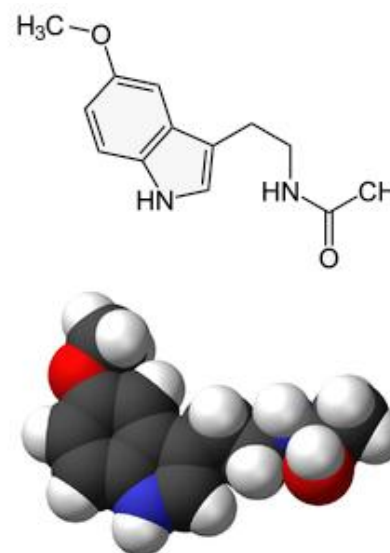


Figura 13: Estructura química de la melatonina

La melatonina está muy conservada a lo largo de la evolución ya que se encuentra desde organismos muy primitivos como cianobacterias, algas unicelulares, y parásitos, hasta organismos actuales (Paredes y colbs., 2009; Hardeland, 2008; Hardeland y Poeggeler, 2003; Macias y colbs., 1999). Esta indolamina se distribuye ubicuamente a través de todo el organismo, ya que su naturaleza anfipática le permite atravesar todas las barreras celulares. En base a estas características, se cree que la aparición de la melatonina podría deberse a una adaptación de los organismos para utilizar el oxígeno, dada su demostrada habilidad a la hora de neutralizar el efecto dañino que ejerce este gas sobre las diferentes estructuras celulares. Asimismo, se sabe que las principales dianas celulares de la melatonina, donde previene este daño oxidativo-nitrosativo, son la mitocondria y el núcleo (Menendez-Pelaez y

colbs., 1993; Acuña-Castroviejo y colbs., 2003; Venegas y colbs., 2012). En este sentido, se han identificado y caracterizado receptores nucleares para la melatonina en órganos periféricos (Acuña-Castroviejo y colbs., 1994) y células del sistema nervioso central (Becker-Andre y colbs., 1994; Carlberg y Wiesenberg, 1995). Asimismo, diversos trabajos han demostrado el importante papel que tiene la melatonina en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial (Martín y colbs., 2000; Acuña-Castroviejo y colbs., 2001; Acuña-Castroviejo y colbs., 2003; Leon y colbs., 2004; Leon y colbs., 2005).

5.1. SÍNTESIS DE LA MELATONINA

En un principio, se pensaba que la melatonina se originaba únicamente en la glándula pineal, desde donde se liberaba rápidamente al torrente sanguíneo, accediendo a todos los tejidos, compartimentos celulares y fluidos corporales. No obstante, más tarde se ha demostrado que además de la producción pineal, la melatonina es sintetizada en prácticamente todos los órganos y tejidos del organismo, entre los que se incluyen retina, riñón, piel, hígado, timo, tiroides, páncreas, cerebelo, epitelio intestinal, epitelio respiratorio, ovarios, placenta, endometrio, hígado, cerebro, corazón, así como células no endocrinas tales como eosinófilos, plaquetas, células endoteliales y células natural killer (Kvetnoy y colbs., 2002; Acuña-Castroviejo y colbs., 2014). Cabe destacar que la producción de melatonina extrapineal es mucho mayor que la pineal, variando en función del tejido y alcanzando valores del rango micromolar (Venegas y colbs., 2012; Acuña-Castroviejo y colbs., 2014). Además, no exhibe el ritmo característico de la melatonina pineal, la cual sí presenta un ritmo circadiano que alcanza sus niveles máximos durante la noche, sobre las 2-4 de la madrugada. Por otro lado, una característica a destacar es que la melatonina extrapineal permanece en el interior de la célula y no sale a la circulación, a pesar de encontrarse en concentraciones muy elevadas, lo que sugiere que su acción biológica debe ser diferente a la de origen pineal (Venegas y colbs., 2012; Acuña-Castroviejo y colbs., 2014).

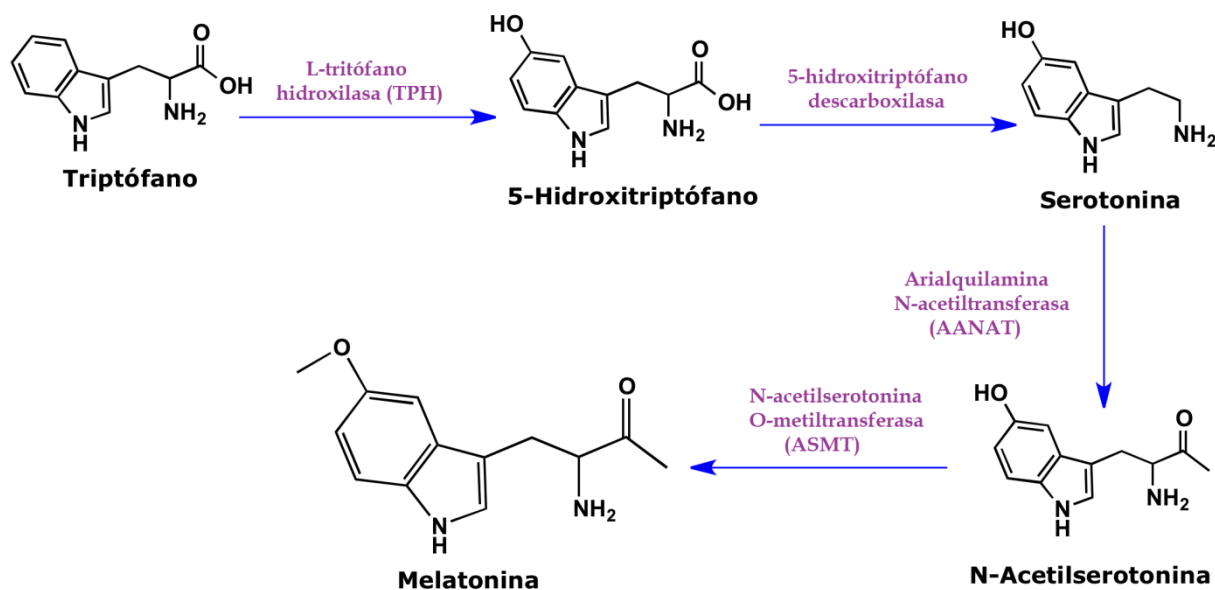


Figura 14. Síntesis de la melatonina a partir del triptófano en la glándula pineal.

A nivel de la glándula pineal, la melatonina se sintetiza a partir del triptófano, aminoácido captado del torrente circulatorio por parte del pinealocito a través de un mecanismo de transporte activo bajo control adrenérgico. Este triptófano es hidroxilado en posición 5 por el enzima L-triptófano hidroxilasa (TPH) generándose 5-hidroxitriptófano, el cual sufre una descarboxilación mediada por la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa transformándose en serotonina (5-hidroxitriptamina). Una vez sintetizada, la serotonina sufre una acetilación por acción de la arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT), originándose en consecuencia la N-acetil-serotonina (NAS), que finalmente será metilada por la N-acetilserotonina O-metiltransferasa (ASMT) produciendo la molécula de melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina (**Figura 14**). Si bien inicialmente se identificó a la AANAT como el enzima limitante de todo este proceso, al exhibir el mismo ritmo circadiano que la melatonina e inhibirse igualmente su actividad con la luz, estudios recientes demuestran que la síntesis de melatonina no se ve afectada tanto por una notable disminución o incremento mantenido en la actividad de la AANAT, lo que pone de manifiesto que el enzima limitante de la biosíntesis de esta hormona podría ser la ASMT (Liu y Borjigin, 2005). Una vez liberada

en la glándula pineal, la melatonina pasa rápidamente al torrente sanguíneo, accediendo a todos los tejidos, compartimentos celulares y fluidos corporales. Debido a esta característica, los niveles de esta hormona en sangre son considerados la principal señal de su síntesis pineal (Reiter, 1991).

Respecto a la melatonina no pineal, cabe mencionar que se sintetiza a través de la misma vía metabólica que la pineal y en la cantidad necesaria para el tejido en cuestión sin difundir de unos a otros.

5.2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MELATONINA

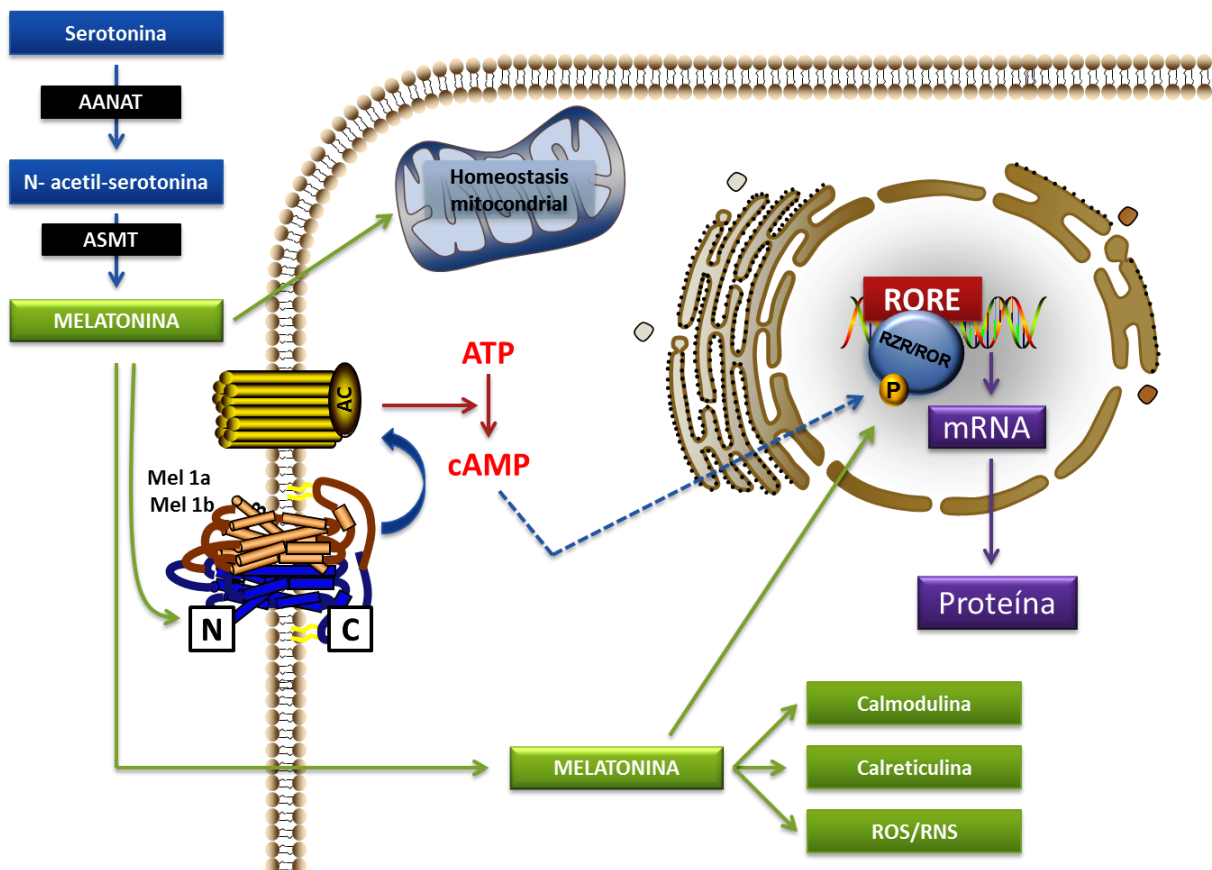


Figura 15. Mecanismos de acción de la melatonina. La melatonina puede actuar a través de la interacción con receptores de membrana y nucleares, mostrando en algunos casos un efecto cooperativo. Además, la melatonina ejerce funciones no mediadas por receptor al interactuar directamente con algunas proteínas citosólicas como el complejo calcio-calmodulina y calreticulina. Por último, puede depurar directa o indirectamente ROS/RNS.

El descubrimiento en los últimos años de diferentes dianas moleculares, sumado a la naturaleza altamente lipofílica de la melatonina, gracias a la cual es capaz de atravesar membranas celulares, sugiere que sus acciones fisiológicas van a estar mediadas por una amplia variedad de mecanismos de acción, entre los que se incluyen su unión a receptores (tanto de membrana como nucleares), interacción con proteínas citosólicas, acción antioxidante directa e indirecta, e interacción con la mitocondria (**Figura 15**).

5.2.1. UNIÓN A RECEPTORES: IMPORTANCIA DEL RECEPTOR NUCLEAR ROR

A nivel de la membrana han sido identificados y caracterizados dos receptores de melatonina acoplados a proteínas G, denominados como MT1 y MT2. Ambos receptores se expresan por separado o conjuntamente en varios tejidos del cuerpo, estando la distribución de MT2 más limitada al cerebro. El reconocimiento de la melatonina por cada uno de estos receptores causa distintos efectos: mientras que MT1 está asociado a proteínas G que median la inactivación de la adenilato ciclasa y activación de la fosfolipasa C β , MT2 adicionalmente inhibe la vía de la guanilato ciclasa soluble (von y colbs., 2002).

En lo que se refiere a los receptores nucleares, el primer indicio de una posible interacción de la melatonina con el material nuclear se obtuvo al encontrarse una elevada concentración de la hormona asociada a la cromatina (Withyachumnarnkul y colbs., 1986). Posteriormente Menéndez-Peláez y colaboradores demostraron la presencia de melatonina en el núcleo (Menendez-Pelaez y colbs., 1993) y, mediante el uso de ¹²⁵I-iodomelatonina, Acuña-Castroviejo y colaboradores demostraron su unión específica a la fracción proteica del núcleo de hígado de rata (Acuña-Castroviejo y colbs., 1993; Acuña-Castroviejo y colbs., 1994), sugiriendo la existencia de receptores nucleares para la melatonina. En 1994 Becker-Andre y colaboradores (Becker-Andre y colbs., 1994) demostraron una acción genómica de la melatonina a través de los receptores nucleares ROR α , una subfamilia de receptores nucleares o factores de transcripción dependientes de ligando que proporcionan a los

organismos la capacidad para controlar la expresión génica en respuesta a un amplio rango de factores ambientales, fisiológicos y de desarrollo.

La subfamilia de receptores ROR/RZR (del inglés *Retinoid-related Orphan Receptor/Retinoid Z Receptor*) se divide en tres subtipos, ROR α (Becker-Andre y cols., 1993; Giguere y cols., 1994; Giguere y cols., 1995), ROR β (Carlberg y cols., 1994; Andre y cols., 1998a) y ROR γ (Hirose y cols., 1994; He y cols., 1998). Cada subtipo posee varias isoformas debido a diferentes variantes de *splicing*, que se diferencian únicamente en su dominio N-terminal (Giguere y cols., 1994; Hamilton y cols., 1996; Andre y cols., 1998a). Los diferentes miembros de la subfamilia van a presentar una estructura constituida en base a 5-6 dominios funcionales diferenciados, dos de los cuales se encuentran altamente conservados desde un punto de vista funcional en todos los miembros de la subfamilia: el dominio de unión al DNA (DBD, del inglés *DNA-Binding Domain*) y el dominio de unión a ligando (LBD, del inglés *Ligand Binding Domain*) (Evans, 1988; Moras y Gronemeyer, 1998; Giguere, 1999; Jetten y cols., 2001) (**Figura 16**). El dominio DBD está constituido por dos dedos de zinc que permiten el reconocimiento y unión específica de monómeros de ROR al DNA, gracias a la existencia de un elemento de respuesta de ROR (RORE, del inglés *ROR Response Element*), el cual consta de una secuencia consenso (AGGTCA) precedida de una secuencia de 6 pares de bases rica en AT (Carlberg y cols., 1994; Giguere y cols., 1994; Andre y cols., 1998b; Jetten y cols., 2001). El dominio LBD, mucho menos conservado que el anterior, 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 (Jetten, 2009; Smirnov, 2001).

Una vez unido al DNA a través de su elemento de respuesta, ROR va a mediar la regulación de numerosos procesos biológicos, entre los que se incluyen el desarrollo embrionario, los ritmos circadianos, procesos de diferenciación y proliferación celular, respuesta del sistema inmune y metabolismo celular. Los efectos de ROR sobre estas

funciones, y especialmente en la regulación del ritmo circadiano, los veremos con más detalle cuando discutamos el papel que juega la melatonina durante el proceso de envejecimiento.

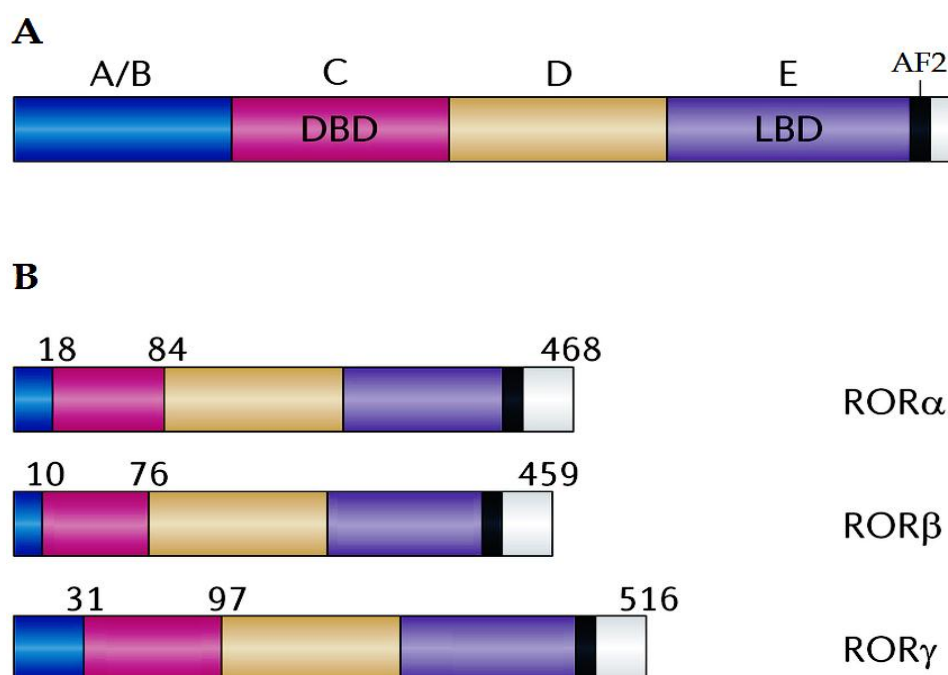


Figura 16. Estructura de los miembros de la subfamilia de receptores nucleares ROR/RZR. A) Estructura general de los miembros de la superfamilia de receptores nucleares. B) Estructura de los receptores miembros de la subfamilia ROR/RZR. Los números encima de cada receptor representan la posición del aminoácido. A/B-F, dominios funcionales; DBD, dominio de unión al DNA; LBD, dominio de unión al ligando; AF2, secuencia de función de activación (Kojetin y Burris, 2014).

Ahora bien, se hace necesario destacar en este apartado la participación de ROR α en la regulación de la respuesta inmune. En este sentido, Steinhilber y colaboradores observaron que la actividad transcripcional de ROR α se relaciona con la inhibición de la enzima 5-lipooxigenasa, la cual participa en el proceso de biosíntesis de leucotrienos pro-inflamatorios en los linfocitos B humanos (Steinhilber y cols., 1995). Asimismo, Delerive y colaboradores demostraron el papel de ROR α 1 como regulador negativo de la respuesta inflamatoria al causar una profunda inhibición de la expresión de mediadores pro-inflamatorios como IL-6, IL-8 y COX-2, efecto inhibitorio que se debe a la presencia de elementos de respuesta a ROR α en el promotor del gen *Ikba*, lo que le permite interferir negativamente en las vías de

señalización dependientes de NF- κ B (Delerive y colbs., 2001). Posteriormente, Stapleton y colaboradores confirmaron estas propiedades al observar que los ratones mutantes naturales para ROR α presentaban un mayor grado de reacción inflamatoria inducida por LPS, en términos de niveles de neutrófilos y expresión de mediadores pro-inflamatorios, en comparación con los ratones de tipo silvestre (Stapleton y colbs., 2005). Estas propiedades anti-inflamatorias de ROR α nos pueden sugerir una vía de conexión entre este factor de transcripción y la deacetilasa SIRT1, debido a la capacidad que presenta este enzima para deacetilar residuos de lisina en posición 310 de NF- κ B, reprimiendo así su actividad transcripcional (Yeung y colbs., 2004). En este sentido, hemos demostrado recientemente que parte de los efectos anti-inflamatorios que tiene la melatonina durante la sepsis, están mediados por ROR α y son precisamente a través de la modulación de la respuesta inmune innata dependiente de NF- κ B (García y colbs., 2015).

5.2.2. UNIÓN A PROTEÍNAS CITOSÓLICAS

La melatonina puede interactuar con proteínas citosólicas como: la calmodulina, modulando la actividad del enzima fosfodiesterasa y, por tanto, las señales intracelulares del calcio (Benitez-King and Anton-Tay, 1993); la calreticulina (Macias y colbs., 2003); la tubulina (Cardinali y Freire, 1975); y la proteína quinasa C (Benitez-King y colbs., 1996). Todas estas proteínas participan en el metabolismo del calcio, así como en la modulación de la estructura del citoesqueleto (Benitez-King y Anton-Tay, 1993; Benitez-King, 2006).

5.2.3. ACCIÓN ANTIOXIDANTE DIRECTA E INDERECTA

La melatonina, así como algunos de sus metabolitos; la N1-acetil-5-metoxikinuramina (AMK) y la N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinuramina (AFMK), van a ser capaces de depurar directamente ROS/RNS (Acuña-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003a; Leon y colbs., 2004; Galano y colbs., 2013; Manchester y colbs., 2015) (**Figura 17**).

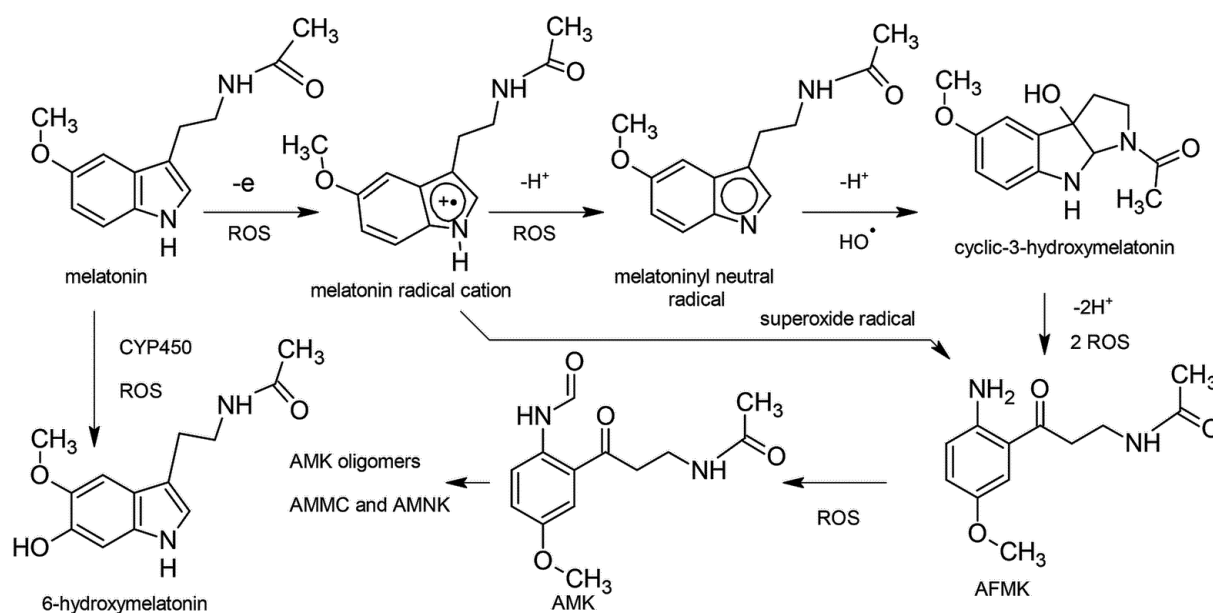


Figura 17. Cascada antioxidante de la melatonina. En este esquema aparecen la melatonina y sus metabolitos: la 6-hidroxi-melatonina, la 3-hidroxi-melatonina cíclica, la N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinuramina (AFMK) y la N1-acetil-5-metoxikinuramina (AMK). Todas estas moléculas tienen la capacidad de eliminar radicales libres. Así, una única molécula de melatonina junto con su metabolitos pueden depurar numerosas ROS/RNS (Johns y Platts, 2014).

Independientemente de la ruta seleccionada, tanto la 3-hidroxi-melatonina cíclica como el AFMK muestran una alta capacidad antioxidante, aumentando por tanto el valor de la melatonina como potente depurador de radicales libres (Acuña-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003a).

Asimismo, la melatonina es capaz de reaccionar con otros radicales de oxígeno, como el oxígeno singlete (Cagnoli y colbs., 1995), peróxido de hidrógeno (Tan y colbs., 2000) y el $O_2^{\cdot-}$, si bien este último hecho aún está por confirmar, especialmente *in vivo*, ya que la reacción por la cual la melatonina ejercería esta acción no es conocida (Reiter y colbs., 2003b; Leon y colbs., 2004; Acuña-Castroviejo y colbs., 2007). Por otro lado, la melatonina también puede depurar radicales de nitrógeno como los peroxinitritos ($ONNO^{\cdot-}$) (Zhang y colbs., 1999) o radicales peróxido (LOO^{\cdot}), interfiriendo así en la propagación de la peroxidación lipídica. Además, la melatonina es especialmente eficaz a la hora de depurar el radical hidroxilo

(OH⁻) (Poeggeler y colbs., 1993), considerado como el radical libre más dañino de todos los que se producen (Halliwell, 1992).

Junto con esta capacidad intrínseca para depurar radicales libres, la melatonina posee la habilidad para estimular la actividad y expresión de otros sistemas antioxidantes, estableciendo así una forma de acción indirecta para reducir el estrés oxidativo (Antolin y colbs., 2002; Mayo y colbs., 2002). En primer lugar, la melatonina estimula el ciclo del glutatión (GSH), aumentando la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) y reductasa (GRd) (Martín y colbs., 2000; Escames y colbs., 2006c; Escames y colbs., 2007; Ortiz y colbs., 2014), regulando así el balance glutatión oxidado (GSSG)/glutatión reducido (GSH). Además, la melatonina aumenta la producción de GSH estimulando la γ -glutamilcisteína sintasa, enzima limitante en la ruta de biosíntesis de este compuesto (Urata y colbs., 1999), y la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), la cual genera el NADPH requerido por la GRd (Pierrefiche y Laborit, 1995). En el mismo sentido, se ha descrito el efecto de la melatonina sobre otras enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (Reiter y colbs., 2003b; Leon y colbs., 2004; Acuña-Castroviejo y colbs., 2007).

En definitiva, ya sea por acción directa y/o indirecta, la melatonina es un potente antioxidante con importantes propiedades para regular el estado redox celular, especialmente a nivel de la mitocondria al ser ésta la principal fuente de ROS/RNS, y proteger, en consecuencia, macromoléculas como el DNA, lípidos y proteínas del daño oxidativo. Asimismo, y dadas las características del grupo N-acetil presente en la melatonina, ésta va a aumentar la eficacia de otros antioxidantes naturales, mostrando una acción sinérgica con las vitaminas C y E (Reiter y colbs., 2003b).

5.2.4. ACCIÓN SOBRE LA MITOCONDRIA

La melatonina, que difunde al interior de las mitocondrias atravesando la membrana mitocondrial interna gracias a su carácter lipofílico, juega un rol muy importante en la homeostasis mitocondrial. En la mitocondria, donde se acumula a altas concentraciones (Venegas y colbs., 2012), incrementa la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico, y consecuentemente la producción de ATP, tanto en mitocondrias sanas (López y colbs., 2009) como dañadas (Martín y colbs., 2000; Escames y colbs., 2003; Escames y colbs., 2006c; Escames y colbs., 2007; Ortiz y colbs., 2014; Doerrier y colbs., 2015). La melatonina también produce una disminución del potencial de membrana, reduciendo la probabilidad de que se escapen electrones y por lo tanto se formen especies reactivas (López et al., 2009). Estas acciones, junto con sus propiedades antioxidantes, hacen que la melatonina muestre una gran importancia desde el punto de vista terapéutico en todas aquellas patologías donde la función mitocondrial se vea alterada.

5.3. PAPEL DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

La alta incidencia de enfermedades relacionadas con la edad en la creciente población de personas mayores ha despertado el interés de la ciencia por la búsqueda de agentes anti-envejecimiento capaces de prevenir y retrasar este proceso, así como la aparición de trastornos degenerativos asociados. Dado que el estrés oxidativo desempeña un papel muy importante tanto en el proceso de envejecimiento como en las enfermedades crónicas asociadas a la senescencia (De la Fuente y Miquel, 2009; Cannizzo y colbs., 2011), la administración de un potente agente antioxidante con alta biodisponibilidad, como es la melatonina, puede convertirse en una prometedora y eficaz intervención terapéutica para frenar el envejecimiento y, el inicio y progresión de los trastornos relacionados con la edad (Poeggeler, 2005). En este sentido, los efectos que tiene la melatonina sobre el proceso de envejecimiento han sido reportados en varios trabajos (Poeggeler, 2005; Bubenik y Konturek,

2011). Se sabe que esta indolamina es una molécula pleiotrópica (Reiter y colbs., 2010) que actúa como un eficaz antioxidante y depurador de radicales libres (Acuña-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003a; Reiter y colbs., 2009), y cuya producción endógena disminuye con la edad (Waldhauser y Steger, 1986; Waldhauser y colbs., 1988; Reiter, 1992). Esta reducción gradual en la producción de melatonina que tiene lugar durante el envejecimiento no está causada por la calcificación de la glándula pineal, tal y como se pensaba, si no que se cree que es debida tanto a una pérdida de inervación adrenérgica como a una disminución en el número y actividad de los receptores β -adrenérgicos que se sitúan en la superficie de los pinealocitos (Greenberg y Weiss, 1978; Reuss y colbs., 1990; Humbert y Pevet, 1994). Por otra parte, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que el tratamiento crónico con esta indolamina previene absolutamente el incremento de la respuesta inflamatoria, estrés oxidativo, y el deterioro mitocondrial asociados a la edad (Rodríguez y colbs., 2007a; Rodríguez y colbs., 2007b; Rodríguez y colbs., 2007c; Carretero y colbs., 2009; Acuña-Castroviejo y colbs., 2012). Por tanto, la reducción en los niveles de melatonina que tiene lugar durante el envejecimiento puede desempeñar un papel clave en la aparición del daño oxidativo y estado pro-inflamatorio característicos de este proceso.

