



VNIVERSITAT
D'VALÈNCIA

USO DE LAS HISTONAS CIRCULANTES Y SUS
MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES COMO
BIOMARCADORES EN SEPSIS Y SHOCK SÉPTICO

Tesis Doctoral de
JESÚS BELTRÁN GARCÍA

Dirigida por
Dr. JOSÉ LUIS GARCÍA GIMÉNEZ
Prof. FEDERICO V. PALLARDÓ CALATAYUD

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLOGÍA

ENERO 2022



PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLOGIA

Uso de las histonas circulantes y sus
modificaciones post-traduccionales
como biomarcadores en sepsis y
shock séptico.

Tesis Doctoral

Presentada por:

Jesús Beltrán García

Dirigida por:

Dr. José Luis García Giménez

Dr. Federico V. Pallardó Calatayud

Tutor:

Dr. Federico V. Pallardó Calatayud

Valencia, 20 de enero de 2022

D. Federico V. Pallardó Calatayud, Catedrático del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València. Correo electrónico: federico.v.pallardo@uv.es

D. José Luís García Giménez, Investigador Post-doctoral CIBER consorciado al Dpto. de Fisiología de la Universitat de València. Correo electrónico: j.luis.garcia@uv.es

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada “Uso de las histonas circulantes y sus modificaciones post-traduccionales como biomarcadores en sepsis y shock séptico”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D. Jesús Beltrán García, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 6 de noviembre de 2021.

**FEDERICO
VICENTE|
PALLARDO|
CALATAYUD**

Fdo. Federico V. Pallardó Calatayud

Firmado digitalmente
por FEDERICO
VICENTE|PALLARDO|
CALATAYUD
Fecha: 2021.11.05
16:47:46 +01'00'

**GARCIA
GIMENEZ JOSE
LUIS -
20441299A**

Fdo. José Luis García Giménez

Firmado digitalmente
por GARCIA GIMENEZ
JOSE LUIS - 20441299A
Fecha: 2021.11.05
16:16:56 +01'00'

Para la realización de esta tesis doctoral, el investigador Jesús Beltrán García ha disfrutado de una ayuda para la Formación de Investigadores en Ciencias y Tecnologías de la salud (iPFIS), del Instituto de Salud Carlos III, co-financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España y por la Unión Europea.

El trabajo se ha llevado a cabo en el grupo “Epigenética Translacional y Epigenómica”, en la unidad U733 del CIBERER de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Como resultado de la tesis realizada se han publicado un total de 14 publicaciones actualmente (Anexos 1 y 2) y 2 capítulos en libros internacionales editados por Elsevier (Anexo 3). Se espera que el trabajo realizado durante esta tesis doctoral acabe reportando un total de más de 20 publicaciones científicas en revistas de prestigio internacional, y 4 capítulos de libro. Así mismo, los resultados generados durante esta tesis doctoral se han presentado en 9 congresos científicos internacionales, y se han obtenido diversos premios y becas internacionales, como el premio de la Sociedad Europea de Biología Molecular (EMBO).

ÍNDICE

TABLA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN/ABSTRACT.....	1
Resumen	3
Abstract.....	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Sepsis y shock séptico	8
1.2 El sistema inmune en el contexto de la sepsis	12
1.3 Inflamasoma y sepsis.....	15
1.4 Papel del endotelio en la sepsis.....	20
1.5 Histonas extracelulares y sus modificaciones post-traduccionales	24
1.6 Epigenética y sepsis. Papel de la metilación del ADN en el contexto de la sepsis	26
2. HIPÓTESIS.....	37
3. OBJETIVOS.....	41
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
4.1. Cultivo celular.....	47
4.2. Selección de pacientes y controles	48
4.2.1. Diseño del estudio	48
4.2.2. Comité ético	48