La producción circadiana de melatonina por parte de la glándula pineal, junto con la presencia de receptores de melatonina en el núcleo supraquiasmático, evidencian claramente la relación que existe entre la producción de esta hormona y el reloj circadiano (Jenwitheesuk y colbs., 2014). El reloj circadiano es un sistema endógeno que actúa como un cronómetro interno, generando variaciones fisiológicas y comportamentales cada 24 horas aproximadamente. Estas variaciones diarias se definen como ritmos circadianos (Weinert, 2000). El sistema de los genes reloj encargado de regular estos ritmos está formado por un complejo circuito de retroalimentación transcripción-traducción. Así, la competencia que establece ROR α con Rev-Erba, también denominado NR1D1 (del inglés *Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1*), por la unión al elemento de respuesta de ROR (RORE) va a

ser clave en esta regulación; Rev-Erba regula negativamente la expresión de *Bmal1* (o Arntl, del inglés *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like*) (Preitner y colbs., 2002), mientras que ROR α la induce (Sato y colbs., 2004) a través de la unión a su RORE (Ueda y colbs., 2005). Así, ROR α incrementa la expresión de los activadores heterodiméricos *Bmal1* y *Clock* (del inglés *Circadian locomotor output cycles kaput*), los cuales permiten la expresión de *Per* (del inglés *Period*) y *Cry* (del inglés *Cryptochrome*). Los heterodímeros constituidos por estos dos últimos genes interaccionan con *Bmal1* y *Clock*, regulando de forma negativa su actividad transcripcional. Asimismo, *Bmal1* y *Clock* son capaces de activar a Rev-Erba, reprimiendo en consecuencia la transcripción de todos aquellos genes sometidos al control de ROR α (Albrecht, 2002; Reppert y Weaver, 2002; Nakajima y colbs., 2004; Akashi y Takumi, 2005; Asher y Schibler, 2006) (Figura 18).

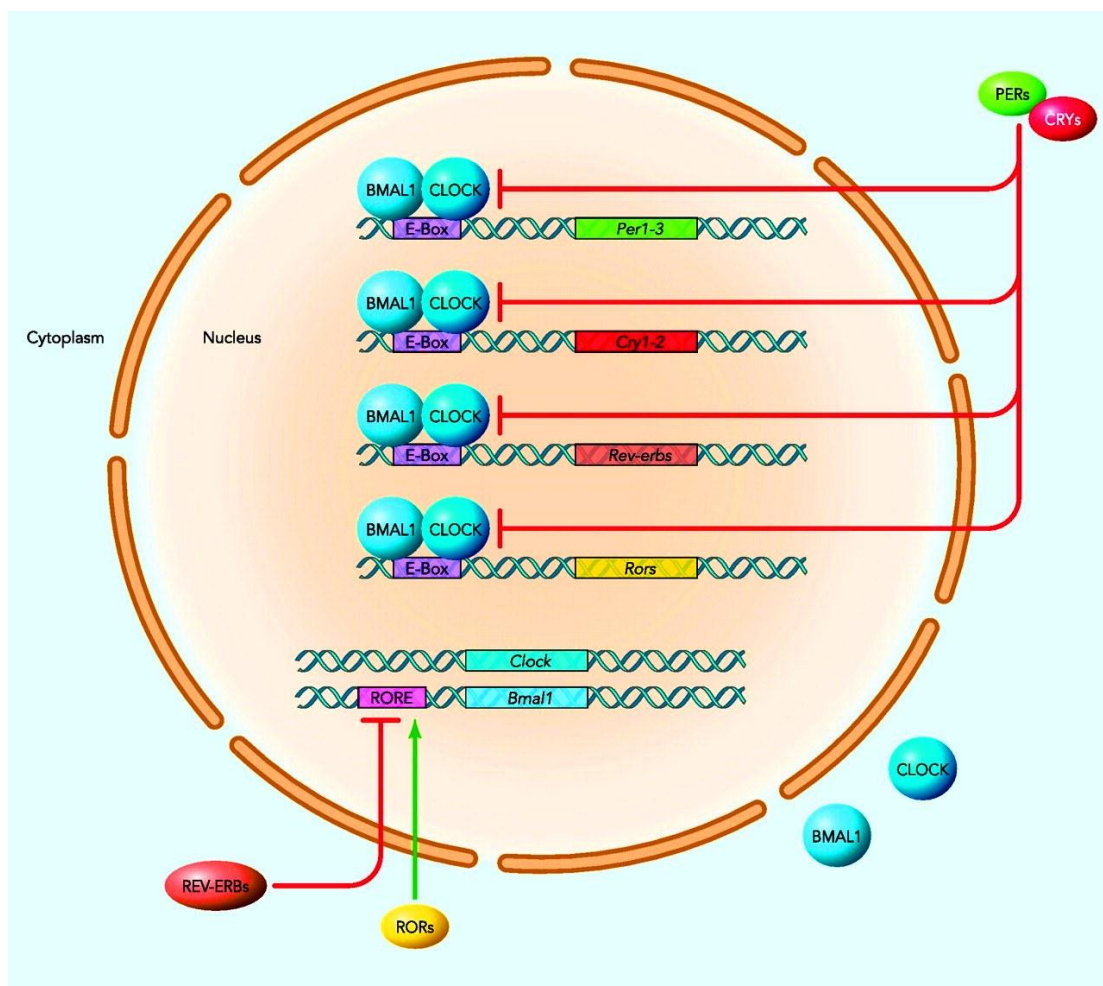


Figura 18. Mecanismo básico del reloj circadiano en mamíferos. Ver texto para más detalles (Froy, 2011).

Durante el envejecimiento se produce una importante disrupción en los ritmos del reloj circadiano, siendo esta disfunción responsable a su vez de contribuir tanto al propio proceso de envejecimiento como a las patologías relacionadas con la edad (Van Gool y Mirmiran, 1986; Witting y colbs., 1994; Weinert, 2000; Froy, 2011). En este sentido, Kondratov y colaboradores mostraron que los ratones deficientes en *Bmal1* desarrollaban un fenotipo de envejecimiento acelerado, caracterizado por múltiples anomalías relacionadas con la edad y una reducción en la esperanza de vida casi tres veces mayor que los ratones normales (Kondratov y colbs., 2006). Por otro lado, Dubrovsky y colaboradores mostraron que los ratones deficientes en *Clock* presentaban una mayor tasa de inflamación, cataratas, y una reducción en la longevidad del 15% (Dubrovsky y colbs., 2010). Además, el reloj circadiano también controla otros sistemas que se sabe están asociados con el proceso de envejecimiento, como el metabolismo, la respuesta al estrés oxidativo, y la reparación del DNA, evidenciando la importancia que tiene el sistema circadiano durante este proceso (Khapre y colbs., 2010; Kondratova y Kondratov, 2012). Por tanto, la disrupción en la producción circadiana de melatonina que tiene lugar con la edad, va a tener profundos efectos sobre la salud y bienestar de las personas mayores como consecuencia de las alteraciones en el funcionamiento del reloj circadiano (Jenwitheesuk y colbs., 2014), haciendo necesario estudios que profundicen más en los diferentes efectos que tiene la melatonina sobre cada uno de los genes reloj durante el envejecimiento.

Otra conexión entre el reloj circadiano y el envejecimiento es la interacción que existe entre SIRT1, la cual actúa como factor de supervivencia y resistencia al estrés durante el envejecimiento (Donmez y Guarente, 2010), y la maquinaria del reloj circadiano (Grimaldi y colbs., 2009; Sahar y Sassone-Corsi, 2012) (**Figura 19**). El primer indicio de esta interacción se dio a conocer en 2008; en ese año se descubrió que SIRT1 controlaba la amplitud del reloj circadiano a través de la deacetilación de *Per2* y *Bmal1* (Asher y colbs., 2008; Nakahata y colbs., 2008). Por otro lado, se sabe que la actividad deacetilasa de SIRT1 es dependiente de

NAD⁺, cuyos niveles disminuyen durante el envejecimiento (Braidy y cols., 2011; Massudi y cols., 2012); la biosíntesis de NAD⁺ es llevada a cabo por el enzima limitante nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT, del inglés *Nicotinamide Phosphoribosyltransferase*) y la nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa (NMNAT, del inglés *Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase*), de forma que SIRT1 regula su propia actividad al inducir la expresión de la NAMPT gracias a su interacción con Clock y Bmal1. Este hecho implica que el enzima NAMPT y, por tanto, los niveles de NAD⁺ van a estar sometidos a un importante control circadiano (Nakahata y cols., 2009; Ramsey y cols., 2009), lo que sugiere, a su vez, un control circadiano de la actividad de SIRT1 (Nakahata y cols., 2008; Grimaldi y cols., 2009; Ramsey y cols., 2009). Finalmente, SIRT1 es capaz de deacetilar a PGC1 α (del inglés *Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha*) (Rodgers y cols., 2005; Nemoto y cols., 2005; Rodgers y cols., 2008), promoviendo su activación a nivel del promotor de Bmal1 y el consecuente incremento en la actividad transcripcional de ROR α , lo que se traduce en un aumento en la expresión de *Bmal1* (Liu y cols., 2007; Jetten, 2009; Chang y Guarente, 2013). Por tanto, la disminución en la actividad de SIRT1 que se da con la edad, se correlaciona con una reducción en la actividad transcripcional de ROR α y, en consecuencia, en la expresión de sus genes diana *Clock* y *Bmal1*, produciéndose una disrupción en el funcionamiento del reloj circadiano, con la consecuente reducción en la expresión de la NAMPT y en los niveles de NAD⁺, afectándose aún más la actividad deacetilasa de SIRT1 y, por tanto, la amplitud de los ritmos circadianos (Figura 19).

A la luz de estas observaciones y teniendo en cuenta que la melatonina es capaz de preservar los niveles de NAD⁺ en situaciones de fuerte estrés oxidativo (Tan y cols., 2005) e incrementar la actividad de SIRT1 (Tajes y cols., 2009) y, dado que SIRT1 juega un papel fundamental en el control del proceso de envejecimiento y que este proceso se asocia con una reducción crónica en los niveles de melatonina, se hace necesario futuras investigaciones

dirigidas hacia el posible uso de esta indolamina como terapia anti-envejecimiento, pudiendo no sólo mejorar la calidad de vida de las personas mayores, si no también retrasar la aparición de las alteraciones y enfermedades relacionadas con la edad.

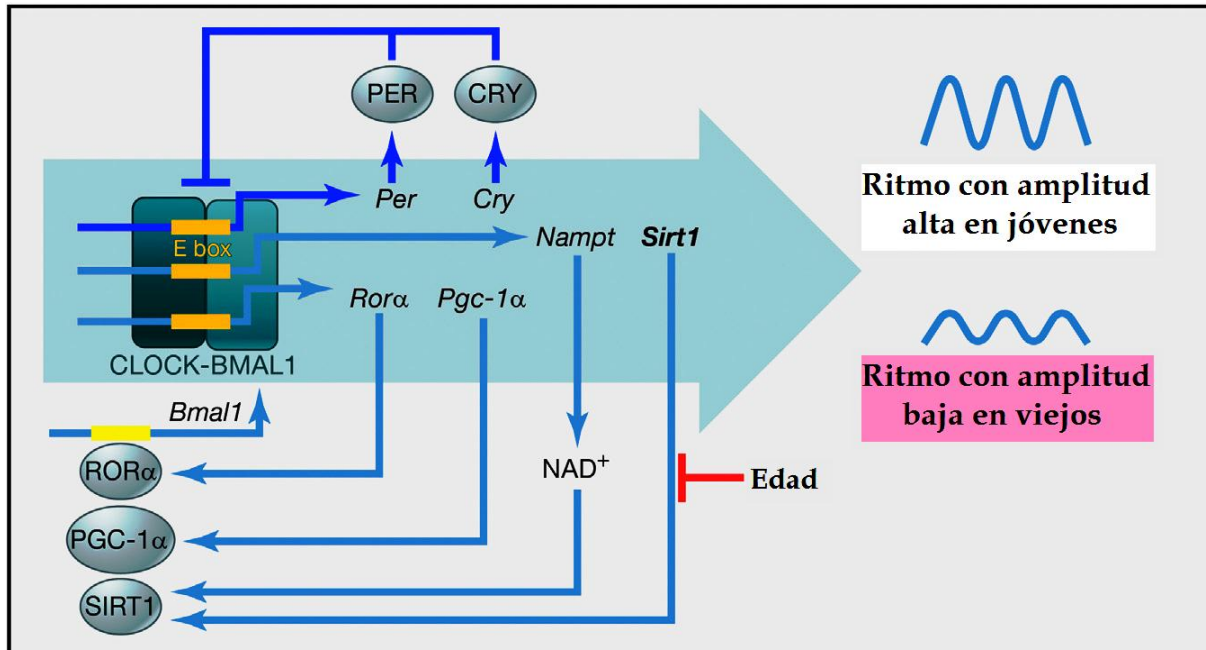


Figura 19. SIRT1 y el reloj circadiano en el envejecimiento. La unión de ROR α a su elemento de respuesta, induce la expresión de *Clock* y *Bmal1*, los cuales, tras unirse a su *E-box* (5'-CACGTG-3'), permiten la expresión de *Per* y *Cry*, regulando de forma negativa su actividad transcripcional. Asimismo, *Bmal1* y *Clock* son capaces de activar la expresión de *Rora*, regulando de forma positiva su propia expresión y la de la *NAMPT*, incrementando los niveles de NAD^+ . Este bucle de retroalimentación resulta esencial para el control de los ritmos circadianos; así, la cronodisrupción que tiene lugar con la edad, conduce a una disminución en los niveles de NAD^+ y en la actividad de SIRT1, con la consiguiente reducción en la activación de PGC1 α , dando como resultado una caída en la amplitud de todos los ritmos dependientes del complejo Clock/Bmal1 en animales de edad avanzada (Belden y Dunlap, 2013).

5.4. PAPEL TERAPÉUTICO EN LA SEPSIS

La melatonina mediante su capacidad antioxidante directa e indirecta, así como a través de la modulación de la respuesta inmune e inflamatoria, previene el fallo multiorgánico

asociado a la sepsis, preservando una adecuada función celular y tisular (García y colbs., 2015).

A nivel de la función mitocondrial, reduce la expresión del enzima iNOS, disminuyendo así los elevados niveles de NO• y ROS (Crespo y colbs., 1999; Escames y colbs., 2003; Escames y colbs., 2006c; Escames y colbs., 2007; Ortiz y colbs., 2014). Además, la melatonina es capaz de restaurar la actividad de la cadena de transporte electrónico, llegando incluso a aumentar la actividad de algunos complejos respiratorios por encima de los niveles basales, así como la producción de ATP (Escames y colbs., 2003; Lopez y colbs., 2006a; Escames y colbs., 2006c; Escames y colbs., 2007; Ortiz y colbs., 2014).

Asimismo, se ha descrito que el tratamiento terapéutico con melatonina aumenta significativamente la supervivencia de roedores con sepsis, inducida tanto por ligadura y punción cecal como por la administración de LPS (Wichmann y colbs., 1996; Maestroni, 1996; Reynolds y colbs., 2003; Escames y colbs., 2006a; Escames y colbs., 2007).

Con todas estas evidencias experimentales en animales, Gitto y colaboradores llevaron a cabo el primer estudio en humanos, administrando melatonina por vía oral a niños neonatos con sepsis (Gitto y colbs., 2001). En estos pacientes, el tratamiento con melatonina redujo el estrés oxidativo asociado al proceso séptico, mejorando asimismo parámetros serológicos relacionados con el proceso inflamatorio como la cantidad de glóbulos blancos y neutrófilos, plaquetas y niveles de proteína reactiva C, los cuales se mantuvieron altos en aquellos pacientes sépticos no tratados. Lo más importante desde un punto de vista clínico es que los 10 pacientes tratados con melatonina sobrevivieron, en contraste con el fallecimiento de 3 de los 10 pacientes a los que no se les administró melatonina.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Estudios preliminares han demostrado que el envejecimiento se acompaña de una activación en la respuesta inmune que promueve el establecimiento de un estado inflamatorio crónico de bajo grado conocido con el término de *inflammaging*. Esta condición, asociada a la edad, empeora significativamente el pronóstico de las personas mayores a la sepsis, aumentando la susceptibilidad y mortalidad frente a esta patología, que es la principal causa de muerte en las UCIs de cualquier hospital en el mundo.

Se sabe que la vía de señalización de NF- κ B se encuentra implicada en la fisiopatología de la sepsis, al modular las respuestas inmunológicas e inflamatorias a través de la expresión de citoquinas y enzimas pro-inflamatorias, quimioquinas y moléculas de adhesión. Este proceso inflamatorio lleva asociado un importante fracaso bioenergético mitocondrial que, en última instancia, promoverá el fallo multiorgánico como consecuencia del aumento de la NOS inducible mitocondrial (i-mtNOS), generación de ROS/RNS y fallo en la cadena de transporte electrónico. Actualmente se conoce que esta disfunción mitocondrial conlleva la inducción del inflamasoma NLPR3 y la consiguiente maduración de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-18 e IL-33, las cuales se encargan de amplificar la respuesta inflamatoria.

Por otro lado, estudios previos han demostrado que las alteraciones que tienen lugar en la expresión de los genes reloj durante el envejecimiento se asocian al estado de *inflammaging*. Por tanto, el proceso séptico debería agravar la cronodisrupción que aparece con la edad, agravando la respuesta inflamatoria y el daño asociado.

En diversos modelos experimentales hemos comprobado que: (1) la administración crónica de melatonina previene el estrés oxidativo y deterioro mitocondrial asociados a la edad; (2) el tratamiento agudo con melatonina contrarresta totalmente la respuesta a la sepsis en animales jóvenes y viejos, reduciendo la inflamación, el estrés oxidativo y el daño

mitocondrial. No obstante, se desconocen en detalle los mecanismos moleculares que median los efectos terapéuticos de esta indolamina en ratones de edad avanzada con sepsis.

Nuestra hipótesis sostiene que:

1. Durante el envejecimiento se da un estado pro-inflamatorio desencadenado, en parte, por la vía de la respuesta inmune dependiente de NF- κ B. Esta respuesta inflamatoria asociada a la edad se amplifica durante la sepsis, lo que explicaría la mayor susceptibilidad de las personas mayores frente a esta patología. Durante la sepsis, se produce una activación paralela de las vías de señalización dependientes de NF- κ B y el inflamasoma NLRP3 que, sumado al importante deterioro mitocondrial, conllevan a una mayor pérdida de la capacidad funcional de la célula con la edad.
2. La administración de melatonina debe prevenir la respuesta inflamatoria asociada a la sepsis en ratones viejos, a la vez que reduce el daño oxidativo mitocondrial. Estas propiedades anti-inflamatorias de la melatonina se deben, en parte, a su interacción con el receptor nuclear ROR α y, por tanto, están ligadas al restablecimiento del bucle circadiano regulado por los genes reloj. Además, el descenso de melatonina con la edad puede ser un factor facilitador del agravamiento de la respuesta inflamatoria que ocurre durante el envejecimiento.

Para comprobar esta hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo 1: Evaluar en ratones C57BL/6 de 18 meses de edad, controles y con sepsis, la activación del inflamasoma NLRP3 mediante el análisis de la expresión y contenido de sus principales componentes (NLRP3 y ASC), activación de la caspasa-1 y maduración de la IL-1 β , comparando estos parámetros con ratones controles C57BL/6 de 3 meses de edad.

Objetivo 2: Estudiar en ratones C57BL/6 de 18 meses de edad, controles y con sepsis, la activación de NF- κ B mediante su presencia en el núcleo, unión al DNA y niveles de expresión y contenido proteico de marcadores pro-inflamatorios. Comparar estos parámetros con ratones controles C57BL/6 de 3 meses de edad.

Objetivo 3: Estudiar en ratones C57BL/6 de 18 meses de edad, controles y con sepsis, el estado de los genes reloj, la expresión y actividad de los principales enzimas antioxidantes, así como la función mitocondrial a través del análisis en la actividad de los complejos respiratorios, y la vía apoptótica intrínseca. Comparar con ratones controles C57BL/6 de 3 meses de edad.

Objetivo 4: Evaluar los efectos protectores del tratamiento agudo con melatonina sobre todos los parámetros mencionados anteriormente, así como sus posibles mecanismos de acción y dianas moleculares, en ratones sépticos C57BL/6 de 18 meses de edad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES, PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO Y TRATAMIENTOS

1.1. Animales

Para cumplir con los objetivos planteados en el presente estudio, se emplearon ratones con fenotipo silvestre de la cepa C57BL/6 de 3 (jóvenes) y 18 (envejecidos) meses de edad proporcionados por Harlan Laboratories (Barcelona, España). Los animales se mantuvieron en condiciones estériles dentro del animalario del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada, bajo un fotoperiodo de 12: 12 horas luz: oscuridad, a $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, y con libre acceso tanto a bebida como a comida (*ad libitum*). Todos los experimentos se llevaron a cabo acorde con el comité ético de la Universidad de Granada, y las guías españolas (R.D. 53/2013) y europeas (CETS # 123) para la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

1.2. Modelo de inducción de la sepsis

La sepsis se indujo por ligadura y punción cecal (CLP, del inglés *Cecal Ligation and Puncture*), un modelo experimental de carácter polimicrobiano que refleja los cambios fisiológicos y síntomas clínicos, en términos de hipotermia, taquicardia y taquipnea, observados en pacientes sépticos (Rittirsch y cols., 2009; Wichterman y cols., 1980). En primer lugar, los ratones se anestesiaron con Equitesin vía intraperitoneal (0,1 mg/kg) y posteriormente se procedió a abrir la cavidad abdominal mediante laparotomía media. Una vez localizado y liberado el ciego, se drenaron retrógradamente las heces del colon ascendente hacia el ciego mediante presión manual. Tras estos pasos, se ligó el ciego justo por debajo de la válvula ileocecal y se perforo tres veces la superficie cecal antimesentérica con una aguja de 22G para permitir la extrusión de las heces, evitando lesionar los vasos sanguíneos adyacentes. Finalmente, se recolocó el paquete intestinal en la cavidad peritoneal

y se suturó la pared abdominal con hilo de sutura estéril, aplicándose povidona yodada a la herida. El procedimiento quirúrgico se realizó siempre en el mismo momento del día para evitar las variaciones circadianas en la respuesta inmune (Curtis y cols., 2014).

1.3. Tratamientos y grupos experimentales

Los ratones de 18 meses de edad, se agruparon en 3 grupos experimentales:

- Grupo control (C).
- Grupo de sepsis (S8), sacrificados a las 8 horas después de inducirse la sepsis por punción y ligadura cecal.
- Grupo de sepsis tratado con melatonina (S8M), sacrificados también a las 8 horas tras la inducción de la sepsis. Este grupo recibió una dosis total de 90 mg/kg de melatonina distribuida en 3 dosis (30 mg/kg cada una, disuelta en 300 µl de 0,25% etanol: salino) de forma secuencial de acuerdo al esquema de la **figura 20**: la primera dosis 30 minutos antes de la operación (vía intraperitoneal), la segunda justo después de la operación (vía subcutánea), y la tercera a las 4 horas (vía subcutánea) después del procedimiento quirúrgico.

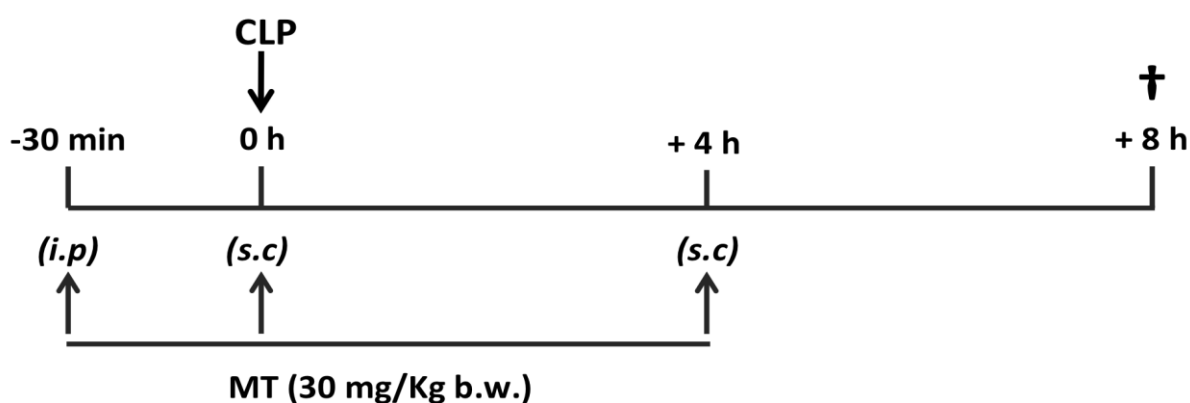


Figura 20. Diagrama del modelo experimental utilizado

Todos los animales se sacrificaron por dislocación cervical a las 8 horas de realizada la cirugía. Una vez sacrificados, se extrajeron rápidamente los corazones, que se procesaron inmediatamente para la evaluación de la respiración mitocondrial o se congelaron en

nitrógeno líquido, conservándose a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análisis posteriores. Los datos obtenidos durante este estudio se compararon en todo momento con ratones de 3 meses de edad de la misma cepa (CY).

2. AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN CITOSÓLICA Y NUCLEAR

El aislamiento de las fracciones citosólica y nuclear se llevó a cabo mediante el protocolo especificado en el Nuclear Extract kit (Active Motif Europe, La Hulpe, Bélgica). Este protocolo, basado en centrifugación diferencial, nos permitió obtener fracciones puras, libres de contaminación, que se utilizaron para realizar las distintas técnicas analíticas.

Una vez descongelado, el corazón, se lavó en solución salina fría, se troceó mediante tijeras de disección y se homogenizó en un homogenizador de teflón (Stuart Scientific, mod. SS2) a 800 rpm que contenía 1/4 p/v de PBS al que se le adicionó un 5% de PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer, NaF 125 mM, β -glicerofosfato 250 mM, p-nitrofenilfosfato 250 mM, NaVO_3 25 mM, pH 7,4). Todas estas manipulaciones se realizan en hielo para mantener una temperatura estable de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, el homogenado se centrifugó a 300 g durante 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Beckman Avanti™ 30, rotor de ángulo fijo F1010), y el pellet obtenido se resuspendió suavemente mediante pipeteo en 500 μl de buffer hipotónico frío (HEPES 20 mM, NaF 5 mM, Na_2MoO_4 10 μM , EDTA 0,1 mM, pH 7,5). La resuspensión se incubó durante 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, tras lo cual se añadieron 50 μl de IGEPAL CA-630 al 10%, mezclando nuevamente los componentes de forma suave por pipeteo. La mezcla se centrifugó a 14.000 g durante 1 minuto a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante procedente de esta nueva centrifugación, que corresponde a la fracción citosólica, se alicuotó y se guardó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mientras tanto, el pellet obtenido, se resuspendió en 200 μl de buffer de lisis frío (HEPES 20 mM, glicerol 20%, NaCl 420 mM, MgCl_2 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, NaF 20 mM, DTT 0,5 mM, leupeptina 1 mg/ml y PMSF 0,2 mM, pH 7,9), y se incubó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos en

agitación constante. Finalmente, pasado este tiempo de incubación, se centrifugó la mezcla a 14.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido, que corresponde a la fracción nuclear pura, se alicuotó y congeló a -80 °C.

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

3.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó mediante el kit comercial Real Total RNA Spin Plus (Durviz SL, Valencia, España), ajustando el protocolo inicial a las características de nuestro tejido. Este protocolo permite la obtención de RNA total libre de DNA a partir de tejidos animales utilizando para ello columnas con una membrana de sílica.

Protocolo

A la alícuota de tejido congelado se añadieron 700 µl de solución de lisis y 7,5 µl de β-mercaptoetanol (hasta 30 mg de tejido), proporcionando así a la muestra los agentes caotrópicos necesarios para inactivar inmediatamente las RNasas (presentes en todos los materiales biológicos) y crear las condiciones de unión apropiadas que favorecerán la posterior absorción del RNA en la membrana de sílica. La mezcla se homogenizó (homogenizador Dispomix System, Medic Tools AG, Suiza) a 2.500 rpm durante 2 ciclos de 15 segundos. Para aumentar el rendimiento durante el proceso de extracción de RNA, se procedió a la digestión del homogenado con la adición de 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml, Qiagen, Alemania) y posterior incubación de la mezcla durante 10 minutos a 55 °C. A continuación, se centrifugó a 10.000 g durante 3 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante obtenido se depositó en una columna de filtración, centrifugándose a 11.000 g durante un minuto con el objeto de reducir la viscosidad y limpiar el lisado. El filtrado se transfirió a un nuevo tubo de centrifuga, al que se añadió 1 ml de etanol al 70%, mezclándose

por vórtex o pipeteo. Esta mezcla se depositó en una columna de unión a RNA, y se centrifugó a 11.000 g durante un minuto. Seguidamente, se añadieron 350 µl de tampón de desalado de membrana y se centrifugó a 11.000 g durante un minuto con el objeto de secar la membrana. Asimismo, la eliminación de las sales de la membrana produjo una digestión de la DNasa mucho más efectiva. Tras este paso, se preparó la mezcla de reacción de la DNasa (10 µl de DNasa reconstituida y 90 µl de tampón de reacción de DNasa), y se aplicaron 95 µl de dicha mezcla directamente en el centro de la membrana de sílica de la columna, incubándose durante 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añadieron 200 µl de la solución STOP/DNasa a la columna y se centrifugó a 11.000 g durante un minuto, colocándose la columna en un nuevo tubo de recolección. A continuación, se añadieron 600 µl de solución de lavado a la columna y se centrifugó a 11.000 g durante un minuto. Se desechó el sobrenadante y se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección, al que se añadieron 250 µl de la solución de lavado y se centrifugó a 11.000 g durante 2 minutos, lo que permitió secar por completo la membrana. Finalmente, se colocó la columna en un microtubo estéril de 1,5 ml y se añadieron 30 µl de agua libre de nucleasas, incubándose un minuto a temperatura ambiente y centrifugándose posteriormente a 11.000 g durante un minuto. Este último paso se repitió con otros 30 µl de agua libre de nucleasas, incubándose un minuto a temperatura ambiente y centrifugándose nuevamente a 11.000 g durante otro minuto. Una vez obtenido el RNA se cuantificó en NanoDrop (NanoDrop ND-1000 V3.5.2, NanoDrop Technologies, USA), y se verificó su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Por último, el RNA se alicuotó y se guardó a -80 °C para su posterior transcripción inversa a cDNA (DNA copia).

3.2. Reacción de transcripción inversa

El cDNA se sintetizó a partir de 400 ng de RNA total mediante el kit qScript cDNA SuperMix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD, USA), siguiendo las indicaciones de la

casa comercial. La reacción de transcripción inversa se constituyó en base a 4 μ l de qScript cDNA SuperMix (5X) a los que se añadió un volumen variable de RNA (400 ng) y agua libre de nucleasas de manera que el volumen final de reacción fue de 20 μ l. La mezcla se agitó suavemente con vórtex y se centrifugó brevemente para juntarlos componentes en la parte inferior del tubo de reacción. Finalmente, las muestras se cargaron en un termociclador Techne Thermal Cycler/PCR modelo FTGene2D (Techne, Cambridge, UK) donde se programaron las condiciones especificadas en la **tabla 1**, para que se llevara a cabo la reacción de transcripción inversa. Tras finalizar el programa, el cDNA obtenido se alicuotó y se guardó a -20 °C hasta su posterior uso.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	25	42	85	4
Tiempo (min)	5	30	5	∞

Tabla 1. Condiciones programadas en el termociclador para la transcripción inversa

3.3. RT-PCR cuantitativa

La RT-PCR cuantitativa se realizó en el equipo Stratagene Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies, Madrid, Spain) usando SYBR Green SuperMix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La secuencia de primers usados, que se diseñaron mediante el software Beacon Designer v. 4.0 (Premier Biosoft Inc., Palo Alto, CA, USA), se indican en el **anexo 1 (páginas 163-164)**. Los resultados obtenidos se analizaron con el software MxPro™ QPCR Software v. 4.0 (Agilent Technologies, Madrid, Spain) de acuerdo a la curva estándar generada en base a concentraciones crecientes de cDNA (0,05, 0,5, 5, 50 y 500 ng). Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a los valores de expresión de β -actina para cada muestra, usando el grupo control de tres meses de edad (CY) como grupo calibrador, y el agua como control

negativo. El análisis de la expresión de cada uno de los genes de interés se realizó en base a las condiciones descritas en la **tabla 2**. Tras la correcta mezcla de los componentes indicados, evitando en todo momento la formación de burbujas, las muestras de cDNA se sometieron al programa de ciclos mostrados en la **tabla 3**.

	TNF α	IL-1 β	I κ B α	NLRP3	Casp-1	HIF-1 α	Rev-Er β	Bmal1	Clock	SIRT1	NAMPT	ASC
FSU SYBR	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Primers forward	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	1,5 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	1 μ l (10 μ M)	1 μ l (10 μ M)	1 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)
Primers reverse	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	1,5 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	1 μ l (10 μ M)	1 μ l (10 μ M)	1 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)
cDNA	1 μ l (80 ng)	1 μ l (400 ng)	1 μ l (40 ng)	1 μ l (80 ng)	1 μ l (80 ng)	1 μ l (400 ng)	1 μ l (40 ng)	1 μ l (80 ng)	1 μ l (400 ng)	1 μ l (40 ng)	1 μ l (40 ng)	1 μ l (400 ng)
H₂O libre nucleasas	7,8 μ l	7,8 μ l	6 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l	7 μ l	7 μ l	7 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l

	ROR α	GPx	GRd	Catalasa	SOD1	γ -GCS	G6PDH	P53	Bax	Bcl2	Casp-3
FSU SYBR	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Primers forward	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)
Primers reverse	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)	0,6 μ l (10 μ M)
cDNA	1 μ l (80 ng)	1 μ l (400 ng)	1 μ l (400 ng)	1 μ l (40 ng)	1 μ l (80 ng)	1 μ l (400 ng)	1 μ l (400 ng)	1 μ l (400 ng)	1 μ l (80 ng)	1 μ l (400 ng)	1 μ l (400 ng)
H₂O libre nucleasas	7,8 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l	7,8 μ l

Tabla 2. Condiciones de RT-PCR para el análisis de expresión de los genes descritos.

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

Tabla 3. Programa de ciclos de RT-PCR cuantitativa

4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA POR WESTERN BLOT

Una vez descongelada la fracción citosólica o nuclear, se trató con un buffer constituido en base a SDS 2,5%, β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,01%. Esta mezcla, que lleva un volumen de muestra necesario para que la cantidad de proteína posteriormente cargada en la electroforesis sea la deseada (10-20 μ g de proteína), se incubó a 99 °C durante cinco minutos y posteriormente a 4 °C durante el mismo período de tiempo. El tratamiento de la muestra se completó con una breve centrifugación a velocidad máxima (13.200 rpm). Tras esta secuencia de pasos se consigue no sólo desnaturalizar la proteína a su estructura lineal primaria, facilitando así la unión del anticuerpo a su epítipo correspondiente, sino también eliminar cualquier material insoluble que pueda presentarse en la muestra y que será responsable de la aparición de “arrastres” durante la electroforesis.

Protocolo

Las muestras, una vez preparadas, se corrieron en un gel de poliacrilamida al 7,5% o al 12,5% en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato (SDS-PAGE) (PhastGel Media Homogeneous, GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, Spain). Tanto el porcentaje de poliacrilamida empleado, como la cantidad de proteína aplicada en el gel variaron en función de la proteína que se analizó (Tabla 4). La separación electroforética, en un gel del

7.5% SDS-PAGE, se realizó bajo las siguientes condiciones: paso 1.1: 250 V, 10 mA, 3 W, 15 °C, 1 vh; paso 1.2: 250 V, 1 mA, 3 W, 15 °C, 1 vh; paso 1.3: 250 V, 10 mA, 3 W, 15 °C, 60 vh. Estas condiciones fueron similares para el gel del 12.5% SDS-PAGE a excepción del paso 1.3, cuyas condiciones fueron las siguientes: 250 V, 10 mA, 3 W, 15 °C, 70 vh. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond™-ECL™ nitrocellulose membrane, GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, Spain) bajo las siguientes condiciones: 20 V, 25 mA, 1 W, 15 °C, 5 vh. Tanto la electroforesis como la transferencia se llevaron a cabo en el equipo Phastsystem™ (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, Spain). Tras la transferencia, la membrana se tiñó para la visualización de las proteínas con una solución de Rojo Ponceau (Rojo Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3% y ácido acético 3%) y se bloqueó durante 1-4 horas a temperatura ambiente en tampón de bloqueo PBS-T (fosfato potásico 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4, Tween20 0,01%) más 5% de BSA o leche descremada en polvo. Los tiempos de bloqueo así como la composición del tampón empleado para cada proteína se especifican en la **tabla 4**. A continuación, se incubó la membrana durante la noche (aproximadamente 16 horas) a 4 °C en agitación constante con el anticuerpo primario específico diluido en el tampón de bloqueo. Tras la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó 3 veces con PBS-T durante 10 minutos y se incubó 1 hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario diluido en PBS-T. Las referencias de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el estudio, así como las diluciones empleadas, se especifican en la **tabla 4** y **anexo 2 (páginas 165-166)**. Por último, la membrana se volvió a lavar 3 veces con PBS-T durante 10 minutos y se reveló con la adición del reactivo de quimioluminiscencia ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, Spain) según las instrucciones del fabricante. La imagen se digitalizó con el equipo de imagen Kodak Image Station 2000R (Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA) y se cuantificó mediante el uso del software 1D Image Analysis (versión 3.6).

	NF- κ B	IL-1 β	TNF α	iNOS	I κ B α	NLRP3	ASC	Caspasa-1	Caspasa-1 p20
μgprot/ pocillo	10 μ g	15 μ g	15 μ g	22 μ g	12 μ g	15 μ g	15 μ g	15 μ g	15 μ g
SDS-PAGE	12,5 %	12,5 %	12,5 %	7,5 %	12,5 %	7,5 %	12,5 %	12,5 %	12,5 %
Bloqueo	2 h PBS-T+5% BSA	3 h PBS-T+5% BSA	2 h PBS-T+5 % BSA	2 h PBS-T+5% milk	2 h PBS-T+5% BSA	1 h PBS-T+5% BSA	1 h PBS-T+ 5% BSA	2 h PBS-T+ 5% BSA	3 h PBS-T+5% BSA
Ac 1°	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:250	1:500	1:250	1:200
Ac 2°	Anti-mouse 1:500	Anti-mouse 1:1000	Anti-mouse 1:500	Anti-rabbit 1:5000	Anti-mouse 1:1000	Anti-mouse 1:1000	Anti-mouse 1:1000	Anti-mouse 1:1000	Anti-goat 1:1000

	ROR α	Sirt1	PGC-1 α	P53	Bax	Bcl2	Caspasa-3	Citocromo c	GAPDH
μgprot/ pocillo	12 μ g	22 μ g	12 μ g	15 μ g	15 μ g	15 μ g	15 μ g	15 μ g	10-22 μ g
SDS-PAGE	12,5 %	7,5 %	12,5 %	12,5 %	12,5 %	12,5 %	12,5 %	12,5 %	7,5 / 12,5 %
Bloqueo	3 h PBS-T+5% BSA	2 h PBS-T+5% milk	2 h PBS-T+ 5% milk	2 h PBS-T+5% BSA	2 h PBS-T+5% BSA	2 h PBS-T+5% BSA	2 h PBS-T+5% BSA	2 h PBS-T+5% BSA	1 h PBS-T+5% BSA
Ac 1°	1:100	1:100	1:250	1:100	1:100	1:100	1:100	1:500	1:250
Ac 2°	Anti-goat 1:1000	Anti-mouse 1:1000	Anti-rabbit 1:5000	Anti-rabbit 1:5000	Anti-rabbit 1:5000	Anti-rabbit 1:5000	Anti-mouse 1:1000	Anti-mouse 1:1000	Anti-rabbit 1:5000

Tabla 4. Condiciones de Western Blot para el análisis del contenido de las proteínas descritas.

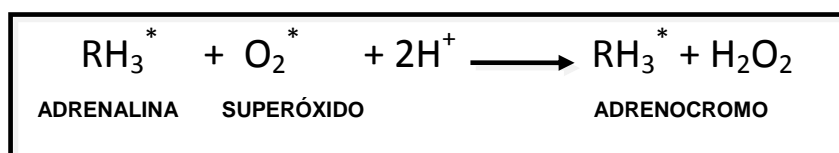
5. DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO CELULAR

5.1. Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu-Zn-SOD; SOD1)

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

Independientemente del metal que actúe como cofactor, las diferentes isoformas de la SOD representan la primera línea de defensa de las células ante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), catalizando la conversión del radical anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno ($O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$).

El método utilizado para la determinación de la SOD1 se basa en el desarrollado por Misra y Fridovich (Misra y Fridovich, 1972): la adrenalina, en medio alcalino, experimenta una auto-oxidación generándose anión superóxido que, a su vez, transforma la adrenalina en adrenocromo. Evidentemente, en presencia de SOD1, la producción de dicho adrenocromo se reduce al neutralizar esta enzima la síntesis de anión superóxido:



Reacción catalizada por la SOD

Asimismo, para valorar la acción del enzima es preciso hallar previamente la dosis inhibitoria 50 (ID50), es decir, la cantidad de proteína (enzima) capaz de inhibir en un 50% la producción del adrenocromo; por tanto, la actividad de la SOD1 se expresará en U/mg de proteína, definiéndose una unidad (U) como la cantidad de proteína equivalente capaz de inhibir la producción de adrenocromo un 50 %.

Protocolo

Antes de llevar a cabo la determinación de la actividad enzimática, fue necesaria la extracción de la SOD1 presente en nuestras muestras experimentales. Para ello, se realizó una dilución 1/5 de la muestra en agua Milli-Q y, en un tubo de vidrio, se añadió 500 µl de dicha dilución y 800 µl de una mezcla etanol-cloroformo (1.66/1). A continuación se agitó manualmente durante 60 segundos y se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, recogiendo el sobrenadante correspondiente a la SOD1 que se mantuvo en hielo hasta su posterior uso (máximo 24 horas).

Una vez se extrajo la SOD1, se procedió a preparar adrenalina 6 mM en HCl 1 mM, evitando en todo momento su exposición a la luz para evitar su auto-oxidación. Asimismo, se realizaron distintas diluciones de la muestra en función de lo especificado en la siguiente tabla:

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

Finalmente, la actividad de la SOD1 se determinó en microplaca en las que se tuvo en cuenta, como consideraciones generales, que (1) la adrenalina debía ser el último reactivo

que se añadía, al ser la responsable de iniciar la reacción, y (2) asegurarnos de que los distintos reactivos se mezclaran de forma correcta.

- El primer pocillo de la microplaca, correspondiente al blanco de reacción, se constituyó en base a 250 µl de tampón carbonato 50 mM/EDTA-Na₂ 0,1 mM, 20 µl de HCl 1 mM y 30 µl de agua Milli-Q.

- En el segundo pocillo tuvo lugar la reacción de la adrenalina, en la cual se observó la máxima formación de adrenocromo ya que este punto no muestra SOD en su composición: 250 µl de tampón carbonato 50 mM/EDTA-Na₂ 0,1 mM, 20 µl de adrenalina 6 mM y 30 µl de agua Milli-Q.

- Los restantes pocillos correspondieron a la reacción de la SOD, en los cuales determinamos la actividad enzimática a distintas diluciones de la muestra.

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

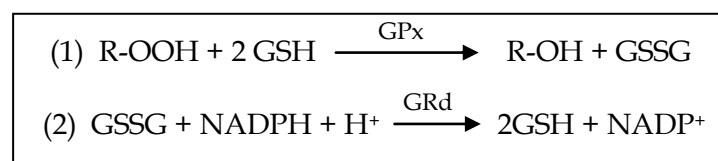
La lectura se realizó en un espectrofotómetro de placa (Bio-Tek Power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer) a 480 nm y a una temperatura de 30 °C. Se obtuvieron valores de absorbancia cada 30 segundos durante un período de tiempo de 10 minutos, determinándose para cada punto de reacción el intervalo de tiempo en el cual el incremento de absorbancia mostró una mayor tendencia lineal. Una vez se anotaron tanto los intervalos de tiempo como sus correspondientes absorbancias, procedimos a aplicar la fórmula ((Δ Absorbancia/ Δ tiempo de reacción) x60), diseñando con los valores obtenidos la función

lineal y exponencial que mejor se ajustó a nuestros valores de absorbancia, escogiendo para la determinación de la actividad de la SOD1 aquella función cuyo valor de regresión fue más cercano a la unidad.

5.2. Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) citosólica

La glutatión peroxidasa (GPx; EC 1.11.1.9) muestra dos isoformas diferentes, una dependiente de selenio (Se-GPx) y otra independiente de este elemento (iSe-GPx), siendo ambas capaces de usar hidroperóxidos orgánicos (t-BHP, cumeno hidroperóxido) como sustratos, si bien sólo la Se-GPx es capaz de utilizar la forma inorgánica (H_2O_2) (Lawrence y Burk, 1976). Otra diferencia entre ambas isoformas reside en su localización celular, al ser descrita la Se-GPx como la isoforma mitocondrial, mientras que la iSe-GPx es exclusivamente citosólica (Lawrence y Burk, 1978). Sin embargo, debido a la cierta controversia que existe respecto a esta localización, la actividad de la GPx se determinó usando como sustrato un hidroperóxido orgánico utilizado por ambas isoformas.

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



Por tanto, la actividad de la GPx se midió de manera indirecta siguiendo la oxidación del NADPH a 340 nm.

Protocolo

La actividad de la GPx se determinó incubando 10 μl de muestra en una microplaca durante 4 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$ con 240 μl de una solución de trabajo compuesta por fosfato

potásico 50 mM, EDTA dipotásico 1 mM, azida sódica 4 mM, GSH 4 mM, NADPH 0,2 mM y GRd (0,5 U/ml), pH 7,4. Tras la incubación se añadieron 10 µl de cumeno hidroperóxido (1:250 en buffer fosfato potásico 50 mM, EDTA dipotásico 1 mM, pH 7,4) para iniciar la reacción y se midió la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos en un espectrofotómetro de placa (BioTek Power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer). En todas las determinaciones se restó la oxidación no enzimática del NADPH sustituyendo los 240 µl de la solución de trabajo por NADPH 0,2 mM en buffer fosfato potásico 50 mM, EDTA dipotásico 1 mM, pH 7,4. La actividad de la GPx se expresó en nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína en base a la siguiente ecuación:

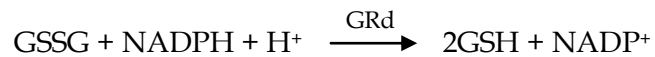
$$\text{Actividad GPx} = \frac{\Delta \text{Abs cat.} - \Delta \text{Abs no cat.}}{0.0062} \times \frac{\text{Vol. total}}{\text{Vol. muestra}} \times \frac{1}{\text{mg prot. muestra}}$$

(nmol NADPH/min/mg prot)

5.3. Determinación de la actividad de la glutatión reductasa (GRd) citosólica

La acción catalítica de la GPx conlleva la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG); por ello, la acción de la GPx lleva asociada la puesta en marcha de un sistema cíclico que restaura nuevamente los niveles de GSH. En dicho sistema cíclico, la glutatión reductasa (GRd; EC 1.6.4.2) va a catalizar la reducción del GSSG a GSH, requiriendo para tal acción el poder reductor del NADPH que se convierte en NADP⁺, si bien la acción acoplada de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) restablece nuevamente el *pool* celular de NADPH.

En base a estas consideraciones teóricas, la determinación de la actividad de la GRd se realizó de forma directa en base al método descrito por Jaskot y colaboradores (Jaskot y cols., 1983), el cual permite la cuantificación del NADPH que se va oxidando como consecuencia del proceso de reducción del GSSG catalizado por la GRd, tal y como se muestra en la siguiente reacción:



Protocolo

La actividad de la GRd se determinó incubando 35 μl de muestra con 465 μl de una solución de trabajo compuesta por fosfato potásico 50 mM, EDTA dipotásico 1 mM y GSSG 2 mM, a pH 7,4. Tras una incubación a 37 °C durante 4 minutos, se añadió 8,5 μl de NADPH 9,5 mM preparado en fosfato potásico 50 mM, EDTA dipotásico 1 mM, pH 7,4. La oxidación del NADPH se registró durante 3 minutos a 340 nm en un espectrofotómetro de cubeta (UV-1700 Shimadzu spectrophotometer). En todas las determinaciones se restó la oxidación no enzimática del NADPH mediante la sustitución de los 465 μl de la solución de trabajo por el mismo volumen de buffer fosfato potásico 50 mM, EDTA dipotásico 1 mM, pH 7,4. La actividad de la GRd se expresó en nmol NADPH oxidado/min/mg de proteína en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad GRd} = \frac{\Delta \text{Abs cat.} - \Delta \text{Abs no cat.}}{0.0062} \times \frac{\text{Vol. total}}{\text{Vol. muestra}} \times \frac{1}{\text{mg prot. muestra}}$$

(nmol NADPH/min/mg prot)

5.4. Determinación de la actividad de la catalasa (CAT)

El peróxido de hidrógeno generado por la SOD1 puede detoxificarse, además de por el sistema GPx/GRd, por acción de la catalasa (CAT; EC 1.11.1.6), una enzima que si bien no presenta una actividad mayoritaria en el citosol (representa un 20% del total, registrándose el 80% restante a nivel peroxisomal), muestra una gran eficiencia en la conversión del H_2O_2 a H_2O y O_2 ($2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Además de esta actividad catalítica, la catalasa muestra una actividad peroxidasa, catalizando la oxidación de compuestos reducidos tales como metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles, bajo condiciones de pH básico ($\text{ROOH} + \text{AH}_2 \longrightarrow$

H₂O + ROH + A).

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

Protocolo

Para evaluar la actividad de la catalasa se empleó el método desarrollado por Aebi, 1984 (Aebi, 1984) basado en medir la disminución del H₂O₂ por la acción catalítica del enzima. Para ello, se mezcló la muestra citosólica (concentración final: 0,15 mg/ml) con una solución de trabajo compuesta por fosfato potásico 50 mM, pH 7 y H₂O₂ 15 mM hasta un volumen final de reacción de 500 µl. El descenso en la densidad óptica se registró durante 3 minutos a 240 nm en un espectrofotómetro de cubeta (UV-1700 Shimadzu spectrophotometer). La actividad de la catalasa se expresó en µmoles/min/mg de proteína en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = \frac{\Delta \text{ Absorbancia/min} \times 1000}{39,58 \text{ (C.E para H}_2\text{O}_2) * \text{ con. final muestra}}$$

6. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ANALÍTICOS POR ELISA

6.1 Cuantificación de la capacidad de unión al DNA de NF-κB p65

Para la cuantificación de la capacidad de unión al DNA de la subunidad p65 de NF-κB se utilizó el kit TransAM™ NF-κB p65 (Active Motif Europe, Rixensart, Bélgica). Este kit ofrece una forma de medida de alta calidad para cuantificar la activación de NF-κB al contener una

placa con 96 pocillos en los cuales ha sido inmovilizado un oligonucleótido que contiene la secuencia consenso para NF- κ B (5'-GGGACTTCC-3'). La forma activa de este factor nuclear se unirá específicamente a este nucleótido. El anticuerpo primario usado para detectar al factor de transcripción reconoce un epítipo únicamente accesible cuando NF- κ B se encuentra activado y, por tanto, unido a su DNA diana. Un anticuerpo secundario conjugado con HRP es el encargado de proporcionar una reacción colorimétrica sensible de ser detectada por métodos espectrofotómetros.

Protocolo

En primer se preparó la placa proporcionada por el kit para la unión de NF- κ B a su secuencia consenso, añadiendo para ello 30 μ l de *Complete Binding Buffer* a cada pocillo. A continuación, se adicionó 20 μ l de la muestra (concentración final de 20 μ g), del extracto nuclear Jurkat proporcionado por el kit (concentración final de 2,5 μ g) o de *Complete Binding Buffer* en función de si el pocillo se definió como muestra, control positivo o blanco, respectivamente. Una vez dispensada la placa conforme a los volúmenes anteriormente mencionados, procedimos a sellarla e incubarla durante una hora a temperatura ambiente con una agitación media de 100 rpm. Pasado este tiempo, se lavó cada pocillo 3 veces con 200 μ l de *Washing Buffer 1X*. Tras finalizar estos lavados, se añadió 100 μ l del anticuerpo NF- κ B diluido (1:1000) en *Antibody Binding Buffer*, se selló la placa, e incubó nuevamente una hora a temperatura ambiente sin agitación. Finalizada la incubación con el anticuerpo primario, se lavó la placa nuevamente con *Washing Buffer 1X* de forma similar a lo descrito con anterioridad y se incubó 1 hora a temperatura ambiente sin agitación con 100 μ l del anticuerpo HRP diluido (1:1000) en *Antibody Binding Buffer 1X*. Tras los pertinentes lavados, se añadieron 100 μ l de la *Developing Solution* y se incubó de 30 segundos a 5 minutos a temperatura ambiente hasta que el color de las muestras viró a un color azul intenso. Finalmente, se adicionaron 100 μ l de la *Stop Solution*, tornándose las muestras del color azul

oscuro a un color amarillo. La lectura de absorbancias se realizó en un espectrofotómetro de placas (Bio-Tek Power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer) a 450 nm, expresándose la capacidad de unión de NF- κ B al DNA en términos de densidad óptica. La lectura de absorbancia se realizó antes de que transcurrieran 5 minutos tras la adición de la *Stop Solution*.

6.2. Determinación de los niveles intracelulares de NAD⁺

La determinación de los nucleótidos de nicotinamida es de especial interés en estudios sobre el estado redox y transformaciones energéticas, tanto en células como tejidos. Para una rápida, sensible y precisa medida de los niveles celulares de NAD⁺, NADH y su cociente, se utilizó el kit NAD/NADH Assay Kit (Abcam, Cambridge, MA, USA). Se trata de un kit colorimétrico que, gracias a la presencia del componente *NAD Cycling Enzyme Mix*, reconoce específicamente NAD⁺ y NADH, pero no NADP⁺ o NADPH, en una reacción de reciclaje enzimático, sin necesidad de purificar las muestras.

Protocolo

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

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

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

Tras la preparación de todos los estándares y las muestras, se cargó una placa de 96 pocillos, por duplicado, con 50 μ l de las diferentes diluciones de los estándares, 50 μ l de las muestras sin tratar, y 50 μ l de las muestras en las cuales se ha procedido a la descomposición del NAD⁺. Seguidamente se añadió 100 μ l del *Reaction Mix* (constituido por 98 μ l de *NADH Cycling Buffer* y 2 μ l de *NADH Cycling Enzyme Mix*) a todos los pocillos, y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos, período de tiempo suficiente para convertir el NAD⁺ en NADH. Finalmente se adicionaron 10 μ l del *NADH Developer*, realizando lecturas de absorbancias a 450 nm entre las 1-4 horas. Las concentraciones de NAD⁺, NADH y NAD total se expresaron en μ g/mg proteína, conociendo el peso molecular del NADH (664,4 g/mol) y mediante la aplicación de las siguientes fórmulas:

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

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

$$[\text{NAD}^+] = [\text{NADt}] - [\text{NADH}]$$

7. ANÁLISIS DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

El análisis de la función mitocondrial se llevó a cabo mediante el sistema de respirometría de alta resolución Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) equipado con un electrodo TPP⁺ ion selectivo (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) y un electrodo de referencia MI-401 (Microelectrodes Inc., Bedford, USA). El análisis del estado respiratorio se realizó en fibras musculares de corazón, lo que permitió el acceso experimental y evaluación de todo tipo de mitocondrias, descartándose así la posibilidad de una pérdida selectiva de mitocondrias dañadas durante el proceso de aislamiento mitocondrial (Larsen y cols., 2014).

Protocolo

Antes de llevar a cabo el análisis de la función mitocondrial, se realizaron una serie de calibraciones y determinaciones del error instrumental para corregir los parámetros respiratorios, proporcionando la base experimental para una gran exactitud en las medidas. En primer lugar se procedió a la obtención de 0,7 mg de fibras musculares, que se permeabilizaron mediante métodos mecánicos (separación manual de los haces de fibras mediante la utilización de pinzas con punta angular especial durante 1- 2 minutos) y químicos, sumergiendo las fibras en una solución de saponina 5 mg/ml en buffer de preservación BIOPS (del inglés *Biopsy Preservation Solution*), el cual estaba compuesto por

CaK₂EGTA 2,77 mM, K₂EGTA 7,23 mM, Na₂ATP 5,7 mM, MgCl₂ · 6H₂O 6,56 mM, taurina 20 mM, fosfocreatina disódica 15 mM, imidazol 20 mM, DTT 0,5 mM y MES 50 mM, pH 7,1 (Pesta y Gnaiger, 2012). Una vez permeabilizadas, las fibras musculares se dispusieron en el interior de las cámaras del respirómetro a 37 °C, en continua agitación (750 rpm), y en un volumen de 2 ml de medio de respiración MiR06Cr (EGTA 0,5 mM, MgCl₂ · 6H₂O 3mM, taurina 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20 mM, D-sacarosa 110 mM, BSA libre de ácidos grasos 1 g/l, ácido lactobiónico 60 mM y catalasa 280 unidades/ml, pH 7,1, enriquecido con creatina 3 mg/ml). La respiración mitocondrial se determinó con glutamato 10 mM, malato 2 mM, piruvato 2 mM y succinato 10 mM. Tras la adición de concentraciones saturantes de ADP, la capacidad máxima del sistema de transferencia de electrones mitocondrial (ETS, del inglés *Electron Transfer System*) se estimó en presencia del agente desacoplante carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP) a una concentración óptima de 1 μM. Los datos se obtuvieron y se analizaron mediante el software DatLab 4 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). El consumo de oxígeno obtenido en estas determinaciones, en pmol/min/mg de proteína, se expresó como porcentaje del control.

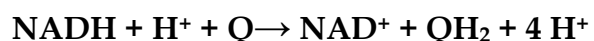
8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS MITOCONDRIALES

8.1. Complejos I, II, III y IV

El método utilizado para la determinación de la actividad de los cuatro complejos respiratorios se basa en el desarrollado por Birch-Machin (Birch-Machin y cols., 1994), con ligeras modificaciones para el uso de homogenado en lugar de mitocondrias aisladas. Así, los corazones se lavaron en suero salino y, posteriormente, se trocearon y homogenizaron en medio CPT frío (TRIS-HCl 50 mM y KCl 150 mM, pH 7,5) en una proporción del 10% (p/v), y a 1.000 rpm en un homogenizador de teflón (Stuart Scientific, mod. SS2). El homogenado

resultante se sonicó mediante el sonicador de ultrasonidos Sonopuls HD-2070 (Bandelin electrónica GmbH & Co. KG, Berlín, Alemania) a 3 ciclos, 35%, durante 10 segundos, y se centrifugó a 2500 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos se alicuotaron y congelaron a -80 °C. La medida de la actividad de los complejos respiratorios se llevó a cabo en un espectrofotómetro de cubeta (UV-1700 Shimadzu spectrophotometer).

El **complejo I** (NADH deshidrogenasa o NADH: ubiquinona oxidoreductasa, EC 1.6.5.3) cataliza la captación de dos electrones del NADH y los transfiere a un transportador liposoluble denominado ubiquinona (Q), reduciéndolo a ubiquinol (QH₂), el cual difunde libremente por la membrana. Al mismo tiempo el complejo I transloca cuatro protones al espacio intermembrana, produciendo un gradiente de protones:

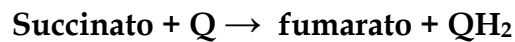


La actividad del complejo I se midió durante 3 minutos a 340 nm, tras incubar 35 µl de muestra durante 3 minutos a 30 °C, en un medio que contenía 250 µl de fosfato potásico 50 mM, pH 7,4, y al que se le añadió 50 µl de KCN 20mM, 50 µl de BSA 25 mg/ml, 5 µl de antimicina A 0,2 mg/ml, 5 µl de decil-ubiquinona 5 mM y 50 µl de MgCl₂ 50 mM. Tras la incubación, la reacción se inició al añadir 50 µl de NADH 1,3 mM. En todas las determinaciones se restó la oxidación del NADH no dependiente del complejo I mediante su inhibición con 10 µl de rotenona 100 µg/ml. La actividad del complejo I se expresó en nmol oxidados de NADH/min/mg de proteína en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad} = \frac{(\Delta \text{Abs} - \Delta \text{Abs rot}) \times 1000}{5.6 \text{ (C.E para NADH)}} / \frac{\text{mg prot} \times 35}{500}$$

El **complejo II** (succinato deshidrogenasa, EC 1.3.5.1) es el único enzima que participa tanto en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, como en la cadena de transporte electrónico. En

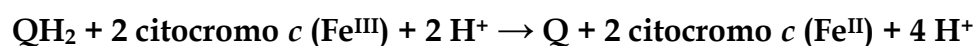
el paso 8 del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el complejo II cataliza la oxidación de succinato a fumarato con la reducción de ubiquinona a ubiquinol:



La actividad del complejo II se midió durante 3 minutos a 600 nm, tras incubar 10 µl de muestra durante 10 minutos a 30 °C, en un medio que contenía 442,5 µl de fosfato potásico 100 mM, pH 7,4, y al que se le añadió 20 µl de succinato 500 mM. Tras la incubación, la reacción se inició al añadir 5 µl de KCN 200 mM, 10 µl de rotenona 0,1 mg/ml, 2,5 µl de antimicina A 0,4 mg/ml, 5 µl de 2,6-diclorofenol indofenol (DCIP) 5 mM y 5 µl de decilubiquinona 5 mM. En todas las determinaciones se restó la reducción de DCIP no dependiente del complejo II mediante una medición a 600 nm con todos los componentes de la reacción, salvo la muestra (blanco). La actividad del complejo II se expresó en nmol reducidos de DCIP/min/mg de proteína en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad} = \frac{(\Delta \text{Abs} - \text{Blanco}) \times 1000}{19,1 \text{ (C.E para DCIP)}} / \frac{\text{mg prot} \times 10}{500}$$

El **complejo III** (ubiquinol: citocromo c reductasa, EC 1.10.2.2), transfiere dos electrones desde el ubiquinol a dos moléculas de citocromo c, que es un transportador de electrones hidrosoluble situado dentro del espacio intermembrana. Al mismo tiempo que cataliza la reducción del citocromo c, mediante la oxidación de ubiquinol a ubiquinona, transloca cuatro protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana.