4.3 Preparación del ácido hidroxámico suberoilanolida (SAHA).....	49
4.4 Purificación de las histonas nativas e hiperacetiladas de las células HeLa.....	49
4.5 Cuantificación de los extractos proteicos mediante el método de Bradford.	51
4.6 Análisis de los niveles de expresión proteica mediante Western Blot	52
4.7 Evaluación de la viabilidad celular de las células HUVEC tras la exposición a diferentes concentraciones de histonas nativas e histonas hiperacetiladas.....	55
4.7.1. Microscopía de campo claro	55
4.7.2. Citometría de flujo.....	56
4.8 Extracción y purificación de ARN de células en cultivo	57
4.9. Análisis de la expresión génica mediante RT q-PCR.	59
4.10. Extracción de ADN de PBMCs humanas.....	61
4.11. Extracción de proteínas	61
4.12. Análisis de los niveles de carbonilación de proteínas mediante inmunodetección... 	62
4.13. Evaluación de la expresión del inflamasoma mediante la medición de los niveles catalíticos de Caspasa-1.....	64
4.14. Evaluación del efecto del Inhibidor MCC950 sobre la viabilidad celular mediante MTT	65
4.15. Medición de los niveles circulantes de histonas por espectrometría de masas	66
4.15.1 Preparación de la muestra	66
4.15.2 Análisis de las histonas circulantes por espectrometría de masas	67
4.16. Análisis de los niveles de Caspasa-1 circulante presente en el plasma de los pacientes	68
4.17. Análisis de los niveles de IL-18 circulante presente en el plasma de los pacientes ...	69

4.18. Análisis de los niveles de diferentes citoquinas circulantes presentes en el plasma de los pacientes.....	71
4.18.1. Preparación de las muestras:	71
4.18.2. Protocolo experimental	71
4.19. Análisis de los niveles de circulantes de IL-18, IL-27, S100A8 y S100A9 mediante ELISA.....	73
4.19.1. Procedimiento seguido para analizar los niveles de IL-18.....	73
4.19.2. Procedimiento seguido para analizar los niveles de IL-27.....	75
4.19.3. Procedimiento seguido para analizar los niveles de S100A8 y S100A9.....	76
4.20. Análisis global de la metilación del ADN mediante Arrays EPIC 850 K	77
2.20.1. Preparación de los arrays 850K y lectura en un sistema HiScan SQ (Illumina)	77
4.20.2. Análisis de la metilación diferencial.....	78
4.21. Validación de la metilación de genes candidatos por pirosecuenciación.....	79
4.22. Análisis estadístico	81
5. Resultados.....	83
5.1 Inducción de hiperacetilación en histonas humanas	85
5.2 Las histonas extracelulares humanas inducen alteraciones en los patrones de muerte, adhesión y agregación celular en HUVEC.....	86
5.3 Las histonas extracelulares humanas inducen muerte celular a través de mecanismos de apoptosis y piroptosis en HUVEC.....	87
5.4 Caracterización de la piroptosis y sus productos.	89
5.5 Las histonas extracelulares inducen estrés oxidativo, mediando despolarización de la membrana plasmática y alterando la respuesta enzimática antioxidant en HUVEC.....	90
5.6 Las histonas extracelulares afectan las vías de biosíntesis de prostanoïdes en HUVEC	93

5.7 Las histonas extracelulares modifican los patrones de expresión de las moléculas de adhesión endotelial e inducen respuestas inflamatorias.....	96
5.8 La inhibición del inflamasoma previene los efectos posteriores mediados por histonas extracelulares en HUVEC	97
5.9 La piroptosis está activada en pacientes con shock séptico.....	100
5.10 Las proporciones de células inmunes son diferentes entre pacientes críticamente enfermos, pacientes con sepsis y shock séptico	104
5.11 Aumento de las interleuquinas piroptóticas en pacientes con sepsis y shock séptico.	105
5.12 La inmunidad innata está sobreactivada en pacientes con shock séptico en las primeras etapas del episodio séptico	106
5.13 Las citoquinas quimiotácticas se sobreexpresan en el plasma de pacientes con shock séptico, lo que altera la respuesta inmune mediada por endotelio.....	108
5.14 La respuesta inmune adaptativa no es completamente funcional en las primeras horas del desarrollo del shock séptico.....	110
5.15 Los inmunomoduladores están fuertemente sobreexpresados en pacientes con shock séptico.....	112
5.16 Correlaciones entre diferentes citoquinas y mediadores inmunes.....	113
5.17 Los leucocitos de los pacientes sépticos poseen perfiles de metilación del ADN alterados.....	118
5.18 La disfunción orgánica y los niveles de lactato se asocian con cambios en la metilación del ADN	120
5.19 Implicaciones funcionales y biológicas de los cambios de metilación del ADN que ocurren en pacientes con sepsis y shock séptico	123
5.20 La hipometilación y la hipermetilación se producen en DMR en el proceso de SS... 127	