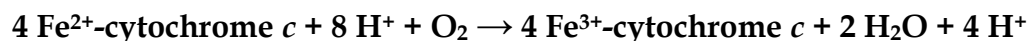


La actividad del complejo III se midió durante 30 segundos a 550 nm, tras incubar 15 µl de muestra durante 5 minutos a 30 °C en un medio que contenía 442,5 µl de fosfato potásico 100 mM, pH 7,4, y al que se le añadió 50 µl de KCN 20 mM, 25 µl de rotenona 0,1 mg/ml, 50 µl

de BSA 50 mg/ml y 50 μ l de $MgCl_2$ 100 mM. Tras la incubación, la reacción se inició al añadir 20 μ l de decil-ubiquinol 50 mM y 75 μ l de citocromo c 1mM. La actividad del complejo III se expresó en nmol de citocromo c reducido/min/mg de proteína en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad} = \frac{\Delta \text{ Abs } \times 1000}{19 \text{ (C.E para cit.c)}} / \frac{\text{mg prot } \times 15}{500}$$

El **complejo IV** (citocromo c oxidasa, EC 1.9.3.1) capta cuatro electrones de cuatro moléculas de citocromo c y los transfieren a una molécula de oxígeno (O_2), produciendo dos moléculas de agua (H_2O). Al mismo tiempo capta cuatro protones desde la matriz mitocondrial para la formación de las dos moléculas de agua, además de translocar otros cuatro protones al espacio intermembrana:



La actividad del complejo IV se midió durante 20 segundos a 550 nm, con 10 μ l de muestra en un medio que contenía 440 μ l de fosfato potásico 50 mM, pH 7,4, y al que se le añadió 50 μ l de citocromo c al 1% reducido. La actividad del complejo IV se expresó en nmol de citocromo c oxidado/min/mg de proteína en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad} = \frac{\Delta \text{ Abs } \times 1000}{19 \text{ (C.E para cit.c)}} / \frac{\text{mg prot } \times 10}{500}$$

8.2. Complejos I + III y II + III

La actividad del **complejo I + III** se midió durante 3 minutos a 550 nm (Kirby y colbs., 2007), tras incubar 10 μ l de muestra durante 5 minutos a 30 ° C, en un medio que contenía 740 μ l de fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, y al que se le añadió 50 μ l de KCN 10 mM y 100 μ l de citocromo c 1 mM. Tras la incubación, la reacción se inició al añadir 100 μ l de NADH 2

mM. En todas las determinaciones se restó la oxidación del NADH no dependiente del complejo I + III mediante la inhibición del complejo I con 10 μ l de rotenona 1mM. La actividad del complejo I + III se expresó en nmol reducidos de citocromo c/min/mg de proteína en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad} = \frac{(\Delta \text{ Abs} - \Delta \text{ Abs rot}) \times 1000}{19 \text{ (C.E para cit.c)}} / \frac{\text{mg prot} \times 10}{1000}$$

La actividad del **complejo II + III** se midió durante 3 minutos a 550 nm (Kirby y cols., 2007), tras incubar 25 μ l de muestra durante 10 minutos a 30 ° C, en un medio que contenía 715 μ l de fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, y al que se le añadió 50 μ l de KCN 10 mM, 10 μ l de rotenona 1mM y 100 μ l de succinato 30 mM. Tras la incubación, la reacción se inició al añadir 100 μ l de citocromo c 1 mM. En todas las determinaciones se restó la reducción del citocromo c no dependiente del complejo II + III, mediante una medición a 550 nm con todos los componentes de la reacción, salvo la muestra (blanco). La actividad del complejo II + III se expresó en nmol de citocromo c reducido/min/mg de proteína en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad} = \frac{(\Delta \text{ Abs} - \text{Blanco}) \times 1000}{19 \text{ (C.E para cit.c)}} / \frac{\text{mg prot} \times 25}{1000}$$

9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

El método empleado para la determinación de proteínas ha sido el de Bradford (Bradford, 1976). La elección de este método ha sido principalmente debido a su gran sensibilidad y rapidez.

El método de Bradford se basa en la unión de un colorante hidrofóbico, Comassie Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas, una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un

complejo proteína-colorante, con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre, que es fácilmente detectable por un análisis espectrofotométrico. Se trata de un método sensible (1-15 µg), simple, rápido, barato y donde pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas.

Protocolo

En primer lugar, se procedió a la elaboración de una curva patrón, en la cual se utilizó albúmina sérica bovina como estándar (disuelta en TRIS 20 mM) a concentraciones 0,05 - 0,6 mg/ml. A continuación se colocó de forma seriada, en cada pocillo de una microplaca, 10 µl del blanco, de cada una de las concentraciones de la curva patrón, así como de las muestras, por duplicado, añadiendo posteriormente 200 µl del reactivo *Protein assay dye reagent concentrate* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Por último la microplaca se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación (agitador de placas: GrantBio PMS-1000 Microplate Shaker) y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de placa (Bio-Tek Power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer), expresándose los resultados en mg de proteína/ml.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se expresaron como la media aritmética (medida de la tendencia central) ± el error estándar (medida de la dispersión de los datos), y se analizaron con el programa Prism software (GraphPad, La Jolla, CA, USA), empleando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido del test de comparación múltiple de Bonferroni. Se consideró un valor de $P < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Los resultados mostrados en este apartado corresponden al trabajo:

Same molecule but different expression: aging and sepsis trigger NLRP3 inflammasome activation, a target of melatonin. Huayqui Volt, José A. García, Carolina Doerrier, María E. Díaz-Casado, Ana Guerra-Librero, Luis C. López, Germaine Escames, Jesús A. Tresguerres, Darío Acuna-Castroviejo. *Journal of Pineal Research*, 2015; doi: 10.1111/jpi.12303.

El envejecimiento se acompaña de un estado pro-inflamatorio crónico que favorece la susceptibilidad al fallo multiorgánico ocasionado por la sepsis. En este sentido, el presente trabajo evaluó la conexión existente entre el sistema inmunitario innato, los genes reloj, y la función mitocondrial durante el envejecimiento y la sepsis en corazón de ratón, así como nuevas dianas para el uso de melatonina en pacientes de edades avanzadas con sepsis.

Nuestros resultados muestran que, durante el envejecimiento, se produce una activación y colaboración conjunta entre las vías de señalización dependientes de NF- κ B y NLRP3, de forma paralela a una disrupción en la expresión de los genes reloj y un déficit bioenergético causado por la alteración mitocondrial. Todos estos cambios, que reflejan el estado pro-inflamatorio característico del envejecimiento, aumentan de manera exagerada durante la sepsis en ratones envejecidos. La administración de melatonina, a las dosis y pautas de administración aquí usadas, suprime totalmente los efectos ocasionados por la sepsis, sin contrarrestar el proceso inflamatorio relacionado con la edad.

En conjunto, los resultados que se exponen a continuación sugieren la existencia de una serie de etapas ligadas al envejecimiento que se iniciarían con la cronodisrupción, o alteración en la expresión de los genes reloj, facilitando la activación de la inmunidad innata, el déficit mitocondrial y que finalmente amplificarían la respuesta inflamatoria asociada a la edad. Todo ello podría resumirse en el concepto de *chronoinflammaging*, como la base molecular y bioquímica del proceso de envejecimiento. Asimismo, estos resultados

identifican al inflamasoma NLRP3 como una nueva diana molecular de la melatonina durante la sepsis en ratones de edad avanzada, proporcionando una justificación para su uso en enfermedades inflamatorias dependientes del inflamasoma NLRP3.

1. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la vía dependiente del inflamasoma NLRP3

Debido a que el envejecimiento se acompaña de un proceso inflamatorio crónico de bajo grado (Franceschi y cols., 2000), el cual contribuye a una mayor vulnerabilidad a la sepsis (Saito y cols., 2003; Opal y cols., 2005; Kale y Yende, 2011), nuestro primer paso fue analizar la activación de las vías de la inmunidad innata. En este sentido, encontramos que durante el envejecimiento aumentó de forma significativa la expresión y contenido proteico de NLRP3, en comparación con ratones jóvenes, siendo este aumento significativamente mayor durante la sepsis (**Figura 21A, B**). Los niveles de mRNA y proteína de pro-caspasa-1 también aumentaron de forma significativa con la edad, sin que la sepsis modificará estos parámetros (**Figura 21A, C**). Sin embargo, el proceso séptico sí que produjo un incremento significativo en los niveles de caspasa-1 activa (p20), la cual también se indujo con la edad (**Figura 21A, C**). Por otro lado, la expresión y contenido proteico de la proteína adaptadora ASC, la cual participa en el ensamblaje del inflamasoma NLRP3, no cambió en los distintos grupos experimentales (**Figura 21A, D**). Es interesante señalar que la administración de melatonina contrarrestó totalmente el incremento en la expresión y contenido proteico de NLRP3 debidos a la sepsis, pero no el aumento dependiente de la edad (**Figura 21A, B**). Este efecto de la melatonina se observó también en el contenido de caspasa-1 activa (**Figura 21A, C**), mientras que no produjo ninguna modificación en los niveles de expresión y contenido proteico de pro-caspasa-1 y ASC (**Figura 21A, C, D**).

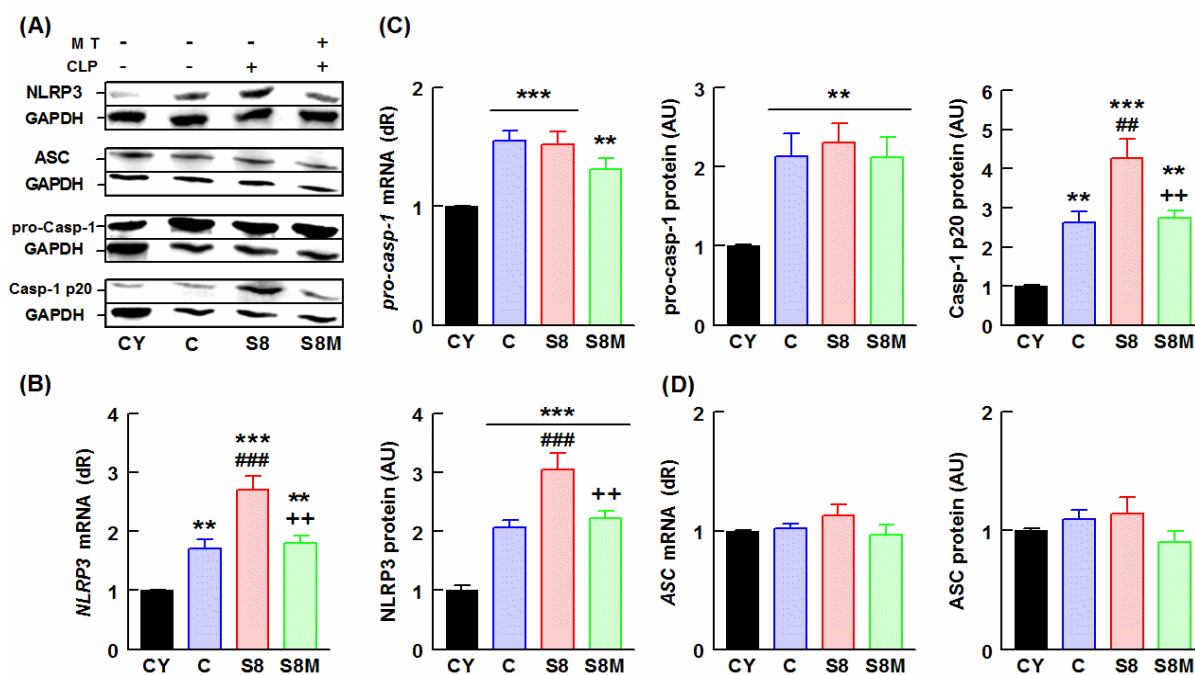


Figura 21. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la vía del inflammasoma NLRP3. (A) Western blot representativo de NLRP3, pro-caspasa-1, caspasa-1 activa (p20), y ASC. (B) Niveles de mRNA (RT-PCR) y contenido proteico (western blot) de NLRP3. (C) Análisis de los niveles de expresión génica y contenido proteico de pro-caspasa-1 y caspasa-1 p20. (D) Niveles de mRNA y contenido proteico de ASC. Los experimentos se llevaron a cabo en corazones de ratones macho de 3 (CY) y 18 meses de edad, controles (C), con sepsis (S8) y con sepsis tratados con melatonina (S8M). Los datos se expresaron como la media \pm el error estándar (SEM), con $n = 7$ animales por grupo experimental. AU, unidades arbitrarias; dR, cuantificación relativa. ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs CY; ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs C; ++ $P < 0.01$ vs S8.

2. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la vía inflamatoria dependiente de NF- κ B

Debido a que la expresión de NLRP3 se encuentra bajo el control transcripcional de NF- κ B (Bauernfeind y cols., 2009), nuestro siguiente paso fue analizar la activación de este factor de transcripción, a través de su translocación nuclear y capacidad de unión al DNA mediante western blot y ELISA, respectivamente. Nuestros resultados mostraron que ambos parámetros, contenido nuclear y capacidad de unión al DNA de NF- κ B, aumentan de forma significativa con la edad, mientras que la sepsis produjo una mayor amplificación de estas

respuestas (**Figura 22A**). El tratamiento con melatonina contrarrestó de forma efectiva el efecto de la sepsis sobre la activación de NF- κ B, pero no el de la edad (**Figura 22A**). Como consecuencia de la activación de NF- κ B con la edad, aumentaron el contenido proteico y niveles de mRNA de dos de las principales moléculas pro-inflamatorias dependientes de este factor de transcripción, TNF α e iNOS. Estas dos moléculas mostraron un incremento significativamente mayor durante la sepsis (**Figura 22C, D**). La administración de melatonina suprimió totalmente los efectos de la sepsis, pero no los de la edad, en el caso de TNF α (**Figura 22C**), mientras que en el caso de la iNOS, redujo su contenido citoplasmático hasta valores similares mostrados por los ratones de 3 meses de edad (**Figura 22D**). El proceso de envejecimiento también produjo un incremento significativo en la expresión y contenido proteico del inhibidor I κ B α , un efecto que se vio potenciado por la sepsis (**Figura 22E**). El tratamiento con melatonina no modificó la expresión de I κ B α , pero promovió su retención citosólica, reduciendo su contenido en el núcleo (**Figura 22E**), como un posible mecanismo para prevenir la translocación nuclear de NF- κ B y sus efectos posteriores. Además de estos resultados, también observamos que durante el envejecimiento se produjo un incremento en la expresión y contenido proteico de pro-IL-1 β , así como en los niveles de IL-1 β madura (**Figura 22B**). La sepsis no modificó los niveles de pro-IL-1 β , a pesar del gran aumento observado en su expresión. Sin embargo, sí produjo un aumento significativo en el contenido de IL-1 β madura (**Figura 22B**), lo que sugiere una activación del inflammasoma NLRP3 y, por tanto, la maduración de pro-IL-1 β a IL-1 β (Zhou y cols., 2011). La administración de melatonina contrarrestó nuevamente los efectos de la sepsis, reduciendo la expresión de pro-IL-1 β y el contenido proteico de la forma madura, restaurando sus valores a los mostrados por los ratones envejecidos sin sepsis (**Figura 22B**).

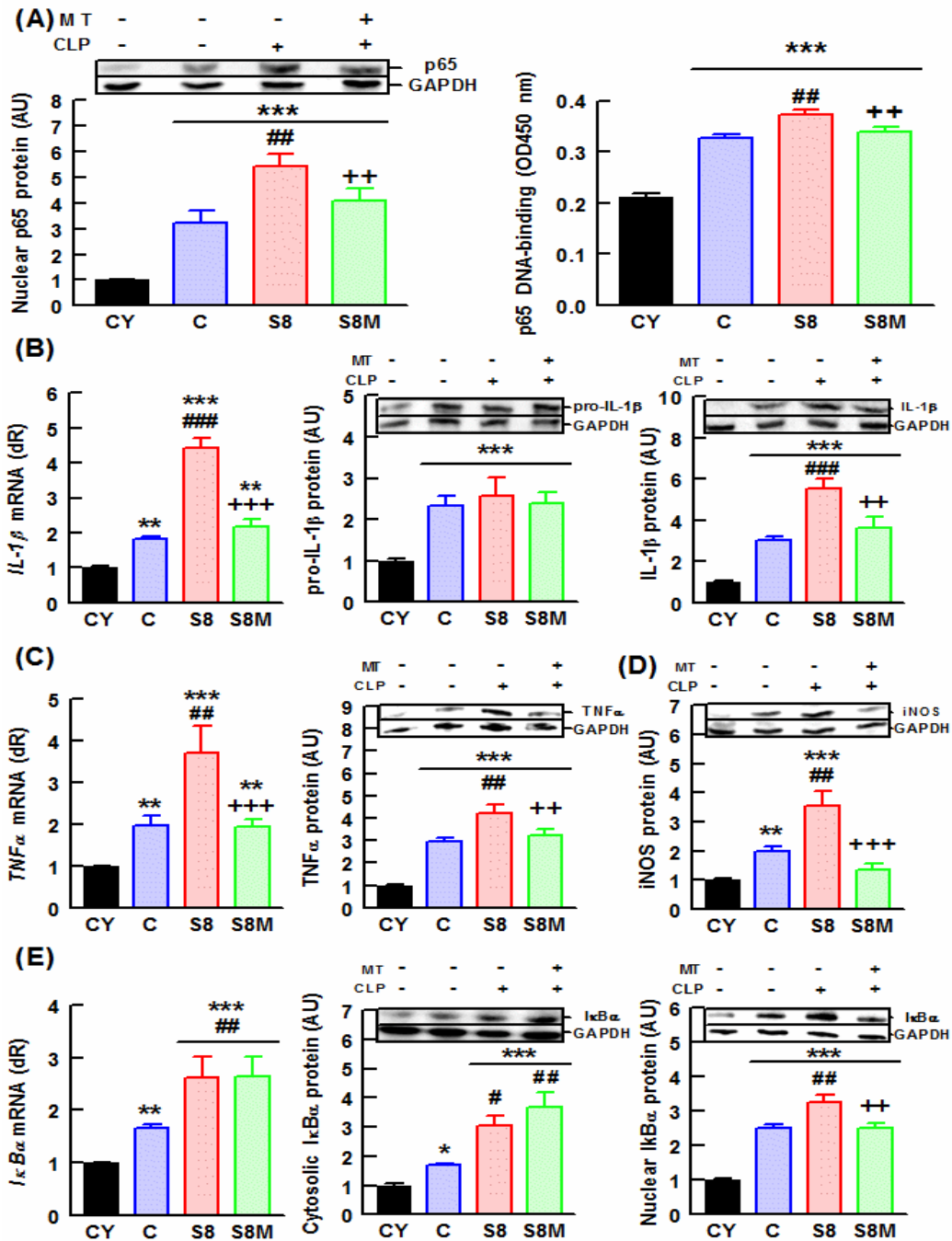


Figura 22. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la vía inflamatoria dependiente de NF-κB. (A) Análisis de los niveles nucleares y capacidad de unión de NF-κB al DNA mediante Western blot y ELISA, respectivamente. (B) Niveles de mRNA (RT-PCR) y contenido proteico (western blot) de pro-IL-1β e IL-1β madura. (C) Análisis de los niveles de expresión génica y contenido proteico de TNFα. (D) Contenido proteico de iNOS. (E) Niveles de mRNA y contenido proteico de IκBα. Los experimentos se llevaron a cabo en corazones de ratones macho de 3 (CY) y 18 meses de edad, controles (C), con sepsis (S8) y con sepsis tratados con melatonina (S8M). Los datos se expresaron como la media ± el error estándar (SEM), con n= 7 animales por grupo experimental. AU, unidades arbitrarias; dR, cuantificación relativa. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs CY; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs C; ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.01$ vs S8.

3. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la función mitocondrial

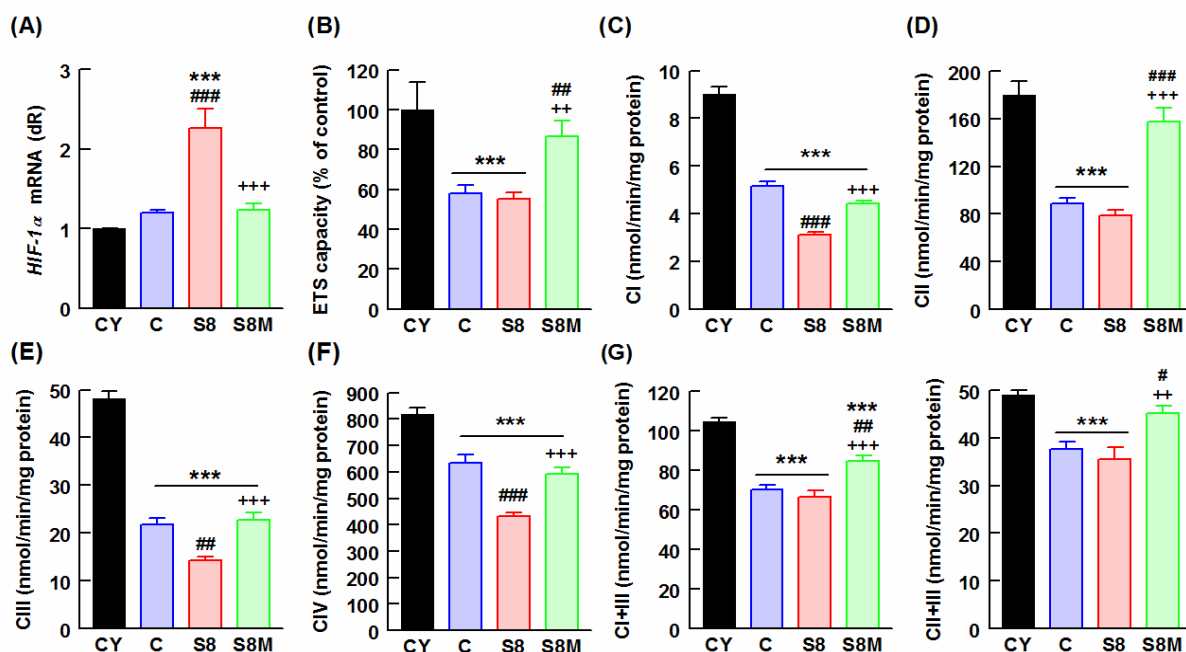


Figura 23. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la función mitocondrial. La función mitocondrial se evaluó a través de los niveles de expresión de *HIF-1 α* (A), el porcentaje de capacidad máxima del sistema de transferencia de electrones (ETS) mitocondrial (B), y el análisis de las actividades de los complejos I (C), II (D), III (E), IV (F), I + III y II + III (G) de la cadena de transporte electrónico. Los experimentos se llevaron a cabo en corazones de ratones macho de 3 (CY) y 18 meses de edad, controles (C), con sepsis (S8) y con sepsis tratados con melatonina (S8M). Los datos se expresaron como la media \pm el error estándar (SEM), con $n=6$ animales por grupo experimental. dR, cuantificación relativa. *** $P < 0.001$ vs CY; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs C; ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.01$ vs S8.

La activación del inflammasoma NLRP3 depende, entre otras señales, de la producción de ROS como consecuencia de la disfunción mitocondrial (Schroder y cols., 2010; Tschopp, 2011; Zhou y cols., 2011). Por ello, nuestro siguiente paso fue evaluar la función mitocondrial; en este sentido, encontramos que la expresión del *factor 1 inducible por hipoxia* (HIF-1 α , del inglés *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha*) se indujo de forma significativa durante la sepsis (**Figura 23A**). Este incremento en los niveles de mRNA de *HIF-1 α* , que depende de la actividad transcripcional de NF- κ B (van y cols., 2008), se acompañó de una fuerte

disminución en la capacidad máxima del sistema de transferencia de electrones (ETS) mitocondrial (**Figura 23B**). El tratamiento con melatonina no sólo mejoró la capacidad máxima del ETS mitocondrial (**Figura 23B**), sino que también redujo totalmente la expresión de *HIF-1 α* (**Figura 23A**).

El envejecimiento produjo una reducción significativa en la actividad de los cuatro complejos de la cadena de transporte electrónico, así como en la actividad de los complejos I + III y II + III. La sepsis produjo una reducción mayor de estas actividades, mientras que el tratamiento con melatonina contrarrestó totalmente los efectos de la sepsis (**Figura 23C-G**), y en el caso del complejo II y complejos II + III, también los efectos de la edad (**Figura 23D, G**).

4. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la capacidad antioxidante citosólica

Una vez evaluada la función mitocondrial, nos preguntamos si las alteraciones observadas en el funcionamiento de estas mitocondrias durante el envejecimiento y la sepsis, podría acompañarse de cambios en el estado redox celular. Para contestar a esta pregunta se analizó la expresión y actividad de los principales enzimas antioxidantes a nivel del citosol. El envejecimiento y la sepsis no produjeron ningún efecto sobre la expresión y actividad de la SOD1 (**Figura 24A**). La expresión de la *GPx* tampoco se vio afectada por el envejecimiento y la sepsis, pero sí que se observó una reducción significativa en su actividad con la edad, siendo esta reducción mucho mayor durante la sepsis (**Figura 24B**). Los ratones controles de edad avanzada mostraron un incremento en la expresión de la *GRd*, sin que su actividad se viera modificada. La sepsis, en cambio, produjo una fuerte caída tanto en la expresión, como en la actividad de la *GRd* (**Figura 24C**). Por otro lado, envejecimiento y sepsis no produjeron ninguna modificación en la expresión y actividad de la catalasa (CAT) (**Figura 24D**). Estos resultados, junto con la menor expresión de la *gamma-glutamylcisteína sintetasa* (γ GCS) y la *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa* (G6PDH) (**Figura 24E, F**), sugieren que durante el

envejecimiento y la sepsis, se dan profundas alteraciones en la síntesis y reciclaje del glutatión (GSH). Por su parte, el tratamiento con melatonina modificó significativamente la expresión y actividad de los enzimas antioxidantes, incrementando los niveles de mRNA y la actividad de la GRd y de la catalasa (**Figura 24C, D**), así como también las actividades de la SOD1 y GPx (**Figura 24A-D**). Además, la administración de melatonina aumentó la expresión de la γ GCS, pero no la de la *G6PDH* (**Figura 24E, F**).

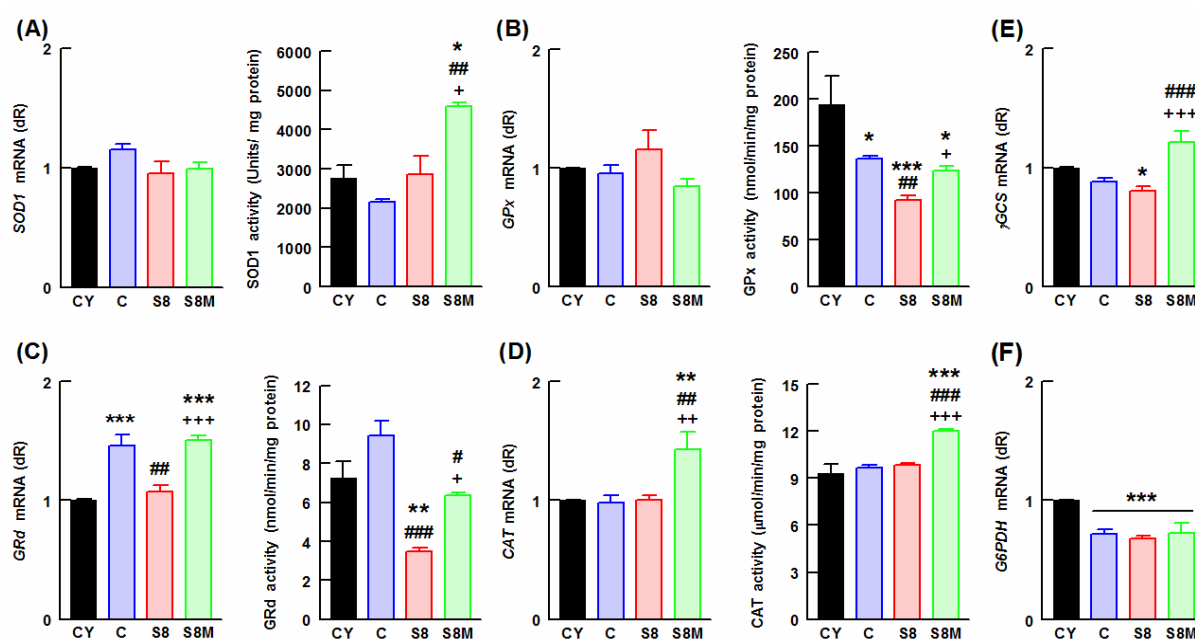


Figura 24. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la capacidad antioxidante citosólica. Los cambios en el sistema antioxidante citosólico se determinaron mediante el análisis de la expresión génica (RT-PCR) y actividad enzimática de la SOD1 (A), GPx (B), GRd (C), y CAT (D). También se determinaron los niveles de mRNA de la γ GCS (E) y la *G6PDH* (F). Los experimentos se llevaron a cabo en corazones de ratones macho de 3 (CY) y 18 meses de edad, controles (C), con sepsis (S8) y con sepsis tratados con melatonina (S8M). Los datos se expresaron como la media \pm el error estándar (SEM), con n = 6 animales por grupo experimental. dR, cuantificación relativa. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs CY; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs C; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$ vs S8.

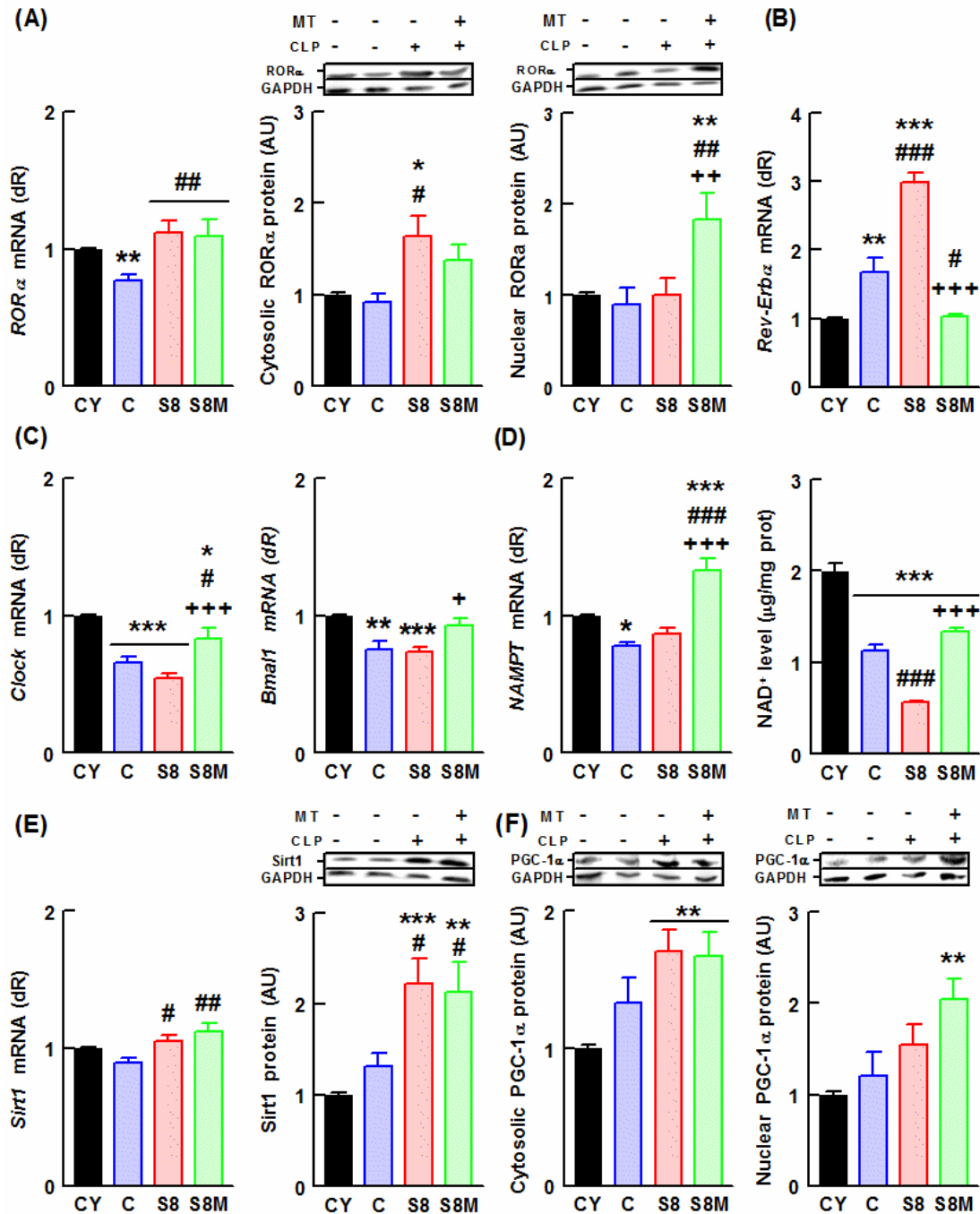


Figura 25. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la conexión genes reloj/ROR α /SIRT1. Niveles de mRNA (RT-PCR), y contenido proteico citosólico y nuclear (western blot) de ROR α (A). Análisis de los niveles de expresión de *Rev-Erba* (B), *Clock* y *Bmal1* (C). Análisis de la expresión génica de la *NAMPT* y niveles de NAD⁺ (D). Niveles de mRNA y contenido proteico nuclear de SIRT1 (E). Contenido proteico citosólico y nuclear de PGC-1 α (F). Los experimentos se llevaron a cabo en corazones de ratones macho de 3 (CY) y 18 meses de edad, controles (C), con sepsis (S8) y con sepsis tratados con melatonina (S8M). Los datos se expresaron como la media \pm el error estándar (SEM), con n= 7 animales por grupo experimental. AU, unidades arbitrarias; dR, cuantificación relativa. *P < 0.05, **P < 0.01 y ***P < 0.001 vs CY; #P < 0.05, ##P < 0.01 y ###P < 0.001 vs C; +P < 0.05, ++P < 0.01, +++P < 0.01 vs S8.

5. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la conexión genes reloj/ROR α / SIRT1.

En un estudio previo hemos observado que la melatonina inhibe la actividad transcripcional de NF- κ B, una vez se encuentra activo en el núcleo, a través de un mecanismo que implica la participación de las proteínas reloj, Bmal1 y Clock, de SIRT1, una deacetilasa dependiente de NAD⁺, y del receptor nuclear ROR α (García y cols., 2015). Nuestros resultados mostraron una reducción en la expresión de ROR α con la edad, sin afectar a su contenido citosólico y nuclear. La sepsis, en cambio, elevó la expresión y niveles citosólicos de este receptor nuclear, sin modificar su contenido en el núcleo (**Figura 25A**). Estos cambios tuvieron lugar de forma paralela a un aumento en la expresión del correpressor *Rev-Erba*, lo que supuso una inhibición de la actividad transcripcional dependiente de ROR α durante el envejecimiento y la sepsis, al observarse una reducción significativa en la expresión de sus genes diana *Clock* y *Bmal1* (**Figura 25B, C**). Asimismo, durante el envejecimiento se redujeron significativamente los niveles de mRNA de la *nicotinamida fosforribosiltransferasa* (NAMPT), el enzima limitante en la biosíntesis de NAD⁺, mientras que la sepsis no modificó la expresión de este enzima, a pesar del elevado consumo de NAD⁺ observado (**Figura 25D**). En contraste, la expresión y niveles nucleares de SIRT1 aumentaron significativamente durante la sepsis (**Figura 25E**). El tratamiento con melatonina previno todos estos cambios producidos sobre la vía dependiente de ROR α , incrementando su translocación al núcleo, sin modificar sus niveles de expresión (**Figura 25A**). La melatonina redujo de forma paralela la expresión de *Rev-Erba* hasta valores mostrados por los ratones jóvenes y, en consecuencia, elevó de forma significativa los niveles de mRNA de *Clock* y *Bmal1* (**Figura 25C**). Asimismo, la melatonina aumentó la expresión de la NAMPT, que se encuentra bajo el control de Bmal1, de forma paralela al aumento de NAD⁺ (**Figura 25D**), el sustrato para la actividad deacetilasa de SIRT1. Por otra parte, la administración de

melatonina indujo la translocación nuclear de PGC-1 α (**Figura 25F**), promoviendo su activación a través de SIRT1 y el consiguiente aumento en la actividad transcripcional de ROR α (Liu y cols., 2007; Jetten, 2009; Chang y Guarente, 2013). Estos datos sugieren que la conexión entre la melatonina y la vía de señalización de los genes reloj/ROR α /SIRT1 es fundamental para entender los efectos anti-inflamatorios de esta indolamina sobre la vía de NF- κ B durante el envejecimiento y la sepsis.

6. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la vía apoptótica mitocondrial.

Aparte de todas las alteraciones observadas durante el proceso inflamatorio asociado al envejecimiento y la sepsis, y como consecuencia de la disfunción mitocondrial, puede abrirse el poro de transición de membrana mitocondrial (MPT), desencadenando el proceso apoptótico tras la liberación del citocromo c. En este sentido, durante la sepsis, observamos un aumento en la expresión y translocación nuclear de p53 (**Figura 26A, B**). Asimismo, el incremento en los niveles de mRNA y contenido proteico de Bax, y la reducción en ambos niveles de Bcl2, dieron lugar a una elevación significativa del cociente Bax/Bcl2 durante el envejecimiento, siendo este aumento mucho mayor en la sepsis (**Figura 26A, D; Figura 27**). Estas alteraciones favorecieron la apertura del poro MPT, liberándose citocromo c al citoplasma (**Figura 26A, C**), y activando a la caspasa-3 (**Figura 26A, E**). El tratamiento con melatonina redujo de manera significativa la expresión y contenido nuclear de p53 (**Figura 26A, B**), contrarrestando los efectos de la sepsis. Asimismo, la administración de esta indolamina incrementó de forma significativa los niveles de expresión y contenido proteico de Bcl2, a la vez que redujo los de Bax, disminuyendo significativamente el cociente Bax/Bcl2 hasta valores, en el caso de los niveles de mRNA, incluso por debajo de los mostrados por los ratones controles jóvenes (**Figura 26A, D; Figura 27**). Este efecto de la

melatonina produjo una reducción significativa en la liberación de citocromo c (Figura 26A, C), así como de la expresión y activación de la caspasa-3 (Figura 26A, E).

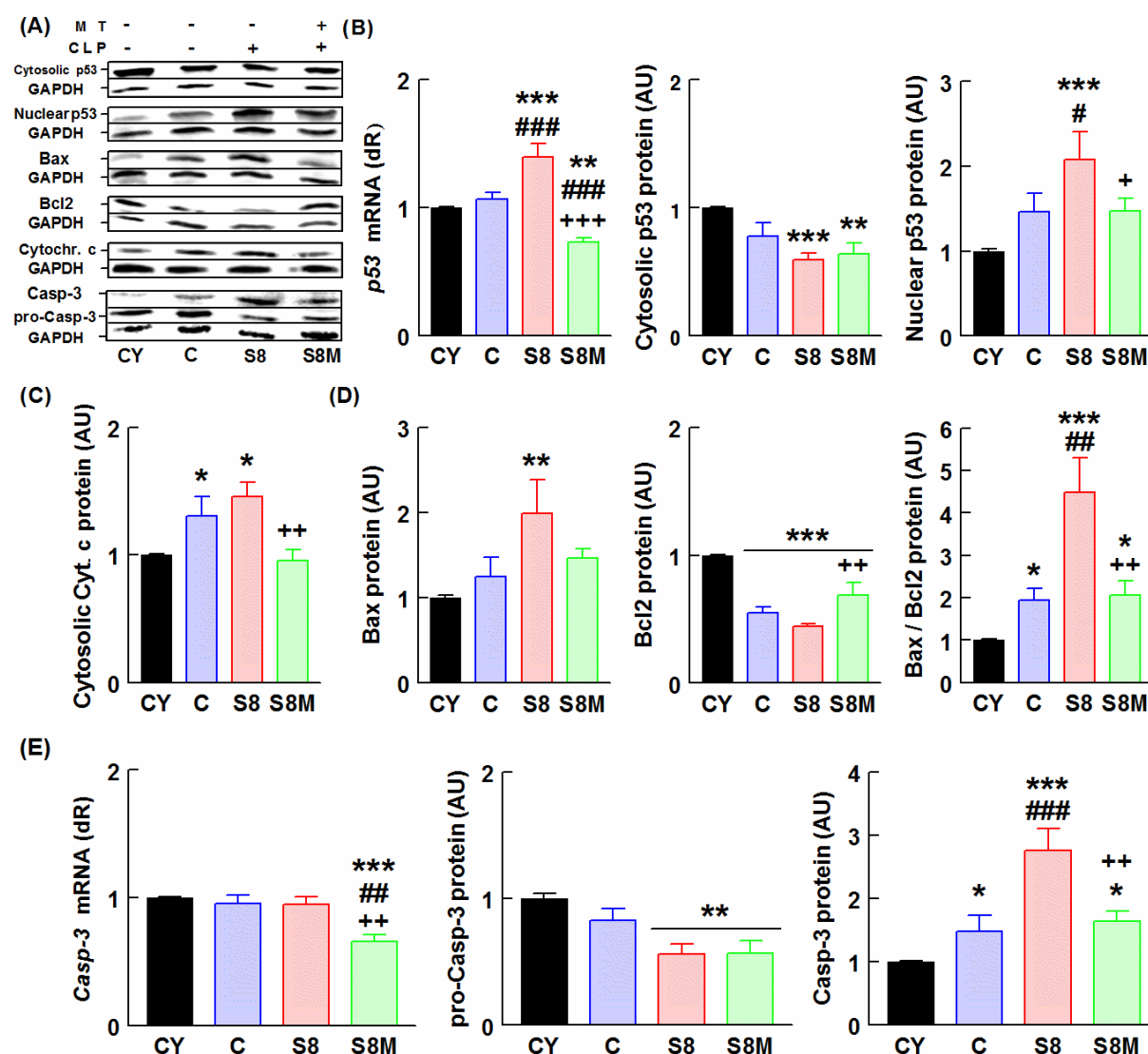


Figura 26. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la vía apoptótica mitocondrial. Western blot representativo de p53, Bax, Bcl2, citocromo c, pro-caspasa-3 y caspasa-3 activa (A). Niveles de mRNA (RT-PCR), y contenido proteico citosólico y nuclear (western blot) de p53 (B). Contenido proteico citosólico de citocromo c (C), Bax, Bcl2 y el cociente Bax/Bcl2 (D). Análisis de la expresión génica y contenido citosólico proteico de pro-caspasa-3 y caspasa-3 activa (E). Los experimentos se llevaron a cabo en corazones de ratones macho de 3 (CY) y 18 meses de edad, controles (C), con sepsis (S8) y con sepsis tratados con melatonina (S8M). Los datos se expresaron como la media \pm el error estándar (SEM), con $n=6$ animales por grupo experimental. AU, unidades arbitrarias; dR, cuantificación relativa. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs CY; ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs C; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$ vs S8.

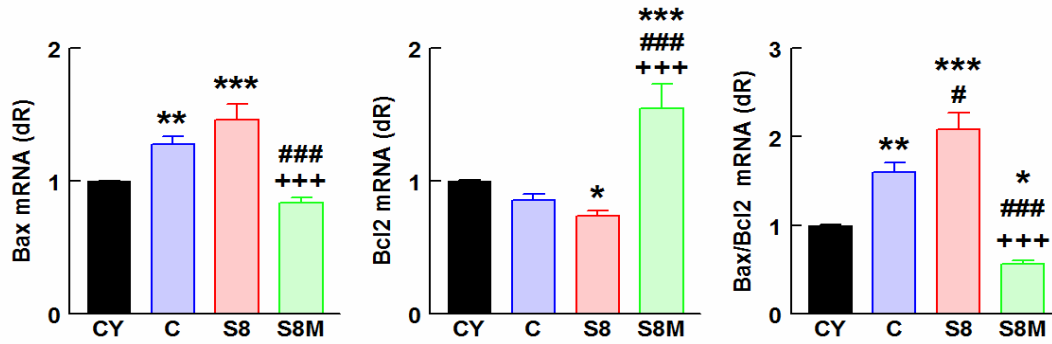


Figura 27. Efectos del envejecimiento, la sepsis y el tratamiento con melatonina sobre la expresión de *Bax*, *Bcl2* y *Bax/Bcl2*. Análisis de los niveles de mRNA (RT-PCR) de *Bax*, *Bcl2* y *Bax/Bcl2*. Los experimentos se llevaron a cabo en corazones de ratones macho de 3 (CY) y 18 meses de edad, controles (C), con sepsis (S8) y con sepsis tratados con melatonina (S8M). Los datos se expresaron como la media \pm el error estándar (SEM), con $n=6$ animales por grupo experimental. dR, cuantificación relativa. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs CY; ### $P < 0.001$ vs C; +++ $P < 0.01$ vs S8.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio revelan tres importantes hallazgos: En primer lugar, se demuestra que el envejecimiento y la sepsis desencadenan la misma respuesta inmune innata y similar deterioro mitocondrial, aunque con diferente magnitud. En segundo lugar, demostramos que la activación de la respuesta inmune innata dependiente de NF- κ B no es suficiente para explicar el proceso inflamatorio que subyace al envejecimiento, ya que también se desencadena, de forma paralela, una respuesta complementaria representada por la activación del inflamasoma NLRP3. Así, la activación conjunta de las vías de señalización dependientes de NF- κ B y NLRP3, que proponemos como la base molecular del *inflammaging*, se encuentran mucho más amplificadas durante la sepsis, produciendo una respuesta inflamatoria desproporcionada en el corazón de los ratones envejecidos. De este modo, el estado inflamatorio de bajo grado asociado al envejecimiento contribuye a que las personas de edad avanzada sean más susceptibles a la sepsis (Saito y cols., 2003; Opal y cols., 2005; Kale y Yende, 2011). En tercer lugar, gracias a estudio previos realizados en nuestro grupo de investigación, se ha demostrado que el tratamiento crónico con melatonina previene el estrés oxidativo y deterioro mitocondrial asociado con la edad, en múltiples órganos de ratón, incluyendo el corazón (Rodríguez y cols., 2007a; Rodríguez y cols., 2007b; Carretero y cols., 2009; Acuña-Castroviejo y cols., 2012). Aquí, sin embargo, se muestra que la administración aguda de melatonina en los ratones envejecidos no contrarresta el estado pro-inflamatorio crónico característico del *inflammaging* pero sí bloquea la respuesta a la sepsis, reduciendo el proceso inflamatorio, el estrés oxidativo, y mejorando la función mitocondrial hasta los niveles de los ratones viejos sin sepsis. Estos resultados evidencian una importante dualidad en los efectos de la melatonina; por un lado, dosis bajas administradas de forma crónica previenen el estado inflamatorio de bajo grado asociado a la edad, y por otro, dosis altas administradas de forma aguda contrarrestan el proceso inflamatorio asociado a la sepsis, sin afectar al estado inflamatorio basal de los ratones envejecidos.

Tanto el envejecimiento como la sepsis, comparten una serie de eventos moleculares similares, pero cuantitativamente diferentes. El *inflammaging*, esa inflamación subclínica que acompaña al envejecimiento, se relacionó en un principio con la lenta activación de la inmunidad innata (Franceschi y cols., 2000), dependiente de la vía de NF- κ B. Por otro parte, en un estudio reciente, hemos demostrado que NF- κ B actúa a modo de vínculo entre la cronodisrupción y la activación del inflammasoma NLRP3, explicando los efectos deletéreos de la sepsis en corazones de ratones jóvenes (García y cols., 2015). Por esta razón, planteamos la hipótesis de que la conexión entre los genes reloj, NF- κ B y NLRP3 participa en el desarrollo del *inflammaging*, al tiempo que la sepsis produce una sobreestimulación de este sistema, lo que explicaría la mayor susceptibilidad de los pacientes con edades avanzadas a esta patología. Por otra parte, sabemos que la administración de dosis adecuadas de melatonina restaura la actividad basal de la inmunidad innata, ya sea en modelos de ratón con senescencia acelerada o ratones jóvenes sépticos (Escames y cols., 2007; Rodríguez y cols., 2007a; Rodríguez y cols., 2007c; Ortiz y cols., 2014; García y cols., 2015), si bien se desconocen en detalle los mecanismos moleculares que median los efectos terapéuticos de la melatonina en ratones de edad avanzada con sepsis. En este trabajo hemos intentado responder a estas preguntas analizando el corazón de ratones controles envejecidos y con sepsis tratados con melatonina, evaluando sus posibles dianas moleculares.

Se sabe que la expresión de las proteínas reloj, Clock y Bmal1, se encuentra bajo el control transcripcional de ROR α y Rev-Erba (Ueda y cols., 2005), constituyendo un bucle que regula en última instancia la inmunidad innata a través de SIRT1 (Kong y cols., 2012). Por esta razón, hemos evaluado si las alteraciones que tienen lugar en la expresión de los genes reloj durante el envejecimiento (Kondratov y cols., 2006; Dubrovsky y cols., 2010), se asociaron con una mayor respuesta inflamatoria. La expresión de Bmal1 está regulada negativamente por Rev-Erba (Preitner y cols., 2002) y positivamente por ROR α ,

contralándose así la formación del complejo Clock/Bmal1 (Sato y cols., 2004). Este complejo tiene la capacidad de modificar la expresión génica de la *NAMPT* y la síntesis de NAD^+ y, en última instancia, la actividad deacetilasa de SIRT1 que es dependiente de los niveles de NAD^+ . A su vez, SIRT1 interactúa con el complejo Clock/Bmal1, regulando así su actividad transcripcional y cerrando el circuito circadiano que regula la propia actividad de esta deacetilasa (Nakahata y cols., 2008). Nuestros resultados muestran que, durante el envejecimiento, se da una disminución en la expresión de la *NAMPT* y los niveles intracelulares de NAD^+ , que se correlacionan con la reducción en la expresión génica de *Clock* y *Bmal1*. Así, la disrupción en la expresión de los genes reloj provoca la disociación SIRT1/ NAD^+ , lo que impide la inhibición de la subunidad p65 a través de la actividad deacetilasa de SIRT1 (Yeung y cols., 2004), resultando en una mayor actividad transcripcional de NF- κ B en los ratones de edad avanzada. Estos resultados refuerzan el papel limitante del NAD^+ en la actividad deacetilasa de SIRT1 (Donmez y Guarente, 2010). El consiguiente aumento en la unión de NF- κ B a su promotor, promueve la expresión de múltiples moléculas pro-inflamatorias, tales como TNF α , iNOS y pro-IL-1 β , que están implicados en la patogénesis de la mayoría de enfermedades relacionadas con el envejecimiento (De y cols., 2006), y proporcionan a su vez, una mayor amplificación de la vía de señalización dependiente de NF- κ B.

NF- κ B también indujo la expresión de NLRP3 (Bauernfeind y cols., 2009), el cual requiere de señales adicionales para poder activarse y catalizar la escisión proteolítica, dependiente de caspasa-1, de pro-IL-1 β a IL-1 β madura (Escames y cols., 2012; Latz, 2010). Así, la respuesta inflamatoria iniciada por NF- κ B, característica del proceso de envejecimiento, se amplifica con la activación del inflamasoma NLRP3. Debido a que no se detectaron cambios en la expresión y contenido de la proteína adaptadora ASC, buscamos otras señales que estuvieran implicadas en la activación del inflamasoma NLRP3. Dadas las

múltiples evidencias que sugieren que las ROS de origen mitocondrial desencadenan la activación de este complejo multiproteico (Tschopp, 2011; Zhou y colbs., 2011), pudiendo explicar así la condición de *inflammaging* (Cannizzo y colbs., 2011), se decidió evaluar la función mitocondrial. Nuestros resultados mostraron una reducción, dependiente de la edad, en la actividad de los complejos respiratorios, que se correlaciona con la fuerte caída en la capacidad máxima del sistema de transferencia de electrones (ETS) mitocondrial. Estos datos reflejan la relación entre la disfunción mitocondrial y el agotamiento energético, que son las principales causas de la producción de ROS en animales envejecidos (Chan, 2006; Acuña-Castroviejo y colbs., 2011; Basha y Poojary, 2014). En este sentido, los ratones de edad avanzada presentaron una reducción en la capacidad antioxidante para eliminar el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno. Asimismo, la reducción en la expresión de la *G6PDH* durante el envejecimiento limita el contenido de NADPH requerido para el reciclaje del GSH. En conjunto, nuestros datos sugieren una eliminación ineficaz de las ROS en los ratones envejecidos, que podría explicar la activación del inflammasoma NLRP3. Además, el aumento en los niveles citosólicos de citocromo c y caspasa-3 activa, confirman la existencia de un proceso apoptótico activo en los ratones envejecidos. Aparte, también detectamos un aumento de la translocación nuclear de p53, que se acumula en las células en respuesta al daño en el DNA (Green y Kroemer, 2009), acompañado por un aumento del cociente Bax/Bcl2. La translocación nuclear de p53 en respuesta a ROS está regulada negativamente por la actividad deacetilasa de SIRT1 dependiente de NAD⁺ (Han y colbs., 2008). Así, el aumento en los niveles nucleares de p53 y la activación de Bax, correlaciona perfectamente con la disociación SIRT1/NAD⁺ que encontramos en los ratones de edad avanzada (Green y Kroemer, 2009).

Si el estado pro-inflamatorio encontrado en los ratones envejecidos se asocia a la disrupción en la expresión de los genes reloj (Kondratov y colbs., 2006; Dubrovsky y colbs.,

2010), el proceso séptico, en principio, debería potenciar más esta cronodisrupción, agravando la respuesta inflamatoria. Nuestros hallazgos confirman totalmente esta hipótesis; con un aumento en la expresión de *ROR α* , pero sin modificar su contenido nuclear, la sepsis indujo un fuerte aumento de los niveles de mRNA de *Rev-Erba*, que a su vez reprimió la expresión de *Clock* y *Bmal1*. En estas condiciones, los niveles de NAD⁺ se redujeron mucho más que en los ratones envejecidos sin sepsis, lo que impide todavía más la deacetilación de NF- κ B por parte de SIRT1. Por ello, durante la sepsis, encontramos una mayor activación de NF- κ B en los ratones envejecidos comparado con lo observado en ratones jóvenes sépticos (García y colbs., 2015). Tras la activación de NF- κ B, su unión al DNA estimuló la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y de NLRP3. A raíz de los mecanismos descritos con anterioridad, la sobreactivación del inflamasoma NLRP3 durante la sepsis produjo una mayor activación de caspasa-1 y, por tanto, mayores niveles de IL-1 β madura, que fueron significativamente más altos que los encontrados en animales jóvenes sépticos (García y colbs., 2015). Por tanto, la activación conjunta de NF- κ B y el inflamasoma NLRP3 con la edad, que subyace al proceso de *inflammaging*, se amplifica de manera desproporcionada durante la sepsis.

Aparte de la estimulación de la vía dependiente de NF- κ B, la mayor activación del inflamasoma NLRP3 durante la sepsis en los ratones de edad avanzada, debería reflejarse también en un aumento de las señales que desencadenan esta activación. En nuestro estudio vemos que la sepsis redujo mucho más los niveles de NAD⁺, debido posiblemente a mecanismos moleculares relacionados con la acumulación de HIF-1 α , y a su mayor consumo mediado por TNF α , alterándose la función mitocondrial y la consiguiente producción de ATP (Yoshino y colbs., 2011; Gomes y colbs., 2013). Por otra parte, la mayor reducción en la actividad de la GPx, GRd y expresión de la γ GCS sugiere un mayor deterioro del ciclo del GSH y, por tanto, una eliminación de ROS más deficiente, que estimulara la sobreactivación

del inflammasoma NLRP3 en los ratones de edad avanzada con sepsis comparado con los no sépticos. El proceso apoptótico se encuentra también aumentado durante la sepsis, donde la translocación nuclear de p53 y los niveles de caspasa-3 activa se encuentran significativamente por encima de los valores hallados en los animales de edad avanzada sin sepsis. Además, el aumento dos veces mayor de la expresión de *TNF α* en los ratones sépticos, podría aumentar la relación Bax/Bcl2, promoviendo el poro mitocondrial y la apoptosis (Kim y colbs., 2002a). Estos resultados muestran múltiples eventos que convergen en una mayor activación de la vía apoptótica intrínseca y que pueden contribuir a la alta tasa de mortalidad que se da durante la sepsis en pacientes con edades avanzadas (De Gaudio y colbs., 2009).

En base a los resultados expuestos a lo largo de esta tesis doctoral y a la eficacia demostrada del tratamiento agudo de melatonina contra los efectos de la sepsis en ratones jóvenes (García y colbs., 2015), hemos evaluado los efectos de esta indolamina en los ratones envejecidos con sepsis. Se sabe que la melatonina puede unirse al receptor ROR α , estimulando su actividad transcripcional (Becker-Andre y colbs., 1994; Wiesenberg y colbs., 1995; Carlberg y Wiesenberg, 1995; Wiesenberg y colbs., 1998), y favoreciendo la formación del complejo Clock/Bmal1 (Sato y colbs., 2004; Vriend y Reiter, 2015). Gracias a sus efectos antioxidantes, esta indolamina es capaz de preservar los niveles de NAD⁺ en situaciones de fuerte estrés oxidativo (Tan y colbs., 2005), de regular indirectamente la expresión y actividad de SIRT1 y, por tanto, la actividad de sus dianas moleculares, tal y como ocurre con NF- κ B y p53 (Tajes y colbs., 2009; Yang y colbs., 2015). Nuestros resultados demuestran que la administración de melatonina contrarresta totalmente la disrupción del bucle Clock/Bmal1/SIRT1/NF- κ B que se produce durante la sepsis en los ratones de edad avanzada, permitiendo la deacetilación y, por tanto, inactivación de NF- κ B por parte de SIRT1, lo que resulta en una pérdida de actividad transcripcional de la subunidad p65. El

tratamiento con melatonina contrarrestó también la activación del inflamasoma NLRP3, lo que redujo significativamente la actividad de la caspasa-1 y los niveles de IL-1 β madura. Estos efectos de la melatonina, sobre la activación del inflamasoma NLRP3, están relacionados probablemente con la reducción del estado hiperoxidativo durante la sepsis, a través de la estimulación de la expresión y actividad de los enzimas antioxidantes, y al restablecimiento de la homeostasis en el ciclo del GSH. Asimismo, la melatonina mejoró la función mitocondrial, frenando la vía apoptótica intrínseca. En conjunto, la administración de melatonina fue suficiente para contrarrestar totalmente los cambios inducidos por el proceso séptico, pero no los relacionados con el envejecimiento.

Muchos de los efectos de la melatonina, observados a lo largo de este estudio, se pueden explicar gracias al trabajo de García y colaboradores (García y cols., 2015), en el que demostramos que la administración aguda de esta indolamina durante la sepsis induce la actividad deacetilasa de SIRT1, inhibiendo la respuesta inmune dependiente de NF- κ B, a través de un mecanismo que requiere del receptor nuclear ROR α . En ausencia de este receptor, la melatonina es incapaz de aumentar la expresión de los genes reloj, *Clock* y *Bmal1*, ni tampoco los niveles de NAD⁺, imposibilitando la deacetilación e inactivación de NF- κ B por parte de SIRT1. Sin embargo, sí que previene la activación del inflamasoma NLRP3 con la consiguiente reducción de los niveles de IL-1 β madura (García y cols., 2015). En conjunto, esos resultados demuestran, por un lado, que la melatonina necesita de ROR α para inducir la actividad deacetilasa de SIRT1 e inhibir por tanto la unión de NF- κ B al DNA, y la consiguiente expresión de mediadores pro-inflamatorios. Y por otro lado, que la melatonina es capaz de inhibir la activación del inflamasoma NLRP3 asociada a la disfunción mitocondrial a través de mecanismos independientes del receptor nuclear ROR α (**Figura 28**).

Tomados en conjunto, nuestros datos ayudan a comprender mejor los mecanismos que subyacen al proceso de *inflammaging*, confirmando que la edad produce, en primer lugar,

una disrupción del bucle Clock/Bmal1/SIRT1/NF- κ B, una activación secundaria de la respuesta inmune dependiente de NF- κ B, con el consiguiente deterioro mitocondrial y estrés oxidativo asociado, que finalmente termina con la activación del inflamasoma NLRP3, la amplificación de la respuesta inflamatoria y, en última instancia, la activación de los procesos apoptóticos y la pérdida de la capacidad funcional de la célula. A la vista de estos resultados, proponemos el término *chronoinflammaging*, como el proceso asociado al envejecimiento responsable del estado inflamatorio subclínico observado en los ratones de edad avanzada. Además, el hecho de que las vías de señalización dependientes de NF- κ B y NLRP3 se encuentren activas en el corazón de los ratones envejecidos, implica que cualquier señal que pueda desencadenar una respuesta de la inmunidad innata, como ocurre durante la sepsis, podrá agravar esta respuesta mucho más fácilmente que en órganos más jóvenes. La otra conclusión importante de este estudio, es la aparente dualidad que presenta el tratamiento con melatonina. Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que el tratamiento crónico con esta indolamina previene absolutamente la activación de la respuesta inflamatoria, el deterioro mitocondrial asociados a la edad, y la formación de ROS (Rodríguez y colbs., 2007a; Rodríguez y colbs., 2007b; Rodríguez y colbs., 2007c; Carretero y colbs., 2009; Acuña-Castroviejo y colbs., 2012). Sin embargo, en el presente estudio encontramos que el tratamiento con melatonina contrarresta la respuesta inmune a la sepsis, pero no a la edad. La explicación se encuentra en la dosis y pauta de administración de melatonina, lo que resulta de enorme importancia para entender la dualidad de sus efectos. Cuando, como en el presente estudio, utilizamos dosis altas de melatonina administradas de forma aguda, éstas resultaron suficientes para contrarrestar los efectos de la sepsis, al igual que ocurrió en estudios con ratones jóvenes (Escames y colbs., 2007; Ortiz y colbs., 2014; García y colbs., 2015). En cambio, en los modelos de envejecimiento se utilizaron dosis bajas administradas de forma crónica que previnieron el daño asociado a la edad, pero no son suficientes para contrarrestar la respuesta inflamatoria de la sepsis. En base a todos estos

CONCLUSIONS

According to the results obtained in this Doctoral Thesis, we can conclude:

1. The parallel activation of the NF- κ B and NLRP3 inflammasome innate immune pathways underlies during the inflammatory process associated with aging.
2. The clock genes disruption that accompanies aging is associated with the enhanced inflammatory response due to the disruption of the Clock/Bmal1/SIRT1/NF- κ B loop and the subsequent increase in the p65 transcriptional activity.
3. The age-dependent NF- κ B/NLRP3 activation, coupled with the mitochondrial impairment and oxidative stress, the latter to inflammasome NLRP3 activation, amplify the inflammatory response, triggers apoptosis and a loss of cellular functional capacity.
4. Sepsis further increases the alterations observed during inflammaging, yielding a disproportionate inflammatory response represented by the NF- κ B/NLRP3 overactivation and enhanced mitochondrial damage. Thus, the low-grade proinflammatory status associated with aging contributes to the elevated susceptibility and mortality of sepsis in aged population.
5. Melatonin administration counteracts the activation of both NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathways during sepsis, promoting SIRT1-dependent p65 deacetylation, preserving mitochondrial function and restoring the cellular redox state.

6. Melatonin required nuclear receptor ROR α to induce SIRT1 deacetylase activity and subsequent inhibition of the NF- κ B transcriptional activity. However, melatonin inhibits NLRP3 inflammasome activation by ROR α -independent mechanism.
7. Melatonin should be administered in a chronic schedule in order to prevent the low-grade inflammatory state associated with aging, and in acute schedule to counteract the severe inflammatory response that occurs during sepsis.
8. We propose the **chronoinflammaging** theory, as the process responsible for the inflammatory response and mitochondrial impairment observed during aging.

BIBLIOGRAFÍA

Acuña-Castroviejo, D., Carretero, M., Doerrier, C., Lopez, L.C., Garcia-Corzo, L., Tresguerres, J.A. y Escames, G. 2012. Melatonin protects lung mitochondria from aging. *Age (Dordr.)* 34:681-692.

Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Leon, J., Carazo, A. y Khaldy, H. 2003. Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv. Exp. Med. Biol.* 527:549-557.

Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Rodriguez, M.I. y Lopez, L.C. 2007. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci.* 12:947-963.

Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Diaz-Casado, M.E., Lima-Cabello, E., Lopez, L.C., Rosales-Corral, S., Tan, D.X. y Reiter, R.J. 2014. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol. Life Sci.* 71:2997-3025.

Acuña-Castroviejo, D., Lopez, L.C., Escames, G., Lopez, A., Garcia, J.A. y Reiter, R.J. 2011. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 11:221-240.

Acuña-Castroviejo, D., Martin, M., Macias, M., Escames, G., Leon, J., Khaldy, H. y Reiter, R.J. 2001. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J. Pineal Res.* 30:65-74.

Acuña-Castroviejo, D., Pablos, M.I., Menendez-Pelaez, A. y Reiter, R.J. 1993. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 82:253-256.

Acuña-Castroviejo, D., Reiter, R.J., Menendez-Pelaez, A., Pablos, M.I. y Burgos, A. 1994. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J. Pineal Res.* 16:100-112.

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-126.

Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M.F., Hawkins, P.N. y Tschopp, J. 2004. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity.* 20:319-325.

Akashi, M., and Takumi, T. 2005. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:441-448.

Albrecht, U. 2002. Invited review: regulation of mammalian circadian clock genes. *J. Appl. Physiol (1985.)* 92:1348-1355.

Alkalay, I., Yaron, A., Hatzubai, A., Orian, A., Ciechanover, A. y Ben-Neriah, Y. 1995. Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:10599-10603.

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

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

Angus, D.C., Linde-Zwirble, W.T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J. y Pinsky, M.R. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 29:1303-1310.

Antolin, I., Mayo, J.C., Sainz, R.M., del Brio, M.L., Herrera, F., Martin, V. y Rodriguez, C. 2002. Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 943:163-173.

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

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

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

Asher, G., Gatfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C., Kreppel, F., Mostoslavsky, R., Alt, F.W. y Schibler, U. 2008. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell* 134:317-328.

Asher, G., and Schibler, U. 2006. A CLOCK-less clock. *Trends Cell Biol.* 16:547-549.

Balaban, R.S., Nemoto, S. y Finkel, T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-495.

Barja, G. 2014. The mitochondrial free radical theory of aging. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 127:1-27.

Barton, G.M. 2008. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J. Clin. Invest* 118:413-420.

Basha, P.M., and Poojary, A. 2014. Mitochondrial dysfunction in aging rat brain regions upon chlorpyrifos toxicity and cold stress: an interactive study. *Cell Mol. Neurobiol.* 34:737-756.

Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., Hornung, V. y Latz, E. 2009. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.* 183:787-791.

Baylis, D., Bartlett, D.B., Patel, H.P. y Roberts, H.C. 2013. Understanding how we age: insights into inflammaging. *Longev. Healthspan.* 2:8.

Becker-Andre, M., Andre, E. y DeLamarter, J.F. 1993. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194:1371-1379.

Becker-Andre, M., Wiesenberg, I., Schaeren-Wiemers, N., Andre, E., Missbach, M., Saurat, J.H. y Carlberg, C. 1994. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 269:28531-28534.

Belden, W.J., and Dunlap, J.C. 2013. Aging well with a little wine and a good clock. *Cell* 153:1421-1422.

Benitez-King, G. 2006. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res.* 40:1-9.

Benitez-King, G., and Anton-Tay, F. 1993. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 49:635-641.

Benitez-King, G., Rios, A., Martinez, A. y Anton-Tay, F. 1996. In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim. Biophys. Acta* 1290:191-196.

Betts, J.C., and Nabel, G.J. 1996. Differential regulation of NF-kappaB2(p100) processing and control by amino-terminal sequences. *Mol. Cell Biol.* 16:6363-6371.

Birch-Machin, M.A., Briggs, H.L., Saborido, A.A., Bindoff, L.A. y Turnbull, D.M. 1994. An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria. *Biochem. Med. Metab Biol.* 51:35-42.

Bohrer, H., Qiu, F., Zimmermann, T., Zhang, Y., Jllmer, T., Mannel, D., Bottiger, B.W., Stern, D.M., Waldherr, R., Saeger, H.D., Ziegler, R., Bierhaus, A., Martin, E. y Nawroth, P.P. 1997. Role of NFkappaB in the mortality of sepsis. *J. Clin. Invest* 100:972-985.

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

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Braidy, N., Guillemin, G.J., Mansour, H., Chan-Ling, T., Poljak, A. y Grant, R. 2011. Age related changes in NAD⁺ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *PLoS. One.* 6:e19194.

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

Bubenik, G.A., and Konturek, S.J. 2011. Melatonin and aging: prospects for human treatment. *J. Physiol Pharmacol.* 62:13-19.

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

Cannizzo, E.S., Clement, C.C., Sahu, R., Follo, C. y Santambrogio, L. 2011. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. *J. Proteomics.* 74:2313-2323.

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

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

Carlberg, C., and Wiesenberg, I. 1995. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J. Pineal Res.* 18:171-178.

Carretero, M., Escames, G., Lopez, L.C., Venegas, C., Dayoub, J.C., Garcia, L. y Acuna-Castroviejo, D. 2009. Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging. *J. Pineal Res.* 47:192-200.

Chan, D.C. 2006. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125:1241-1252.

Chang, H.C., and Guarente, L. 2013. SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging. *Cell* 153:1448-1460.

Chen, L., Fischle, W., Verdin, E. y Greene, W.C. 2001. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science* 293:1653-1657.

Chiao, P.J., Miyamoto, S. y Verma, I.M. 1994. Autoregulation of I kappa B alpha activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:28-32.

Chung, H.Y., Kim, H.J., Kim, J.W. y Yu, B.P. 2001. The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 928:327-335.

Chung, H.Y., Kim, H.J., Kim, K.W., Choi, J.S. y Yu, B.P. 2002. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microsc. Res. Tech.* 59:264-272.

Crespo, E., Macias, M., Pozo, D., Escames, G., Martin, M., Vives, F., Guerrero, J.M. y Acuna-Castroviejo, D. 1999. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J.* 13:1537-1546.

Curtis, A.M., Bellet, M.M., Sassone-Corsi, P. y O'Neill, L.A. 2014. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity.* 40:178-186.

De Gaudio, A.R., Rinaldi, S., Chelazzi, C. y Borracchi, T. 2009. Pathophysiology of sepsis in the elderly: clinical impact and therapeutic considerations. *Curr. Drug Targets.* 10:60-70.

De la Fuente, M., and Miquel, J. 2009. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr. Pharm. Des* 15:3003-3026.

De, M.M., Franceschi, C., Monti, D. y Ginaldi, L. 2006. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. *Exp. Mol. Pathol.* 80:219-227.

Delerive, P., Monte, D., Dubois, G., Trottein, F., Fruchart-Najib, J., Mariani, J., Fruchart, J.C. y Staels, B. 2001. The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep.* 2:42-48.

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

Dombrovskiy, V.Y., Martin, A.A., Sunderram, J. y Paz, H.L. 2007. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med.* 35:1244-1250.

Donmez, G., and Guarente, L. 2010. Aging and disease: connections to sirtuins. *Aging Cell* 9:285-290.

Dubrovsky, Y.V., Samsa, W.E. y Kondratov, R.V. 2010. Deficiency of circadian protein CLOCK reduces lifespan and increases age-related cataract development in mice. *Aging (Albany, NY)* 2:936-944.

Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nunez, G., Schnurr, M., Espevik, T., Lien, E., Fitzgerald, K.A., Rock, K.L., Moore, K.J., Wright, S.D., Hornung, V. y Latz, E. 2010. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464:1357-1361.

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

El, M.R., El, G.M., Seeds, M.C., McCall, C.E., Dreskin, S.C. y Nicolls, M.R. 2007. Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol. Lett.* 111:36-44.

Escames, G., Acuna-Castroviejo, D., Lopez, L.C., Tan, D.X., Maldonado, M.D., Sanchez-Hidalgo, M., Leon, J. y Reiter, R.J. 2006a. Pharmacological utility of melatonin in the

treatment of septic shock: experimental and clinical evidence. *J. Pharm. Pharmacol.* 58:1153-1165.

Escames, G., León, J., Macías, M., Khaldy, H. y Acuña-Castroviejo, D. 2003. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J.* 17:932-934.

Escames, G., Lopez, L.C., Garcia, J.A., Garcia-Corzo, L., Ortiz, F. y Acuna-Castroviejo, D. 2012. Mitochondrial DNA and inflammatory diseases. *Hum. Genet.* 131:161-173.

Escames, G., López, L.C., Ortiz, F., López, A., García, J.A., Ros, E. y Acuña-Castroviejo, D. 2007. Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J.* 274:2135-2147.

Escames, G., Lopez, L.C., Ortiz, F., Ros, E. y Acuna-Castroviejo, D. 2006b. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp. Gerontol.* 41:1165-1173.

Escames, G., López, L.C., Tapias, V., Utrilla, P., Reiter, R.J., Hitos, A.B., León, J., Rodríguez, M.I. y Acuña-Castroviejo, D. 2006c. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J. Pineal Res.* 40:71-78.

Evans, R.M. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.

Fan, J., Ye, R.D. y Malik, A.B. 2001. Transcriptional mechanisms of acute lung injury. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 281:L1037-L1050.

Feldman, N., Rotter-Maskowitz, A. y Okun, E. 2015. DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Res. Rev.* 24:29-39.

Fleming, J.E., Miquel, J., Cottrell, S.F., Yengoyan, L.S. y Economos, A.C. 1982. Is cell aging caused by respiration-dependent injury to the mitochondrial genome? *Gerontology* 28:44-53.

Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De, L.M., Ottaviani, E. y De, B.G. 2000. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 908:244-254.

Franceschi, C., Valensin, S., Fagnoni, F., Barbi, C. y Bonafe, M. 1999. Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. *Exp. Gerontol.* 34:911-921.

Froy, O. 2011. Circadian rhythms, aging, and life span in mammals. *Physiology. (Bethesda.)* 26:225-235.

Galano, A., Tan, D.X. y Reiter, R.J. 2013. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J. Pineal Res.* 54:245-257.

García, J.A., Volt, H., Venegas, C., Doerrier, C., Escames, G., Lopez, L.C. y Acuna-Castroviejo, D. 2015. Disruption of the NF-kappaB/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor-alpha and blocks the septic response in mice. *FASEB J.* 29:3863-3875.

GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. 2015. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 385:117-171.

Giardina, C., and Hubbard, A.K. 2002. Growing old with nuclear factor-kappaB. *Cell Stress. Chaperones*. 7:207-212.

Giguere, V. 1999. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev*. 20:689-725.

Giguere, V., Beatty, B., Squire, J., Copeland, N.G. y Jenkins, N.A. 1995. The orphan nuclear receptor ROR alpha (RORA) maps to a conserved region of homology on human chromosome 15q21-q22 and mouse chromosome 9. *Genomics* 28:596-598.

Giguere, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R.M. y Otulakowski, G. 1994. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev*. 8:538-553.

Gilmore, T.D. 1990. NF-kappa B, KBF1, dorsal, and related matters. *Cell* 62:841-843.

Gilmore, T.D. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25:6680-6684.

Girardin, S.E., and Philpott, D.J. 2004. Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity. *Eur. J. Immunol*. 34:1777-1782.

Gitto, E., Karbownik, M., Reiter, R.J., Tan, D.X., Cuzzocrea, S., Chiurazzi, P., Cordaro, S., Corona, G., Trimarchi, G. y Barberi, I. 2001. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr. Res.* 50:756-760.

Gomes, A.P., Price, N.L., Ling, A.J., Moslehi, J.J., Montgomery, M.K., Rajman, L., White, J.P., Teodoro, J.S., Wrann, C.D., Hubbard, B.P., Mercken, E.M., Palmeira, C.M., de, C.R., Rolo, A.P., Turner, N., Bell, E.L. y Sinclair, D.A. 2013. Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell* 155:1624-1638.

Green, D.R., and Kroemer, G. 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458:1127-1130.

Greenberg, L.H., and Weiss, B. 1978. beta-Adrenergic receptors in aged rat brain: reduced number and capacity of pineal gland to develop supersensitivity. *Science* 201:61-63.

Grimaldi, B., Nakahata, Y., Kaluzova, M., Masubuchi, S. y Sassone-Corsi, P. 2009. Chromatin remodeling, metabolism and circadian clocks: the interplay of CLOCK and SIRT1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41:81-86.

Grimm, S., and Baeuerle, P.A. 1993. The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem. J.* 290 (Pt 2):297-308.

Halliwell, B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59:1609-1623.

Hamilton, B.A., Frankel, W.N., Kerrebrock, A.W., Hawkins, T.L., FitzHugh, W., Kusumi, K., Russell, L.B., Mueller, K.L., van, B., V, Birren, B.W., Kruglyak, L. y Lander, E.S. 1996. Disruption of the nuclear hormone receptor RORalpha in staggerer mice. *Nature* 379:736-739.

Han, M.K., Song, E.K., Guo, Y., Ou, X., Mantel, C. y Broxmeyer, H.E. 2008. SIRT1 regulates apoptosis and Nanog expression in mouse embryonic stem cells by controlling p53 subcellular localization. *Cell Stem Cell* 2:241-251.

Hardeland, R. 2008. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol. Life Sci.* 65:2001-2018.

Hardeland, R., and Poeggeler, B. 2003. Non-vertebrate melatonin. *J. Pineal Res.* 34:233-241.

HARMAN, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11:298-300.

HARMAN, D. 1972. Free radical theory of aging: dietary implications. *Am. J. Clin. Nutr.* 25:839-843.

He, Y.W., Deftos, M.L., Ojala, E.W. y Bevan, M.J. 1998. RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity.* 9:797-806.

Hekimi, S., Lapointe, J. y Wen, Y. 2011. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 21:569-576.

Helenius, M., Hanninen, M., Lehtinen, S.K. y Salminen, A. 1996a. Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF-kB transcription factor in mouse cardiac muscle. *J. Mol. Cell Cardiol.* 28:487-498.

Helenius, M., Hanninen, M., Lehtinen, S.K. y Salminen, A. 1996b. Changes associated with aging and replicative senescence in the regulation of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Biochem. J.* 318 (Pt 2):603-608.

Helenius, M., Kyrylenko, S., Vehvilainen, P. y Salminen, A. 2001. Characterization of aging-associated up-regulation of constitutive nuclear factor-kappa B binding activity. *Antioxid. Redox. Signal.* 3:147-156.

Henson, P.M. 2005. Dampening inflammation. *Nat. Immunol.* 6:1179-1181.

Hirose, T., Smith, R.J. y Jetten, A.M. 1994. ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205:1976-1983.

Horton, J.W. 2003. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology* 189:75-88.

Humbert, W., and Pevet, P. 1994. The decrease of pineal melatonin production with age. Causes and consequences. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 719:43-63.

Hyde, S.R., Stith, R.D. y McCallum, R.E. 1990. Mortality and bacteriology of sepsis following cecal ligation and puncture in aged mice. *Infect. Immun.* 58:619-624.

Inigo, J., Sendra, J.M., Diaz, R., Bouza, C. y Sarria-Santamera, A. 2006. [Epidemiology and costs of severe sepsis in Madrid. A hospital discharge study]. *Med. Intensiva*. 30:197-203.

Ishii, K.J., Koyama, S., Nakagawa, A., Coban, C. y Akira, S. 2008. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host. Microbe* 3:352-363.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327:291-295.

Janssen-Heininger, Y.M., Poynter, M.E. y Baeuerle, P.A. 2000. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic. Biol. Med.* 28:1317-1327.

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

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

Jenwitheesuk, A., Nopparat, C., Mukda, S., Wongchitrat, P. y Govitrapong, P. 2014. Melatonin regulates aging and neurodegeneration through energy metabolism, epigenetics, autophagy and circadian rhythm pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 15:16848-16884.

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

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

Johns, J.R., and Platts, J.A. 2014. Theoretical insight into the antioxidant properties of melatonin and derivatives. *Org. Biomol. Chem.* 12:7820-7827.

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

Kale, S.S., and Yende, S. 2011. Effects of Aging on Inflammation and Hemostasis through the Continuum of Critical Illness. *Aging Dis.* 2:501-511.

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

Khapre, R.V., Samsa, W.E. y Kondratov, R.V. 2010. Circadian regulation of cell cycle: Molecular connections between aging and the circadian clock. *Ann. Med.* 42:404-415.

Kim, B.C., Kim, H.T., Mamura, M., Ambudkar, I.S., Choi, K.S. y Kim, S.J. 2002a. Tumor necrosis factor induces apoptosis in hepatoma cells by increasing Ca(2+) release from the endoplasmic reticulum and suppressing Bcl-2 expression. *J. Biol. Chem.* 277:31381-31389.

Kim, D.H., Kim, H.K., Park, S., Kim, J.Y., Zou, Y., Cho, K.H., Kim, Y.S., Kim, D.H., Yu, B.P., Choi, J.S. y Chung, H.Y. 2006. Short-term feeding of baicalin inhibits age-associated NF- κ B activation. *Mech. Ageing Dev.* 127:719-725.

Kim, H.J., Kim, K.W., Yu, B.P. y Chung, H.Y. 2000. The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF-kappaB activation and IkappaBalpha degradation. *Free Radic. Biol. Med.* 28:683-692.

Kim, H.J., Yu, B.P. y Chung, H.Y. 2002b. Molecular exploration of age-related NF-kappaB/IKK downregulation by calorie restriction in rat kidney. *Free Radic. Biol. Med.* 32:991-1005.

Kirby, D.M., Thorburn, D.R., Turnbull, D.M. y Taylor, R.W. 2007. Biochemical assays of respiratory chain complex activity. *Methods Cell Biol.* 80:93-119.

Kojetin, D.J., and Burris, T.P. 2014. REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13:197-216.

Kondratov, R.V., Kondratova, A.A., Gorbacheva, V.Y., Vykhovanets, O.V. y Antoch, M.P. 2006. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev.* 20:1868-1873.

Kondratova, A.A., and Kondratov, R.V. 2012. The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 13:325-335.

Kong, S., McBurney, M.W. y Fang, D. 2012. Sirtuin 1 in immune regulation and autoimmunity. *Immunol. Cell Biol.* 90:6-13.

Korhonen, P., Helenius, M. y Salminen, A. 1997. Age-related changes in the regulation of transcription factor NF-kappa B in rat brain. *Neurosci. Lett.* 225:61-64.

Kvetnoy, I.M., Ingel, I.E., Kvetnaia, T.V., Malinovskaya, N.K., Rapoport, S.I., Raikhlin, N.T., Trofimov, A.V. y Yuzhakov, V.V. 2002. Gastrointestinal melatonin: cellular identification and biological role. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 23:121-132.

Lanone, S., Mebazaa, A., Heymes, C., Henin, D., Poderoso, J.J., Panis, Y., Zedda, C., Billiar, T., Payen, D., Aubier, M. y Boczkowski, J. 2000. Muscular contractile failure in septic patients: role of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 162:2308-2315.

Larsen, S., Kraunsoe, R., Gram, M., Gnaiger, E., Helge, J.W. y Dela, F. 2014. The best approach: homogenization or manual permeabilization of human skeletal muscle fibers for respirometry? *Anal. Biochem.* 446:64-68.

Latz, E. 2010. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr. Opin. Immunol.* 22:28-33.

Lawrence, R.A., and Burk, R.F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:952-958.

Lawrence, R.A., and Burk, R.F. 1978. Species, tissue and subcellular distribution of non Se-dependent glutathione peroxidase activity. *J. Nutr.* 108:211-215.

Leon, J., Acuna-Castroviejo, D., Escames, G., Tan, D.X. y Reiter, R.J. 2005. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J. Pineal Res.* 38:1-9.

Leon, J., Acuna-Castroviejo, D., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Tan, D.X. y Reiter, R.J. 2004. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci.* 75:765-790.

Lerner AB, Case JD y Heinzelman RV. 1959. Structure of melatonin. *J. A. Chem Soc* 81:6084-6085.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH y Mori W. 1958. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. A. Chem Soc* 80:2587-2592.

Li, Q., and Verma, I.M. 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2:725-734.

Lin, Y.C., Brown, K. y Siebenlist, U. 1995. Activation of NF-kappa B requires proteolysis of the inhibitor I kappa B-alpha: signal-induced phosphorylation of I kappa B-alpha alone does not release active NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:552-556.

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

Liu, C., Li, S., Liu, T., Borjigin, J. y Lin, J.D. 2007. Transcriptional coactivator PGC-1alpha integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature* 447:477-481.

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

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

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

Lopez, L.C., Escames, G., Ortiz, F., Ros, E. y Acuna-Castroviejo, D. 2006a. Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 27:623-630.

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

Lopez-Otin, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M. y Kroemer, G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153:1194-1217.

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

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

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

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

Manchester, L.C., Coto-Montes, A., Boga, J.A., Andersen, L.P., Zhou, Z., Galano, A., Vriend, J., Tan, D.X. y Reiter, R.J. 2015. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *J. Pineal Res.*

Martin, G.S., Mannino, D.M. y Moss, M. 2006. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med.* 34:15-21.

Martín, M., Macías, M., Escames, G., León, J. y Acuña-Castroviejo, D. 2000. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* 14:1677-1679.

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

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

Massudi, H., Grant, R., Braidy, N., Guest, J., Farnsworth, B. y Guillemin, G.J. 2012. Age-associated changes in oxidative stress and NAD⁺ metabolism in human tissue. *PLoS. One.* 7:e42357.

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

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

Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antoli, I., Herrera, F., Martin, V. y Rodriguez, C. 2002. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol. Life Sci.* 59:1706-1713.

Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819-826.

Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428-435.

Menendez-Pelaez, A., Poeggeler, B., Reiter, R.J., Barlow-Walden, L., Pablos, M.I. y Tan, D.X. 1993. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J. Cell Biochem.* 53:373-382.

Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J. y Johnson, J.E., Jr. 1980. Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.* 15:575-591.

Misra, H.P., and Fridovich, I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247:3170-3175.

Moras, D., and Gronemeyer, H. 1998. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:384-391.

Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J., Chen, D., Guarente, L.P. y Sassone-Corsi, P. 2008. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* 134:329-340.

Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M. y Sassone-Corsi, P. 2009. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* 324:654-657.

Nakajima, Y., Ikeda, M., Kimura, T., Honma, S., Ohmiya, Y. y Honma, K. 2004. Bidirectional role of orphan nuclear receptor ROR α in clock gene transcriptions demonstrated by a novel reporter assay system. *FEBS Lett.* 565:122-126.

Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-852.

Nemoto, S., Fergusson, M.M. y Finkel, T. 2005. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 α . *J. Biol. Chem.* 280:16456-16460.

Opal, S.M., Girard, T.D. y Ely, E.W. 2005. The immunopathogenesis of sepsis in elderly patients. *Clin. Infect. Dis.* 41 Suppl 7:S504-S512.

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

Paredes, S.D., Korkmaz, A., Manchester, L.C., Tan, D.X. y Reiter, R.J. 2009. Phytomelatonin: a review. *J. Exp. Bot.* 60:57-69.

Pesta, D., and Gnaiger, E. 2012. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol. Biol.* 810:25-58.

Pichlmair, A., and Reis e Sousa. 2007. Innate recognition of viruses. *Immunity*. 27:370-383.

Poeggeler, B. 2005. Melatonin, aging, and age-related diseases: perspectives for prevention, intervention, and therapy. *Endocrine*. 27:201-212.

Poeggeler, B., Reiter, R.J., Tan, D.X., Chen, L.D. y Manchester, L.C. 1993. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J. Pineal Res.* 14:151-168.

Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U. y Schibler, U. 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110:251-260.

Rajamaki, K., Lappalainen, J., Oorni, K., Valimaki, E., Matikainen, S., Kovanen, P.T. y Eklund, K.K. 2010. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS. One*. 5:e11765.

Ramsey, K.M., Yoshino, J., Brace, C.S., Abrassart, D., Kobayashi, Y., Marcheva, B., Hong, H.K., Chong, J.L., Buhr, E.D., Lee, C., Takahashi, J.S., Imai, S. y Bass, J. 2009. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science* 324:651-654.

Reiter, R.J. 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 12:151-180.

Reiter, R.J. 1992. The ageing pineal gland and its physiological consequences. *Bioessays* 14:169-175.

Reiter, R.J., Manchester, L.C., Fuentes-Broto, L. y Tan, D.X. 2010. Cardiac hypertrophy and remodelling: pathophysiological consequences and protective effects of melatonin. *J. Hypertens.* 28 Suppl 1:S7-12.

Reiter, R.J., Paredes, S.D., Manchester, L.C. y Tan, D.X. 2009. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44:175-200.

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

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

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

Renshaw, M., Rockwell, J., Engleman, C., Gewirtz, A., Katz, J. y Sambhara, S. 2002. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J. Immunol.* 169:4697-4701.

Reppert, S.M., and Weaver, D.R. 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935-941.

Reuss, S., Spies, C., Schroder, H. y Vollrath, L. 1990. The aged pineal gland: reduction in pinealocyte number and adrenergic innervation in male rats. *Exp. Gerontol.* 25:183-188.

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

Rittirsch, D., Huber-Lang, M.S., Flierl, M.A. y Ward, P.A. 2009. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat. Protoc.* 4:31-36.

Rodgers, J.T., Lerin, C., Gerhart-Hines, Z. y Puigserver, P. 2008. Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS Lett.* 582:46-53.

Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M. y Puigserver, P. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434:113-118.

Rodríguez, M.I., Carretero, M., Escames, G., Lopez, L.C., Maldonado, M.D., Tan, D.X., Reiter, R.J. y Acuna-Castroviejo, D. 2007a. Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radic. Res.* 41:15-24.

Rodríguez, M.I., Escames, G., Lopez, L.C., Garcia, J.A., Ortiz, F., Lopez, A. y Acuna-Castroviejo, D. 2007b. Melatonin administration prevents cardiac and diaphragmatic mitochondrial oxidative damage in senescence-accelerated mice. *J. Endocrinol.* 194:637-643.

Rodríguez, M.I., Escames, G., Lopez, L.C., Lopez, A., Garcia, J.A., Ortiz, F. y Acuna-Castroviejo, D. 2007c. Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. *J. Pineal Res.* 42:272-279.

Sahar, S., and Sassone-Corsi, P. 2012. Circadian rhythms and memory formation: regulation by chromatin remodeling. *Front Mol. Neurosci.* 5:37.

Saito, H., Sherwood, E.R., Varma, T.K. y Evers, B.M. 2003. Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. *Mech. Ageing Dev.* 124:1047-1058.

Salminen, A., Huuskonen, J., Ojala, J., Kauppinen, A., Kaarniranta, K. y Suuronen, T. 2008. Activation of innate immunity system during aging: NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Res. Rev.* 7:83-105.

Sato, T.K., Panda, S., Miraglia, L.J., Reyes, T.M., Rudic, R.D., McNamara, P., Naik, K.A., FitzGerald, G.A., Kay, S.A. y Hogenesch, J.B. 2004. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43:527-537.

Schmitz, M.L., and Baeuerle, P.A. 1991. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO J.* 10:3805-3817.

Schroder, K., Zhou, R. y Tschopp, J. 2010. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science* 327:296-300.

Sen, R., and Baltimore, D. 1986a. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47:921-928.

Sen, R., and Baltimore, D. 1986b. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986. 46: 705-716. *J. Immunol.* 177:7485-7496.

Shaw, A.C., Goldstein, D.R. y Montgomery, R.R. 2013. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13:875-887.

Spencer, N.F., Poynter, M.E., Im, S.Y. y Daynes, R.A. 1997. Constitutive activation of NF-kappa B in an animal model of aging. *Int. Immunol.* 9:1581-1588.

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

Starr, M.E., and Saito, H. 2014. Sepsis in old age: review of human and animal studies. *Aging Dis.* 5:126-136.

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

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

Suliman, H.B., Welty-Wolf, K.E., Carraway, M.S., Schwartz, D.A., Hollingsworth, J.W. y Piantadosi, C.A. 2005. Toll-like receptor 4 mediates mitochondrial DNA damage and biogenic responses after heat-inactivated E. coli. *FASEB J.* 19:1531-1533.

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

Tajes, M., Gutierrez-Cuesta, J., Ortuno-Sahagun, D., Camins, A. y Pallas, M. 2009. Anti-aging properties of melatonin in an in vitro murine senescence model: involvement of the sirtuin 1 pathway. *J. Pineal Res.* 47:228-237.

Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Plummer, B.F., Limson, J., Weintraub, S.T. y Qi, W. 2000. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic. Biol. Med.* 29:1177-1185.

Tan, D.X., Manchester, L.C., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Leon, J., Hardeland, R., Poeggeler, B. y Reiter, R.J. 2005. Interactions between melatonin and nicotinamide nucleotide: NADH preservation in cells and in cell-free systems by melatonin. *J. Pineal Res.* 39:185-194.

Tattoli, I., Travassos, L.H., Carneiro, L.A., Magalhaes, J.G. y Girardin, S.E. 2007. The Nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation. *Semin. Immunopathol.* 29:289-301.

Troen, B.R. 2003. The biology of aging. *Mt. Sinai J. Med.* 70:3-22.

Tschopp, J. 2011. Mitochondria: Sovereign of inflammation? *Eur. J. Immunol.* 41:1196-1202.

Turnbull, I.R., Clark, A.T., Stromberg, P.E., Dixon, D.J., Woolsey, C.A., Davis, C.G., Hotchkiss, R.S., Buchman, T.G. y Coopersmith, C.M. 2009. Effects of aging on the immunopathologic response to sepsis. *Crit Care Med.* 37:1018-1023.

Ueda, H.R., Hayashi, S., Chen, W., Sano, M., Machida, M., Shigeyoshi, Y., Iino, M. y Hashimoto, S. 2005. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat. Genet.* 37:187-192.

Ulloa, L., Brunner, M., Ramos, L. y Deitch, E.A. 2009. Scientific and clinical challenges in sepsis. *Curr. Pharm. Des* 15:1918-1935.

Urata, Y., Honma, S., Goto, S., Todoroki, S., Iida, T., Cho, S., Honma, K. y Kondo, T. 1999. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 27:838-847.

Van Gool, W.A., and Mirmiran, M. 1986. Aging and circadian rhythms. *Prog. Brain Res.* 70:255-277.

van, U.P., Kenneth, N.S. y Rocha, S. 2008. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem. J.* 412:477-484.

Vasto, S., Candore, G., Balistreri, C.R., Caruso, M., Colonna-Romano, G., Grimaldi, M.P., Listi, F., Nuzzo, D., Lio, D. y Caruso, C. 2007. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech. Ageing Dev.* 128:83-91.

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

Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van, A.D. y Miyamoto, S. 1995. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* 9:2723-2735.

von, G.C., Stehle, J.H. y Weaver, D.R. 2002. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 309:151-162.

Vriend, J., and Reiter, R.J. 2015. Melatonin feedback on clock genes: a theory involving the proteasome. *J. Pineal Res.* 58:1-11.

Waldhauser, F., and Steger, H. 1986. Changes in melatonin secretion with age and pubescence. *J. Neural Transm. Suppl* 21:183-197.

Waldhauser, F., Weiszenbacher, G., Tatzler, E., Gisinger, B., Waldhauser, M., Schemper, M. y Frisch, H. 1988. Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 66:648-652.

Wallace, D.C. 1992. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 256:628-632.

Webster, N.R., and Nunn, J.F. 1988. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br. J. Anaesth.* 60:98-108.

Weinert, D. 2000. Age-dependent changes of the circadian system. *Chronobiol. Int.* 17:261-283.

Weitzberg, E. 2005. L-arginine transport and sepsis. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 49:434-436.

Wheeler, D.S., Zingarelli, B., Wheeler, W.J. y Wong, H.R. 2009. Novel pharmacologic approaches to the management of sepsis: targeting the host inflammatory response. *Recent Pat Inflamm. Allergy Drug Discov.* 3:96-112.

Wichmann, M.W., Haisken, J.M., Ayala, A. y Chaudry, I.H. 1996. Melatonin administration following hemorrhagic shock decreases mortality from subsequent septic challenge. *J. Surg. Res.* 65:109-114.

Wichterman, K.A., Baue, A.E. y Chaudry, I.H. 1980. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J. Surg. Res.* 29:189-201.

Wiesenberg, I., Missbach, M. y Carlberg, C. 1998. The potential role of the transcription factor RZR/ROR as a mediator of nuclear melatonin signaling. *Restor. Neurol. Neurosci.* 12:143-150.

Wiesenberg, I., Missbach, M., Kahlen, J.P., Schrader, M. y Carlberg, C. 1995. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res.* 23:327-333.

Withyachumnarnkul, B., Limpanawattanakul, M. y Trakulrunsi, W. 1986. Retention of radioactive substances in the hypothalamus, anterior pituitary, and reproductive organs of male rats after 3H-melatonin administration. *Life Sci.* 38:1757-1765.

Witting, W., Mirmiran, M., Bos, N.P. y Swaab, D.F. 1994. The effect of old age on the free-running period of circadian rhythms in rat. *Chronobiol. Int.* 11:103-112.

Yang, Y., Jiang, S., Dong, Y., Fan, C., Zhao, L., Yang, X., Li, J., Di, S., Yue, L., Liang, G., Reiter, R.J. y Qu, Y. 2015. Melatonin prevents cell death and mitochondrial dysfunction via a SIRT1-dependent mechanism during ischemic-stroke in mice. *J. Pineal Res.* 58:61-70.

Yeung, F., Hoberg, J.E., Ramsey, C.S., Keller, M.D., Jones, D.R., Frye, R.A. y Mayo, M.W. 2004. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 23:2369-2380.

Yoshino, J., Mills, K.F., Yoon, M.J. y Imai, S. 2011. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab* 14:528-536.

Youm, Y.H., Grant, R.W., McCabe, L.R., Albarado, D.C., Nguyen, K.Y., Ravussin, A., Pistell, P., Newman, S., Carter, R., Laque, A., Munzberg, H., Rosen, C.J., Ingram, D.K., Salbaum, J.M. y Dixit, V.D. 2013. Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging. *Cell Metab* 18:519-532.

Zhang, G., Li, J., Purkayastha, S., Tang, Y., Zhang, H., Yin, Y., Li, B., Liu, G. y Cai, D. 2013. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH. *Nature* 497:211-216.

Zhang, H., Squadrito, G.L., Uppu, R. y Pryor, W.A. 1999. Reaction of peroxynitrite with melatonin: A mechanistic study. *Chem. Res. Toxicol.* 12:526-534.

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

Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P. y Tschopp, J. 2011. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469:221-225.

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

ANEXOS

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

Símbolo del gen	Nombre	Forward primer	Reverse primer
GPx1	Glutación peroxidasa tipo I	CAAATGAGCCCAAAGGAAAC	GGACAGAGTGAGAGGATAGC
GRd	Glutación reductasa	ACTTGCGTGAATGTTGGATGTG	GCTCTCGTGAGGAACTGTGG
SOD1	Superóxido dismutasa [Cu-Zn]	GCTTCTCGTCTTGCTCTCTCTG	GTTCCACCGCTTGCCTTCTGC
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa	AAGCAAGCAGCCAACCAG	ACAAGCAGGAATGAGAAGAGG
IL-1β	Interleuquina-1beta	TTCAGGCAGGCAGTATCAC	CAGCAGGTTATCATCATCATCC
IκBα	Inhibidor de NF-kappa-B tipo alfa	GAGCAAATGGTGAAGGAG	TCTGGAAGTTGAGGAAGG
NAMPT	Nicotinamida fosforibosiltransferasa	AGAGGCACCACTAATCATCAG	CACCAGAACCGAAGGAGAC
Clock	Gen circadiano locomotor de la salida de ciclos kaput	GGTGGTGACTGCCTATCCTAC	CTGCTGTTGTTGTTGCTGTTG
Bmal1	Receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos1	GAAGACAATGAGCCAGACAAC	CCATAGATTTACCCGTATTTC
CAT	Catalasa	GTCCGTCCTGCTGTCTC	GCTCCTTCCACTGCTTCATC
SIRT1	Sirtuína 1	CGTCTTGTCTCTAGTTCCTG	GCCTCTCCGTATCATCTTCC
Casp-1	Caspasa 1	CGTCTTGTCTCTAGTTCCTG	TCACCTCTTTCACCATCTCC

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

Símbolo del gen	Nombre	Forward primer	Reverse primer
NLRP3	Proteína 3 de la familia NLR	AGGAGGAAGAAGAAGAGAGGA	AGAGACCACGGCAGAAGC
ASC	Proteína CARD asociada a apoptosis	GAGACCACCAGCAAGAC	AAACATCCCAGAGAGTAAACAC
Rev-Erba	Receptor nuclear de la subfamilia 1, grupo D, miembro 1	ACACACTCTCTGCTCTTC	GACCTTGACACAAACTGG
γGCS	Gamma glutamylcisteinasintetasa	TCAGATATTGGATGGAGAGTAG	AACCTTGGACAGCGGAATG
G6PDH	Glucose 6-fosfatodeshidrogenasa	GGCGACATCTCCACCAG	GGCGTTCATAGGCACCAG
HIF-1α	Factor de hipoxia inducible 1 tipo alfa	AAGGCATCAGCATAACAGTGG	AAGTGGCAGACAGGTTAAGG
p53	Proteína supresora de tumores p53	GCTGCTCCGATGGTGATG	AGTGTGATGATGGTAAGGATAG
Bax	Proteína X asociada a Bcl2	GCCTCCTCTCCTACTTCGG	CCTCAGCCCATCTTCTTCC
Bcl2	Células B/linfoma 2	GCAGAGATGTCCAGTCAGC	GGCGATGTTGTCCACCAG
Casp-3	Caspasa 3	GCTGACTTCCTGTATGCTTAC	ATCCGTTGCCACCTTCC
Beta-actin	Beta-actina	GCTGTCCCTGTATGCCTCTG	CGCTCGTTGCCAATAGTGATG

Anexo 2. Lista de anticuerpos usados en el análisis del contenido proteico por Western**Blot.**

Símbolo	Nombre	Epítipo del anticuerpo	Ref.
NF-κB	Factor Nuclear kappa B	Aminoácidos 1-286 en N-terminal	sc-8008
IL-1β	Interleuquina-1 beta	Aminoácidos 117-269 en C-terminal	sc-7884
IκBα	Inhibidor kappa B alfa	Proteína completa	sc-1643
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa	Proteína completa	sc-52746
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible	Cerca del dominio C-terminal de iNOS	sc-650
NLRP3	Proteína 3 de la familia NLR	Proteína completa	AG-20B-0014
ASC	Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing CARD	Proteína completa	AG-25B-0006(AL177)
Casp-1	Caspasa-1	Dominio N-terminal de caspasa-1	sc-622
Casp-1 p20	Caspasa-1 activada (p20)	Neopéptido Asp296 de caspasa-1	sc-22165
RORα	Receptor huérfano relacionado con RAR tipo alfa	Cerca del dominio N-terminal de ROR α 1	sc-26377
PGC-1α	Proliferador de peroxisomas activados receptor gamma coactivador 1 alfa	Cerca del dominio N-terminal de PGC-1 α	sc-13067
SIRT1	Sirtuína 1	Proteína completa	Millipore, Clone 10E4

Anexo 2 (continuación). Lista de anticuerpos usados en el análisis del contenido proteico por Western Blot.

Símbolo	Nombre	Epítipo del anticuerpo	Ref.
p53	Proteína supresora de tumores p53	Aminoácidos 1-393 en C-terminal	Sc-6243
Bax	Proteína X asociada a Bcl2	Cerca del dominio N-terminal de Bax	sc-526
Bcl-2	Células B/linfoma 2	Dominio N-terminal de Bcl-2	sc-492
Casp-3	Caspasa-3	Aminoácidos 25-145 de caspasa-3	sc-136219
Cyt c	Citocromo c	Proteína completa	Ab-110325 [37BA11]
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	Proteína completa	sc-25778

Same molecule but different expression: aging and sepsis trigger NLRP3 inflammasome activation, a target of melatonin. Huayqui Volt, José A. García, Carolina Doerrier, María E. Díaz-Casado, Ana Guerra-Librero, Luis C. López, Germaine Escames, Jesús A. Tresguerres, Darío Acuna-Castroviejo. *Journal of Pineal Research*, 2015; doi: 10.1111/jpi.12303.

Received Date : 13-Oct-2015

Revised Date : 05-Dec-2015

Accepted Date : 11-Dec-2015

Article type : Original Manuscript

Same molecule but different expression: aging and sepsis trigger NLRP3 inflammasome activation, a target of melatonin

Huayqui Volt^{1,2}, José A. García^{1,2}, Carolina Doerrier^{1,2}, María E. Díaz-Casado^{1,2}, Ana Guerra-Librero^{1,2}, Luis C. López^{1,2}, Germaine Escames^{1,2}, Jesús A Tresguerres³, and Darío Acuña-Castroviejo^{1,2,4}

¹Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Universidad de Granada, Granada, Spain.

²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain.

³Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Spain

⁴Unidad de Gestión Clínica de Laboratorios, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain.

Running title: NLRP3 inflammasome and melatonin in age

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/jpi.12303

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Address reprint requests to Darío Acuña-Castroviejo, Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18016, Granada, Spain; fax: +34958819132; phone: +34958241000 ext. 20169; E-mail: dacuna@ugr.es

Keywords: Inflammaging; NLRP3 inflammasome; melatonin; NF- κ B; mitochondria, clock genes.

Abstract

The connection between the innate immune system, clock genes, and mitochondrial bioenergetics was analyzed during aging and sepsis in mouse heart. Our results suggest that the sole NF- κ B activation does not explain the inflammatory process underlying aging; the former also triggers the NLRP3 inflammasome that enhances caspase-1-dependent maturation of IL-1 β . In this way, aged mice enter into a vicious cycle as IL-1 β further activates the NF- κ B/NLRP3 inflammasome link. The origin of NF- κ B activation was related to the age-dependent Bmal1/Clock/ROR α /Rev-Erba loop disruption, which lowers NAD⁺ levels, reducing the SIRT1 deacetylase ability to inactivate NF- κ B. Consequently, NF- κ B binding to DNA increases, raising the formation of proinflammatory mediators and inducing mitochondrial impairment. The cycle is then closed with the subsequent NLRP3 inflammasome activation. This paired contribution of the innate immune pathways serves as a catalyst to magnify the response to sepsis in aged compared with young mice. Melatonin administration blunted the septic response, reducing inflammation and oxidative stress, and enhancing mitochondrial function at the levels of non-septic aged mice, but it did not counteract the age-related inflammation. Together, our results suggest that, although with different strengths, chronoinflammaging constitutes the biochemical substrate of aging and

sepsis, and identifies the NLRP3 inflammasome as a new molecular target for melatonin, providing a rationale for its use in NLRP3-dependent diseases.

Introduction

Cardiac impairment during sepsis is an important component of multiple organ failure in the elderly [1-3]. Sepsis is associated with high mortality and morbidity in the critical care units [4,5], and its incidence and susceptibility are disproportionately elevated in aged patients, with significantly high mortality rate during sepsis [1,2,6-8]. It is now recognized the existence of a low-level inflammatory process during aging, which results of the innate immune system dysregulation, the so-called “inflammaging” [9], leading to chronic IL-1 β and TNF α production [10], a condition that may help to understand why aged mice are more sensitive to the lethal effects of sepsis [11]. Because sepsis constitutes a specific pathophysiological and clinical picture, with no current effective therapy in the elderly [2,3,12], it is important firstly to realize the innate immunity dysregulation during aging, to understand what happen during sepsis.

The nuclear factor kappa B (NF- κ B) is a cytosolic sensor of multiple dangerous signals including oxidative stress, which activates and promotes its nuclear translocation and DNA binding [13]. The nuclear NF- κ B content and its DNA binding increase with age [14,15] and sepsis [12,16], further supporting a connection between both conditions. NF- κ B controls a series of genes involved in the immune response [13,16], including NATCH-, LRR- and PYD-containing Protein 3 (NLRP3) [17]. Among others, reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial DNA (mtDNA) released from damaged mitochondria to the cytosol promote the NLRP3 inflammasome assembly, a multiprotein complex that activates caspase-1 [18-20]. Once activated, caspase-1 processes the NF- κ B-dependent pro-inflammatory

Accepted Article
cytokines including pro-interleukin-1 beta (pro-IL-1 β) to their mature forms [20]. Thus, the activation of both NLRP3 inflammasome and NF- κ B innate immunity pathways leads to overproduction of IL-1 β , TNF α and other proinflammatory mediators, all of which rise during the inflammatory process associated with age [10,21,22] and sepsis in elderly [6,7].

NF- κ B activation is under the control of a loop represented by the clock genes Bmal1/Clock, and their transcriptional positive and negative regulators ROR α and Rev-Erba [23,24], respectively. Activation of this pathway led to enhancing NAD⁺ levels and silent information regulator type 1 (SIRT1) deacetylase activity, which in turn modulates clock [25] and inactivates NF- κ B, reducing its binding ability to DNA [26]. By contrast, chronodisruption involves a drop in NAD⁺ levels and reduction in the SIRT1 deacetylase ability, impeding its inactivation of NF- κ B. Here, the induction of NF- κ B-dependent proinflammatory mediators raised, leading to mitochondrial impairment. Thus, chronodisruption, inflammaging and, probably, the exaggerated innate immune response during sepsis may be intimately connected.

The lack of an effective therapeutic strategy for sepsis may be now explained by the existence of the NLRP3/mitochondrion innate immune pathway besides the classic NF- κ B pathway. Therefore, to control the septic process we need a drug able to blunt the whole innate immune loop represented by the clock/NF- κ B/NLRP3 connection, and avoiding mitochondrial-deriving ROS at the same time [27,28]. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) fulfills these criteria; it is a potent antioxidant and free radical scavenger [29-31]; it is actively taken up by the mitochondria [32] where it maintains their homeostasis [33,34], and exerts potent antiseptic properties [35] acting against the NF- κ B-dependent innate immune pathway activation [36,37]. Recently, we showed that melatonin also blunts the NLRP3 inflammasome activation in different experimental conditions [38,39].

Here, we considered it worthwhile to assess whether the NLRP3 inflammasome is involved in the inflammaging process itself, and also in the amplified response to sepsis in heart of aged mice. Moreover, we analyzed the mechanisms involved in its activation, including the clock genes/SIRT1 connection. In view of the properties of melatonin, we evaluated whether an acute administration of melatonin to aged mice was able to blunt the exaggerated response of the NF- κ B/NLRP3 response during sepsis.

Materials and methods

Animals

C57/BL6 male mice of 3 month old (denoted as ‘young’) and 18 month old (denoted as ‘aged mice’) were provided by Harlan Laboratories (Barcelona, Spain). Animals were maintained in the University of Granada’s facility under a 12:12 hr light/dark cycle (lights on at 08:00 h) at 22 °C \pm 1°C, and they were fed *ad libitum* and with free access to water. All experiments were conducted in accordance with the University of Granada’s Ethical Committee; the Spanish Protection Guide for Animal Experimentation (R.D. 53/2013), and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (CETS # 123). All animals were sacrificed at 17:00 hr, and the hearts were collected and processed immediately for mitochondrial respiration, or frozen to -80 °C to further analysis.

Surgical procedures and melatonin treatment

Aged mice were grouped into three experimental groups: a) control group (C); b) septic group (S8), in which sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP) in mice anesthetized with equithensin (1 mL/kg bw, ip), as previously reported [40], and c) septic

group treated with melatonin (S8M). S8M group received a total dose of 90 mg/kg bw melatonin distributed in three doses (30 mg/kg bw each one, dissolved in 0.3 mL of 0.25% ethanol:saline) as follows: one dose 30 min before surgery (ip); the second dose just after surgery (sc), and the third dose at 4 h after surgery (sc) (Fig. 1). All mice underwent surgery at the same time of day to avoid diurnal variations on the immune response and were sacrificed 8 hours after induction of sepsis. The data obtained from aged mice were always compared with young mice (CY).

Isolation of cytosolic and nuclear fractions

Pure cytosol and nuclear extracts were prepared from hearts using the Nuclear Extract kit (Active Motif, La Hulpe, Belgium). Briefly, heart was homogenized in PBS containing 5% PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer, 125 mM NaF, 250 mM β -glycerophosphate, 250 mM para-nitrophenyl phosphate, 25 mM NaVO_3 , pH 7.4, 4 °C) at 800 rpm with a Teflon pestle. The homogenate was centrifuged at 300 g for 5 min at 4°C, and pellets obtained were gently resuspended in 0.25 mL of ice-cold hypotonic buffer (20 mM HEPES, 5 mM NaF, 10 μM Na_2MoO_4 , 0.1 mM EDTA, pH 7.5). After incubation for 15 min at 4°C, 50 μL of 10% IGEPAL CA-630 was added and mixed by gentle pipetting. The resulting suspension was centrifuged at 14,000g for 1 min at 4°C, and the cytosolic supernatants obtained were aliquoted and store at -80 °C. Meanwhile, nuclear pellet was gently suspended in 0.2 mL of ice-cold lysis buffer (20 mM HEPES, 20% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA, 20 mM NaF, 0.5 mM DTT, 1 mg/mL leupeptin and 0.2 mM PMSF, pH 7.9), followed by incubation at 4°C for 30 min on a shaking platform. After centrifugation at 14,000g for 10 min at 4°C, the final supernatant containing pure nuclear extract was aliquoted and frozen at -80°C.

Real-time RT-PCR

Heart RNA was isolated with the Real Total RNA Spin Plus kit (Durviz, S.L., Valencia, Spain) and quantified in a Nano Drop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). RNA integrity was confirmed by agarose gel electrophoresis, and cDNA was synthesized from 400 ng of total RNA using the qScript™ cDNA SuperMix kit (Quanta Biosciences, Gaithersburg, USA). Quantitative RT-PCR was performed in a Stratagene Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies, Madrid, Spain) using SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Primer sequences (Table S1) were designed using the Beacon Designer software (Premier Biosoft Inc., Palo Alto, CA, USA), and output data were analyzed with the MxPro QPCR software (v 4.0) (Agilent Technologies) according to the standard curves generated from increasing amounts of cDNA (0.05, 0.5, 5, 50 and 500 ng). The *beta-actin* housekeeping gene was used as an internal standard. The PCR program was initiated with 10 min at 95°C before 40 thermal cycles, each consisting of 15 s at 95°C and 1 min at 55°C. The negative control included template-free (water) reaction, and young mice (CY) were used as calibrator sample.

Measurement of GPx, GRd, SOD1 and CAT activities

Glutathione peroxidase (GPx) and reductase (GRd) activities were spectrophotometrically measured from cytosol fractions following the NADPH oxidation for 3 min at 340 nm [41] in a Shimadzu UV spectrophotometer (UV-1700, Duisburg, Germany). The enzyme activities were expressed as nmol/min/mg prot. Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) was assayed in terms of its ability to inhibit the auto-oxidation of adrenalin to adrenochrome at pH 10.2 [42]. SOD1 activity was expressed as U/mg prot (1 unit = 50% inhibition of auto-oxidation of epinephrine). Catalase (CAT) activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\text{prot}$) was measured in heart homogenate following the decomposition of H_2O_2 at 240 nm according to the Aebi's method

[43]. Protein concentrations were determined spectrophotometrically using the Bradford procedure [44].

Western blot analysis

Cytosolic or nuclear proteins (10-20 μg) were resolved by SDS-PAGE using 7.5 % or 12.5 % acrylamide gels and proteins blotted onto nitrocellulose membranes (PhastSystem) from GE Healthcare Life Sciences (Barcelona, Spain). Immunoblotting analysis was performed using the primary antibodies showed in the Table S2. Anti-mouse (BD Biosciences Pharmigen, San Jose, CA, USA), anti-rabbit (Thermo Scientific, Madrid, Spain) and anti-goat (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) HRP-conjugated secondary antibodies were used according to manufacturer's instructions. The immunoreaction was detected using the ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, Spain). Plots were digitized on a Kodak Image Station 2000R (Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA) and quantified using 1D Image Analysis software 3.6.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

NF- κB p65 DNA-binding was measured in heart nuclear extracts using a Trans-AMTM NF- κB p65 Kit (Active Motif, La Hulpe, Belgium). Total NAD⁺ levels were determined from heart homogenates according to the protocol provided in the NAD/NADH Assay Kit (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). NAD⁺ levels was calculated according to the formula $\text{NAD}^+ = \text{NADt} - \text{NADH}$, and expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot.

Mitochondrial respiration assay

High-resolution respirometry was carried out in a two-chamber respirometer (Oxygraph-2K, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) at 30°C and under continuous stirring (750 rpm). Adequate calibrations and background were used to correct respiratory parameters calculations. 0.7 mg of muscle fibres were permeabilized mechanically and chemically with 5 mg/mL saponin in the preservation buffer BIOS (2.77 mM CaK₂EGTA, 7.23 mM Na₂ATP, 6.56 mM MgCl₂·6H₂O, 20 mM taurine, 15 mM Na₂Phospho-creatine, 20 mM imidazole, 0.5 mM dithiothreitol, 50 mM MES, pH 7.1) [45]. Samples of permeabilized fibers were put inside the respirometer chambers in 2 mL of MiR06Cr medium (0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂·6H₂O, 20 mM taurine, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 110 mM D-sucrose, 1 g/L fatty acid-free BSA, 60 mM lactobionic acid and 280 units/mL catalase, pH 7.1), enriched with 3 mg/mL creatine) at 37°C. Respiration was determined with 10 mM glutamate, 2 mM malate, 2 mM pyruvate and 10 mM succinate. After adding saturating concentrations of ADP (titration steps of 0.5 mM), maximum capacity of electron transfer system (ETS) was estimated in the presence of 1 μM of the uncoupler agent carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP). Data were acquired and analyzed with DatLab 4 software (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria).

Determination of the mitochondrial I, II, III and IV complexes activity

The activities of the four respiratory complexes were determined as previously described [46], with slight modifications for heart homogenates. Hearts were homogenized in ice-cold CPT buffer (50 mM TRIS-HCl and 150 mM KCl, pH 7.5) at 1,000 rpm with a Teflon pestle. The homogenate was sonicate with a Bandelin Sonopuls HD-2070 sonicator (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany) at 35% for 10 seconds and centrifuge at 2,500 rpm for 20 min at 4 °C. The homogenate supernatants were aliquoted and store at -80 °C.

Complex I activity (NADH CoQ oxidoreductase, in nmol oxidized NADH/min/mg protein) was measured in the presence of decylubiquinone as the rotenone-sensitive decrease of NADH at 340 nm. The activity of complex II (succinate: 2,6-dichloroindophenol (2,6-DCIP) oxoreductase, in nmol reduced DCIP/min/mg protein) was measured in the presence of decylubiquinone plus rotenone as the antimycin A-sensitive reduction of 2,6-DCIP at 600 nm with 520 nm as reference wavelength [47]. Complex III activity (ubiquinol: cytochrome *c* oxidoreductase, in nmol reduced cytochrome *c*/min/mg protein) was measured in the presence of rotenone and decylubiquinone following the rate of reduction of cytochrome *c* at 550 nm with 580 nm as the reference wavelength [47]. Complex IV activity (cytochrome *c* oxidase, in nmol oxidized cytochrome *c*/min/mg protein) was measured as the disappearance of reduced cytochrome *c* at 550 nm. Complex I + III activity was measured at 30°C in the presence of 0.5 mM potassium cyanide, 0.2 mM NADH and 0.1 mM cytochrome *c*, as the rotenone-sensitive reduction of cytochrome *c* at 550 nm [48]. The results were expressed in nmol reduced cyt *c*/min/mg prot. Complex II + III activity was measured at 30°C in the presence of 0.5 mM KCN, 0.3 mM succinate and 0.01 mM rotenone. The reaction was initiated by addition of 0.1 mM cytochrome *c* and decrease in absorbance was monitored at 550 nm. The results were expressed in nmol reduced cyt *c*/min/mg protein [48].

Statistics

Data are expressed as the mean \pm SEM and summarize independent experiments as specified in the text. Experimental groups were compared with Prism software (GraphPad, La Jolla, CA, USA) using One-way ANOVA with Bonferroni post-test. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Aging significantly induced the mRNA expression and protein content of NLRP3 compared to young mice (Fig. 2A,B), which was further enhanced by sepsis (Fig. 2A,B, $P < 0.001$). Pro-caspase-1 mRNA expression and protein content, which increased in aged mice (Fig. 2A,C, $P < 0.01$), did not modify under sepsis. Sepsis, however, induced a significant increase ($P < 0.001$) in the active caspase-1 (p20), which was also induced by age (Fig. 2A,C, $P < 0.01$). The apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) mRNA and protein levels, which is involved in the NLRP3 inflammasome assembly, did not change in these conditions (Fig. 2A,D). Interestingly, melatonin treatment counteracted the sepsis, but not the age-dependent expression and content of NLRP3 (Fig. 2A,B, $P < 0.01$). A similar effect of melatonin treatment accounted for cleaved caspase-1 (p20) (Fig. 2A,C, $P < 0.01$), whereas ASC was unmodified by the indoleamine (Fig. 2A,D).

Because *NLRP3* expression is under the transcriptional control of NF- κ B, we next looked for any changes in NF- κ B in our experimental paradigm. Both, nuclear content and DNA binding capacity of NF- κ B enhanced with age (Fig. 3A, $P < 0.001$), whereas sepsis further amplified this response (Fig. 3A, $P < 0.01$). Melatonin treatment counteracted the effect of sepsis, but not of age, on NF- κ B (Fig. 3A, $P < 0.01$). Age-dependent NF- κ B activation was followed by the increase in protein content ($P < 0.01$) and mRNA expression ($P < 0.01$) of two of the NF- κ B-dependent proinflammatory molecules, TNF α and iNOS (Fig. 3C,D). These inflammatory factors were further induced by sepsis (Fig. 3C,D, $P < 0.01$). Melatonin completely blunted the effects of sepsis, but not of age, on the NF- κ B pathway activation. Aging also produced an increase in the *I κ B α* inhibitor expression ($P < 0.01$) and content ($P < 0.05$), an effect potentiated during sepsis (Fig. 3E). Melatonin treatment seems do not modify *I κ B α* expression, but promotes its cytosolic retention, reducing its nuclear content (Fig. 3E, $P < 0.01$). In these conditions, an enhanced *IL-1 β* expression, pro-IL-1 β levels, as well as

mature IL-1 β content, were detected in aged mice (Fig. 3B). Sepsis did not change the pro-IL-1 β levels despite a greater increase in its mRNA levels ($P < 0.001$), because the former is being maturing to IL-1 β (Fig. 3B, $P < 0.001$). Again, melatonin treatment counteracted the effects of sepsis on IL-1 β expression and mature content, restoring their levels at those found in aged animals (Fig. 3B, $P < 0.01$).

NLRP3 inflammasome activation depends, among other signals, on the enhanced cytosolic ROS released from dysfunctional mitochondrial [18-20]. Here, we firstly found an induction of hypoxia-inducible factor 1-alpha (*HIF-1 α*) (Fig. 4A, $P < 0.001$) during sepsis. The *HIF-1 α* induction was accompanied to a robust drop in mitochondrial maximal electron transfer system (ETS) capacity (Fig. 4B, $P < 0.001$). Melatonin treatment did not only improve mitochondrial maximal ETS capacity, rising it up to young levels (Fig. 4B, $P < 0.01$), but also totally reduced *HIF-1 α* expression (Fig. 4A, $P < 0.001$). Moreover, a significant reduction in the four respiratory complexes activity, as well as the CI+III and CII+III activities, were observed in aged mice (Fig. 4C–G, $P < 0.001$). Sepsis further reduced these activities, whereas melatonin treatment counteracted the effect of sepsis and, in the case of complex II and complex II+III, also counteracted the effects of age (Fig. 4C–G).

To assess whether mitochondrial impairment during aging and sepsis was followed by a cytosolic oxidative status, changes in the expression and activity of the main cytosolic antioxidant enzymes, were analyzed. Aging and sepsis did not affect superoxide dismutase-1 (SOD1) expression and activity (Fig. 5A). Age and sepsis did not change Glutathione peroxidase (*GPx*) expression, but its activity drops significantly with age ($P < 0.05$), and mainly during sepsis (Fig. 5B, $P < 0.01$). Glutathione reductase (*GRd*) expression increased in aged mice (Fig. 5C, $P < 0.001$) without changes in its activity and both, expression and activity decay in septic aged mice (Fig. 5C). Catalase (CAT) expression and activity, however, did not change with age or sepsis (Fig. 5D). These findings, together with the trend

to gamma glutamyl cysteine synthase (γ GCS) (Fig. 5E, $P < 0.05$) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (*G6PDH*) expression (Fig. 5F, $P < 0.001$) reduction, suggest that cellular ability to recycle glutathione (GSH) is impaired in both aged and septic aged mice. As we expected, melatonin treatment clearly modified the expression and activity of these antioxidant enzymes, increasing SOD1 and GPx activities (Fig. 5A,B, $P < 0.05$), and GRd and catalase expression and activity (Fig. 5C,D). Moreover, melatonin treatment also increased γ GCS ($P < 0.001$), but not *G6PDH* expression (Fig. 5E,F).

We showed previously that melatonin inhibits nuclear NF- κ B transcriptional activity through a *Bmal1/Clock/ROR α /SIRT 1*-dependent pathway [38]. Here, we report a reduction in *ROR α* expression (Fig. 6A, $P < 0.01$) with age, with no changes in its cytosolic and nuclear levels. Sepsis, which induces the expression of *ROR α* (Fig. 6A, $P < 0.01$), did not affect its nuclear translocation. These findings parallel the huge increase in the reverse erythroblastosis virus alpha (*Rev-Erba*) expression with age and sepsis (Fig. 6B, $P < 0.001$). These changes were followed by a reduction of *Bmal1* and *Clock* expression in aged and in septic aged mice (Fig. 6C), which probably depended on raising *Rev-Erba* expression (Fig. 6B). Moreover, nicotinamide phosphoribosyltransferase (*NAMPT*) expression, the rate-limiting enzyme in NAD⁺ biosynthesis, decreased in aged mice ($P < 0.05$), whereas sepsis did not modify the former, despite the elevated NAD⁺ consumption (Fig. 6D, $P < 0.001$). In contrast, the expression and nuclear content of SIRT1, which were unmodified by age, increased with sepsis (Fig. 6E, $P < 0.05$). Melatonin treatment enhanced nuclear translocation of *ROR α* ($P < 0.01$) without changes in its expression (Fig. 6A), and reduced *Rev-Erba* expression (Fig. 6B, $P < 0.001$) to young values. These changes were followed by an increase of *Bmal1* and *Clock* expression (Fig. 6C). Here, the expression of the *NAMPT*, which is under the control of *Bmal1*, also increase with melatonin (Fig. 6D, $P < 0.001$), with a parallel enhanced in NAD⁺ levels (Fig. 6D, $P < 0.001$), the substrate for SIRT1 deacetylase activity. Moreover,

melatonin treatment induced nuclear translocation of PGC-1 α (Fig. 6F), promoting its activation by SIRT1 and subsequent increase in ROR α transcriptional activity.

Besides these alterations observed during the inflammatory process associated with aging and sepsis, the mitochondrial permeability transition (MPT) pore may open as a result of the mitochondrial dysfunction, resulting in cytochrome *c* release that might then trigger apoptosis. Here, we found an enhanced in both, expression and nuclear translocation of the tumor-suppressor protein p53 in aged mice with sepsis (Fig. 7A,B, $P < 0.001$). Furthermore, the Bax/Bcl2 ratio, which rose with age, was significantly enhanced during sepsis (Fig. 7D, $P < 0.01$). These conditions favor the opening of the MPT pore, releasing cytochrome *c* to the cytosol (Fig. 7A,C, $P < 0.05$) and activating caspase-3 (Fig. 7A,E, $P < 0.001$). Melatonin treatment reduced p53 expression ($P < 0.001$), counteracting the effect of sepsis on its nuclear levels (Fig. 7A,B, $P < 0.05$). Similarly, melatonin counteracted the effect of sepsis, but not of age, on the Bax/Bcl2 ratio (Fig. 7D, $P < 0.01$), and cytochrome *c* release (Fig. 7A,C, $P < 0.01$), and the activation and expression of caspase-3 (Fig. 7A,E, $P < 0.01$).

Discussion

The results of this study yield three main novel findings. First, we show that aging and sepsis trigger the same, although with different strengths, innate immune responses and mitochondrial impairment. Second, we demonstrate that the sole NF- κ B-dependent activation does not explain the inflammatory process underlying aging; the former also triggers a complementary innate immune response represented by the NLRP3 inflammasome. The NF- κ B/NLRP3 connection, which we propose that constitutes the basis of inflammaging, is further activated during sepsis, yielding a disproportionate inflammatory response in the heart of aged mice. Thus, the low-grade proinflammatory status associated with aging contributes to the elevated susceptibility of sepsis in aged population [6,7,49]. Third, we reportedly

showed that chronic melatonin treatment absolutely prevented the age-dependent oxidative stress and mitochondrial impairment in multiple organs of mice including the heart [50-53].

Here, however, we show that melatonin administration counteracted the septic response, reducing inflammation, oxidative stress, and mitochondrial function at the levels of non-septic aged mice, but this therapy did not counteract the inflammaging response. These results account for an important duality of melatonin effects, i.e., chronic, low-doses of melatonin prevent inflammaging, whereas acute, high doses of melatonin counteract septic inflammation without affect the basal inflammatory status of aged mice.

Aging and sepsis share similar molecular events but quantitatively different. Inflammaging, a subclinical inflammation during aging, was initially related to a slow activation of the innate immune system [9], represented by the NF- κ B pathway. Moreover, we recently showed that NF- κ B is a link between chronodisruption and NLRP3 inflammasome activation in mouse heart, and the overstimulation of these two innate immune branches explained the deleterious effects of sepsis in young mice [38]. So, we hypothesized that clock genes/NF- κ B/NLRP3 connection should participate in inflammaging, and sepsis will induce a further disproportionately overstimulation of this system, explaining the higher susceptibility of aged patients to sepsis. Moreover, we know that proper dosage of melatonin administration restored the basal innate immune activity in models of senescence-accelerated mice, young septic mice, and radiotherapy-induced mucositis [38,39,52,54,55] but we have no information on the effects and action's mechanisms of melatonin in aged and septic aged mice. We tried to answer these questions analyzing the heart of aged and septic mice treated with melatonin to assess its molecular targets.

It is known that *Clock* and *Bmal1* are under the transcriptional control of ROR α and Rev-Erb α [56], constituting a loop that ultimately regulates the innate immune system through SIRT1 [57]. Thus, we examined whether the clock genes disruption that accompanies the

aging process [58,59], was associated with the enhanced inflammatory response. *Bmal1* expression is negatively regulated by Rev-Erb α [60] and positively regulated by ROR α , controlling the formation of Clock/Bmal1 complex [61]. This complex switches the *NAMPT* gene expression and NAD⁺ synthesis and, ultimately, the NAD⁺-dependent SIRT1 deacetylase activity. In turn, SIRT1 interacts with the Clock/Bmal1 complex closing the clock circuit of SIRT1 control [25]. Here, we found a decrease in both *NAMPT* expression and intracellular NAD⁺ levels, which correlated with the reduction of *Clock* and *Bmal1* gene expression with age. Thus, clock genes disruption caused SIRT1/NAD⁺ dissociation, which impedes SIRT1-dependent p65 subunit inhibition by deacetylation [26], resulting in enhanced NF- κ B transcriptional activity in aged mice here shown. These results reinforce the limiting role of NAD⁺ in SIRT1 deacetylase activity [62]. The consequent enhanced NF- κ B binding to DNA promotes the expression of multiple proinflammatory molecules including iNOS and TNF α , and pro-IL-1 β , which are involved in the pathogenesis of most age-associated diseases [63], and provided feedback amplification of the NF- κ B-dependent signaling pathway.

NF- κ B also induced the expression of *NLRP3*, which requires additional signals to be activated [17] in order to cleavage pro-IL-1 β to IL-1 β in a caspase-1-dependent manner [27,64]. Thus, the activation of NLRP3 inflammasome innate immunity pathways amplifies the inflammatory response of NF- κ B that characterizes the aging process itself. Because no changes in *ASC* expression were detected, we look for other signals involved in NLRP3 inflammasome activation. Emerging evidence suggest that mitochondrial ROS trigger NLRP3 inflammasome activation [19,20], and may explain the inflammaging condition [65]. We found an age-dependent reduction in the respiratory complexes activity, which correlated with a hypoxic state revealed by the *HIF-1 α* expression and the robust drop in mitochondrial maximal electron transfer system (ETS) capacity. These data reflect the relation between mitochondrial dysfunction and energy depletion, a major cause of ROS production in aged

animals [33,66,67]. In fact, aged mice had reduced antioxidative capacity to eliminate superoxide radical and hydrogen peroxide. Even more, the age-dependent reduction of *G6PDH* expression limits the NADPH required for GSH recycling. Together, our data suggest an inefficient ROS removal that may account for NLRP3 inflammasome activation in aged mice. Furthermore, our results support an active apoptotic process in aged mice, showed by the cytosolic increase in both cytochrome *c* and active caspase-3 levels. We also detected a nuclear translocation of p53, which accumulates in cells in response to DNA damage [68], accompanied by an increase in the Bax/Bcl2 ratio. Nuclear translocation of p53 in response to ROS is negatively regulated by SIRT1 deacetylase activity in a NAD⁺-dependent manner [69]. Therefore, the SIRT1/NAD⁺ dissociation found here correlates well with the p53 rise in the nucleus and Bax activation in aged mice [68].

If the clock gene disruption [58,59] is associated with the enhanced inflammatory response here shown in aged mice, sepsis may enhance further chronodisruption, aggravating the immune response. Our findings totally support this hypothesis: with minimal changes in *RORα* expression, sepsis induced a strong expression of *Rev-Erba* that in turn repress *Clock* and *Bmal1*; in these conditions, NAD⁺ levels drop much more than in non-septic aged mice, which impedes SIRT1 deacetylation of NF-κB. Consequently, our data show a huge activation of NF-κB during sepsis in aged compared with young mice elsewhere reported [38]. Subsequent enhanced NF-κB binding to DNA boost proinflammatory cytokines and *NLRP3* expression. Following the mechanisms elsewhere described, the activation of NLRP3 inflammasome during sepsis in aged mice yield further caspase-1 activation and mature IL-1β levels, which were significantly higher than those found in young septic animals [38]. Thus, the age-associated activation of both NF-κB and NLRP3 inflammasome, which underlies the so-called inflammaging, is further amplified during sepsis.

In addition to enhanced NF- κ B activation, the exceeded NLRP3 inflammasome response to sepsis in aged mice should reflect a rise in its activating signals. Here, sepsis reduced even more the NAD⁺ levels in aged mice, probably due to its increased consumption by elevated TNF α and molecular mechanism related to the HIF-1 α increase [70,71], reducing mitochondrial function and ATP production. Moreover, the greater reduction in the activities of GPx and GRd, and γ GCS expression in sepsis compared with non-septic aged mice explains a larger impairment of the GSH cycle and, thus, an enhanced ROS production, overactivating the NLRP3 inflammasome. The apoptotic process found in aged mice is also enhanced in sepsis, where nuclear translocation of p53, cytosolic cytochrome *c* and active caspase-3 levels rise above aged animals. Furthermore, the two-fold increase of TNF α expression in septic mice compared with non-septic aged ones could rise the Bax/Bcl2 ratio, promoting MPT and apoptosis [72]. These results account for multiple events that converge to further activate the intrinsic apoptotic pathway, that may contribute to the high mortality rate during sepsis [3].

Based on our results here reported, we analyzed whether the same schedule of melatonin treatment that is highly effective against sepsis in young animals [38], works also in aged animals. Melatonin binds to and activates ROR α transcriptional activity [73-76], favoring the formation of Clock/Bmal1 complex [61,77]. Melatonin acts as an effective antioxidant to preserve NAD⁺ levels under oxidative stress [78], and indirectly regulates *SIRT1* expression and its targets such as p53 [79]. Here, we demonstrated that melatonin administration counteracted Clock/Bmal1/NF- κ B/SIRT1 loop disruption by sepsis in aged mice, allowing SIRT1 deacetylation and suppression of NF- κ B activation, resulting in loss of its transcriptional activity. Melatonin treatment reduced also the expression and activation of the NLRP3 inflammasome and, consequently, blunts caspase-1 activity and IL-1 β formation. The

Accepted Article

effects of melatonin on NLRP3 inflammasome activity were probably related to reduction of the hyperoxidative status during sepsis, through the stimulation of the expression and activity of the antioxidant enzymes, restoring the GSH homeostasis. Likewise, melatonin enhanced mitochondrial function and inhibited the intrinsic apoptotic pathway. In general, melatonin treatment was enough to absolutely counteract the changes induced by sepsis, but not those related to aging.

Taken together, our results help to understand the mechanisms underlying the inflammaging process, supporting a primary effect of age on clock genes/SIRT1/NF- κ B disruption, a secondary activation of the NF- κ B-dependent immunity, a subsequent mitochondrial impairment and oxidative stress, ending with the activation of the NLRP3 inflammasome and amplifying the inflammatory response of aging. The ultimate goal of these changes here showed in mouse heart is the initiation of apoptosis and loss functional capacity. With these results, a chronoinflammaging theory can be proposed. In addition, the existence of activated NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathways in aged heart means that any signal that further triggers the innate immunity may exacerbate its response much more easily than in younger organ. The other important conclusion is the apparent paradoxical action of melatonin. Although we reported that chronic melatonin treatment prevent absolutely the age-dependent increase in inflammation, ROS, and mitochondrial impairment [50-53,80], here we found that melatonin counteracted the response to sepsis, but not of age. The explanation lies on the schedule of melatonin therapy and it has enormous importance. In fact, we used here an acute, high dose of melatonin, which was enough to counteract sepsis at the same extend as in young animals [38,54,55]. In models of aging we applied chronic, low melatonin dose, which prevented the age-dependent damage. Based on our results, melatonin should be administered in a chronic schedule in order to prevent age, and in acute schedule to counteract severe inflammatory responses. A final consideration is that whether the drop in

melatonin production during aging [81-83] favors the chronoinflammaging process, remains to be clarified.

Acknowledgments

The authors thank to Iryna Rusanova for her technical support. This study was partially supported by grants PI08-1664; PI13-00981, and RD12/0043/0005 from the Instituto de Salud Carlos III (RETICEF, Spain), and P07-CTS-03135 from the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía, Spain). The results of this study constitute part of the H.V.'s doctoral thesis under the Biomedicine Doctorate Program of the University of Granada.

References

1. ZANG QS, WOLF SE, MINEI JP. Sepsis-induced Cardiac Mitochondrial Damage and Potential Therapeutic Interventions in the Elderly. *Aging Dis* 2014; **5**:137-149.
2. STARR ME, SAITO H. Sepsis in old age: review of human and animal studies. *Aging Dis* 2014; **5**:126-136.
3. DE GAUDIO AR, RINALDI S, CHELAZZI C, et al. Pathophysiology of sepsis in the elderly: clinical impact and therapeutic considerations. *Curr Drug Targets* 2009; **10**:60-70.
4. HUNTER JD, DODDI M. Sepsis and the heart. *Br J Anaesth* 2010; **104**:3-11.
5. VINCENT JL, MARSHALL JC, NAMENDYS-SILVA SA, et al. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med* 2014; **2**:380-386.

6. SAITO H, SHERWOOD ER, VARMA TK, et al. Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. *Mech Ageing Dev* 2003; **124**:1047-1058.
7. OPAL SM, GIRARD TD, ELY EW. The immunopathogenesis of sepsis in elderly patients. *Clin Infect Dis* 2005; **41 Suppl 7**:S504-S512.
8. ISKANDER KN, OSUCHOWSKI MF, STEARNS-KUROSAWA DJ, et al. Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiol Rev* 2013; **93**:1247-1288.
9. FRANCESCHI C, BONAFE M, VALENSIN S, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **908**:244-254.
10. BAYLIS D, BARTLETT DB, PATEL HP, et al. Understanding how we age: insights into inflammaging. *Longev Healthspan* 2013; **2**:8-
11. HYDE SR, STITH RD, MCCALLUM RE. Mortality and bacteriology of sepsis following cecal ligation and puncture in aged mice. *Infect Immun* 1990; **58**:619-624.
12. COHEN J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; **420**:885-891.
13. PAHL HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; **18**:6853-6866.
14. SALMINEN A, HUUSKONEN J, OJALA J, et al. Activation of innate immunity system during aging: NF-kB signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Res Rev* 2008; **7**:83-105.

15. ZHANG G, LI J, PURKAYASTHA S, et al. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH. *Nature* 2013; **497**:211-216.
16. LIU SF, MALIK AB. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; **290**:L622-L645.
17. BAUERNFEIND FG, HORVATH G, STUTZ A, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 2009; **183**:787-791.
18. SCHRODER K, ZHOU R, TSCHOPP J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science* 2010; **327**:296-300.
19. TSCHOPP J. Mitochondria: Sovereign of inflammation? *Eur J Immunol* 2011; **41**:1196-1202.
20. ZHOU R, YAZDI AS, MENU P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011; **469**:221-225.
21. SALMINEN A, KAARNIRANTA K, KAUPPINEN A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging (Albany NY)* 2012; **4**:166-175.
22. GREEN DR, GALLUZZI L, KROEMER G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 2011; **333**:1109-1112.
23. AKASHI M, TAKUMI T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol* 2005; **12**:441-448.

24. CRUMBLEY C, WANG Y, KOJETIN DJ, et al. Characterization of the core mammalian clock component, NPAS2, as a REV-ERB α /ROR α target gene. *J Biol Chem* 2010; **285**:35386-35392.
25. NAKAHATA Y, KALUZOVA M, GRIMALDI B, et al. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* 2008; **134**:329-340.
26. YEUNG F, HOBERG JE, RAMSEY CS, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 2004; **23**:2369-2380.
27. ESCAMES G, LOPEZ LC, GARCIA JA, et al. Mitochondrial DNA and inflammatory diseases. *Hum Genet* 2012; **131**:161-173.
28. GALLEY HF. Bench-to-bedside review: Targeting antioxidants to mitochondria in sepsis. *Crit Care* 2010; **14**:230-
29. GALANO A, TAN DX, REITER RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res* 2013; **54**:245-257.
30. MANCHESTER LC, COTO-MONTES A, BOGA JA, et al. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *J Pineal Res* 2015;
31. ZHANG HM, ZHANG Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res* 2014; **57**:131-146.
32. LOPEZ A, GARCIA JA, ESCAMES G, et al. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res* 2009; **46**:188-198.

33. ACUNA CD, LOPEZ LC, ESCAMES G, et al. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem* 2011; **11**:221-240.
34. MARTIN M, MACIAS M, ESCAMES G, et al. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 2000; **14**:1677-1679.
35. CRESPO E, MACIAS M, POZO D, 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**:1537-1546.
36. ESCAMES G, LOPEZ LC, TAPIAS V, et al. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res* 2006; **40**:71-78.
37. TAN DX, MANCHESTER LC, BURKHARDT S, et al. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* 2001; **15**:2294-2296.
38. GARCÍA JA, VOLT H, VENEGAS C, et al. Disruption of the NF-kappaB/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor-alpha and blocks the septic response in mice. *FASEB J* 2015; **29**:3863-3875.
39. ORTIZ F, ACUÑA-CASTROVIEJO D, DOERRIER C, et al. Melatonin blunts the mitochondrial/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis. *J Pineal Res* 2015; **58**:34-49.
40. RITTIRSCH D, HUBER-LANG MS, FLIERL MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* 2009; **4**:31-36.

41. JASKOT RH, CHARLET EG, GROSE EC, et al. An automated analysis of glutathione peroxidase, S-transferase, and reductase activity in animal tissue. *J Anal Toxicol* 1983; **7**:86-88.
42. MISRA HP, FRIDOVICH I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; **247**:3170-3175.
43. AEBI H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; **105**:121-126.
44. BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**:248-254.
45. PESTA D, GNAIGER E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol* 2012; **810**:25-58.
46. BIRCH-MACHIN MA, BRIGGS HL, SABORIDO AA, et al. An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria. *Biochem Med Metab Biol* 1994; **51**:35-42.
47. KOBZIK L, STRINGER B, BALLIGAND JL, et al. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **211**:375-381.
48. KIRBY DM, THORBURN DR, TURNBULL DM, et al. Biochemical assays of respiratory chain complex activity. *Methods Cell Biol* 2007; **80**:93-119.
49. KALE SS, YENDE S. Effects of Aging on Inflammation and Hemostasis through the Continuum of Critical Illness. *Aging Dis* 2011; **2**:501-511.

50. ACUÑA-CASTROVIEJO D, CARRETERO M, DOERRIER C, et al. Melatonin protects lung mitochondria from aging. *Age (Dordr)* 2012; **34**:681-692.
51. CARRETERO M, ESCAMES G, LOPEZ LC, et al. Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging. *J Pineal Res* 2009; **47**:192-200.
52. RODRÍGUEZ MI, CARRETERO M, ESCAMES G, et al. Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radic Res* 2007; **41**:15-24.
53. RODRÍGUEZ MI, ESCAMES G, LOPEZ LC, et al. Melatonin administration prevents cardiac and diaphragmatic mitochondrial oxidative damage in senescence-accelerated mice. *J Endocrinol* 2007; **194**:637-643.
54. ESCAMES G, LOPEZ LC, ORTIZ F, et al. Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J* 2007; **274**:2135-2147.
55. ORTIZ F, GARCIA JA, ACUNA-CASTROVIEJO D, 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.
56. UEDA HR, HAYASHI S, CHEN W, et al. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet* 2005; **37**:187-192.
57. KONG S, MCBURNEY MW, FANG D. Sirtuin 1 in immune regulation and autoimmunity. *Immunol Cell Biol* 2012; **90**:6-13.
58. DUBROVSKY YV, SAMSA WE, KONDRATOV RV. Deficiency of circadian protein CLOCK reduces lifespan and increases age-related cataract development in mice. *Aging (Albany NY)* 2010; **2**:936-944.

59. KONDRATOV RV, KONDRATOVA AA, GORBACHEVA VY, et al. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev* 2006; **20**:1868-1873.
60. PREITNER N, DAMIOLA F, LOPEZ-MOLINA L, et al. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 2002; **110**:251-260.
61. SATO TK, PANDA S, MIRAGLIA LJ, et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 2004; **43**:527-537.
62. DONMEZ G, GUARENTE L. Aging and disease: connections to sirtuins. *Aging Cell* 2010; **9**:285-290.
63. DE MM, FRANCESCHI C, MONTI D, et al. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. *Exp Mol Pathol* 2006; **80**:219-227.
64. LATZ E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr Opin Immunol* 2010; **22**:28-33.
65. CANNIZZO ES, CLEMENT CC, SAHU R, et al. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. *J Proteomics* 2011; **74**:2313-2323.
66. BASHA PM, POOJARY A. Mitochondrial dysfunction in aging rat brain regions upon chlorpyrifos toxicity and cold stress: an interactive study. *Cell Mol Neurobiol* 2014; **34**:737-756.
67. CHAN DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 2006; **125**:1241-1252.

68. GREEN DR, KROEMER G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 2009; **458**:1127-1130.
69. HAN MK, SONG EK, GUO Y, et al. SIRT1 regulates apoptosis and Nanog expression in mouse embryonic stem cells by controlling p53 subcellular localization. *Cell Stem Cell* 2008; **2**:241-251.
70. GOMES AP, PRICE NL, LING AJ, et al. Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell* 2013; **155**:1624-1638.
71. YOSHINO J, MILLS KF, YOON MJ, et al. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab* 2011; **14**:528-536.
72. KIM BC, KIM HT, MAMURA M, et al. Tumor necrosis factor induces apoptosis in hepatoma cells by increasing Ca(2+) release from the endoplasmic reticulum and suppressing Bcl-2 expression. *J Biol Chem* 2002; **277**:31381-31389.
73. ACUÑA-CASTROVIEJO D, REITER RJ, MENENDEZ-PELAEZ A, et al. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res* 1994; **16**:100-112.
74. CARLBERG C, WIESENBERG I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J Pineal Res* 1995; **18**:171-178.
75. WIESENBERG I, MISSBACH M, KAHLEN JP, et al. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res* 1995; **23**:327-333.

76. WIESENBERG I, MISSBACH M, CARLBERG C. The potential role of the transcription factor RZR/ROR as a mediator of nuclear melatonin signaling. *Restor Neurol Neurosci* 1998; **12**:143-150.
77. VRIEND J, REITER RJ. Melatonin feedback on clock genes: a theory involving the proteasome. *J Pineal Res* 2015; **58**:1-11.
78. TAN DX, MANCHESTER LC, SAINZ RM, et al. Interactions between melatonin and nicotinamide nucleotide: NADH preservation in cells and in cell-free systems by melatonin. *J Pineal Res* 2005; **39**:185-194.
79. TAJES M, GUTIERREZ-CUESTA J, ORTUNO-SAHAGUN D, et al. Anti-aging properties of melatonin in an in vitro murine senescence model: involvement of the sirtuin 1 pathway. *J Pineal Res* 2009; **47**:228-237.
80. RODRÍGUEZ MI, ESCAMES G, LOPEZ LC, et al. Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 2007; **42**:272-279.
81. REITER RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991; **79**:C153-C158.
82. WALDHAUSER F, STEGER H. Changes in melatonin secretion with age and pubescence. *J Neural Transm Suppl* 1986; **21**:183-197.
83. WALDHAUSER F, WEISZENBACHER G, TATZER E, et al. Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; **66**:648-652.

Figure legends

Fig. 1. Study design diagram. Sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP) in mice anesthetized with equithensin (1 mL/kg, ip), at time zero (0 h). Mice received a total dose of 90 mg/kg bw melatonin divided in three doses (30 mg/kg bw each, dissolved in 0.3 mL of 0.25% ethanol:saline) as follows: one dose 30 min before CLP (ip); the second dose just after surgery (sc), and the third dose at 4 h after CLP (c). All mice underwent surgery at the same time of day to avoid diurnal variations on the immune response and were sacrificed 8 hours after induction of sepsis.

Fig. 2. Effects of aging, sepsis, and melatonin treatment on NLRP3 inflammasome pathway. (A) Representative western blot of NLRP3, pro-caspase-1, cleaved caspase-1 p20, and ASC. (B) mRNA levels (qRT-PCR) and cytosolic protein content (western blot) of NLRP3. (C) Analysis of mRNA levels and cytosolic protein content of pro-caspase-1 and cleaved caspase-1 p20. (D) ASC mRNA and cytosolic protein levels. Experiments were performed in hearts of 3 (CY) and 18 month old male mice, and in 18 month old septic male mice with (S8M) or without (S8) melatonin treatment. Data are expressed as means \pm SEM of 4-6 independent experiments quantified in duplicate; $n = 7$ per group. AU, arbitrary units; dR, densitometry relative. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus CY; ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ versus C; ++ $P < 0.01$ versus S8.

Fig. 3. Effects of aging, sepsis, and melatonin treatment on NF- κ B-dependent inflammatory pathway. (A). Nuclear levels and DNA-binding activity of NF- κ B p65 were determined *in vitro* by western blot and ELISA, respectively. (B) Analysis of mRNA levels of *IL-1 β* (qRT-PCR) and cytosolic protein levels of pro-IL-1 β , and mature IL-1 β (western blot). (C) mRNA expression and cytosolic protein levels of TNF α . (D) Cytosolic protein levels of iNOS. (E) Analysis of mRNA and cytosolic and nuclear protein levels of I κ B α . Data are expressed as

means \pm SEM of 5-7 independent experiments quantified in duplicate; $n = 7$ per group. Other information as in Fig. 2. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus CY; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ versus C; ++ $P < 0.01$ and +++ $P < 0.001$ versus S8.

Fig. 4. Effects of aging, sepsis, and melatonin treatment on mitochondrial function. Mitochondrial function was evaluated through *HIF-1 α* gene expression (A), the percentage of mitochondrial maximal electron transfer system (ETS) capacity (B), and the analysis of the mitochondria respiratory chain activities represented by complexes I (C), II (D), III (E), IV (F), I+III and II+III (G). Data are expressed as means \pm SEM of 3-5 independent experiments quantified in duplicate; $n = 6$ per group. Other information as in Fig. 2. *** $P < 0.001$ versus CY; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ versus C; ++ $P < 0.01$ and +++ $P < 0.001$ versus S8.

Fig. 5. Effects of aging, sepsis, and melatonin treatment on cytosolic antioxidant capacity. Changes in cytosolic antioxidant system were determined by the analysis of the gene expression (qRT-PCR) and enzymatic activities of SOD1 (A), GPx (B), GRd (C), and CAT (D). mRNA levels of γ GCS (E) and *G6PDH* (F) are also shown. Data are expressed as means \pm SEM of 4-5 independent experiments quantified in duplicate; $n = 6$ per group. Other information as in Fig. 2. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus CY; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ versus C; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ and +++ $P < 0.001$ versus S8.

Fig. 6. Effects of aging, sepsis, and melatonin treatment on ROR α /clock genes/SIRT1 connection. mRNA expression (qRT-PCR), and cytosolic and nuclear protein content (western blot) for ROR α (A). Analysis of mRNA levels of *Rev-Erba* (B), *Clock* and *Bmall* (C). Analysis of *NAMPT* gene expression and NAD⁺ levels (D). (E) Analysis of gene expression and nuclear protein level of SIRT1. (F) Cytosolic and nuclear protein content (western blot) for PGC-1 α . Data are expressed as means \pm SEM of 5-7 independent experiments quantified in duplicate; $n = 7$ per group. Other information as in Fig. 2. * $P <$

0.05, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus CY; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ versus C; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ and +++ $P < 0.001$ versus S8.

Fig. 7. Effects of aging, sepsis, and melatonin treatment on mitochondrion-dependent apoptotic events. (A) Nuclear and cytosolic fractions from heart were analyzed by western blot using anti-p53, anti-Bax, anti-Bcl2, anti-caspase-3, and anti-cytochrome c antibodies. (B) mRNA levels (qRT-PCR), and nuclear and cytosolic protein content (western blot) of p53. (C) Cytosolic cytochrome c content analyzed by western blot. (D) cytosolic protein content of Bax, Bcl2, and Bax/Bcl2 determined *in vitro* by western blot. (E) Caspase-3 mRNA levels and cytosolic protein content of pro-caspase-3 and active caspase-3. Data are expressed as means \pm SEM of 4-5 independent experiments quantified in duplicate; $n = 6$ per group. Other information as in Fig. 2. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus CY; ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ versus C; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ and +++ $P < 0.001$ versus S8.