5.21 Validación de los patrones de metilación del ADN por pirosecuenciación en pacientes críticos de UCI, sepsis, y SS.....	133
6. DISCUSIÓN.....	135
6.1. Contexto actual de la sepsis. Histonas circulantes (y piroptosis) como mediadores clave de daño durante la sepsis.....	137
6.2. Papel del endotelio en el contexto de la sepsis	140
6.3. Papel de la acetilación como modificación post-traduccional de histonas	142
6.4. El sistema inmune durante la fisiopatología de la sepsis	143
6.5. Metilación del ADN como modulador de la respuesta inmune y la inmunosupresión durante la sepsis	148
7. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	155
7.1. CONCLUSIONES	157
7.2. CONCLUSIONS	158
8. SUMMARY.....	159
8.1. INTRODUCTION	161
8.1.1 Sepsis and septic shock.....	161
8.1.2 The immune system in the context of sepsis	163
8.1.3 Inflamasome and sepsis.....	165
8.1.4 Role of the endothelium in sepsis.....	168
8.1.5 Extracellular histones and their post-translational modifications	170
8.1.6 Epigenetics and sepsis. Role of DNA methylation in the context of sepsis.....	172
8.2. HYPOTHESIS	178

8.3. OBJECTIVES.....	178
8.4. MATERIALS AND METHODS	179
8.4.1. Cell culture	179
8.4.2. Selection of patients and controls	180
8.4.2.1. Study design	180
8.4.2.2. Ethics committee	180
8.4.3. Preparation of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA).	181
8.4.4. Purification of native and hyperacetylated histones from HeLa cells	181
8.4.5. Quantification of protein extracts using the Bradford method.....	181
4.6. Analysis of protein expression levels by Western Blot	182
8.4.7. Evaluation of the cell viability of HUVEC cells after exposure to different concentrations of native histones and hyperacetylated histones	182
8.4.7.1. Bright field microscopy	182
8.4.7.2. Flow cytometry.....	183
8.4.8 Extraction and purification of RNA from cells in culture.....	184
8.4.9. Extraction and purification of circulating RNA from human plasma	184
8. 4.10. Analysis of gene expression by RT q-PCR	185
8.4.11. DNA extraction from human PBMCs.....	186
8.4.12. Protein extraction.....	186
8.4.13. Analysis of protein carbonylation levels by immunodetection.....	187
8.4.14. Evaluation of the expression of the inflammasome by measuring the catalytic levels of Caspase-1	187

8.4.15. Evaluation of the effect of Inhibitor MCC950 on cell viability by MTT	188
8.4.16. Measurement of circulating histone levels by mass spectrometry	189
8.4.16.1. Sample preparation	189
8.4.16.2. Analysis of circulating histones by mass spectrometry.....	189
8.4.17. Analysis of the levels of circulating Caspase-1 present in the plasma of the patients	190
8.4.18. Analysis of the levels of circulating IL-18 present in the plasma of the patients..	190
8.4.19. Analysis of the levels of different circulating cytokines present in the plasma of patients	190
8.4.20. Analysis of circulating levels of IL-18, IL-27, S100A8 and S100A9 by ELISA	190
8.4.21. Global analysis of DNA methylation using EPIC 850 K Arrays	191
8.2.21.1. Preparation of 850K arrays and reading on a HiScan SQ (Illumina) system	191
8.4.21.2. Differential methylation analysis.....	191
8.4.22. Validation of candidate gene methylation by pyrosequencing.....	193
8.4.23. Statistical analysis.....	193
8.5. RESULTS.....	194
8.5.1. Induction of hyperacetylation in human histones	194
8.5.2. Human extracellular histones induce alterations in cell death, adhesion and aggregation patterns in HUVEC	195
8.5.3. Human extracellular histones induce cell death through apoptosis and pyroptosis mechanisms in HUVEC.....	195
8.5.4. Characterization of pyroptosis and its products.	196

8.5.5. Extracellular histones induce oxidative stress, mediating plasma membrane depolarization and altering the antioxidant enzymatic response in HUVEC.....	197
8.5.6. Extracellular Histones Affect Prostanoid Biosynthesis Pathways in HUVEC.....	198
8.5.7. Extracellular histones modify the expression patterns of endothelial adhesion molecules and induce inflammatory responses	199
8.5.8. Inhibition of the inflammasome prevents after-effects mediated by extracellular histones in HUVEC.....	200
8.5.9. Piroptosis is activated in patients with septic shock.....	201
8.5.10. The proportions of immune cells are different between critically ill patients, patients with sepsis and septic shock.....	203
8.5.11. Increased pyroptotic interleukins in patients with sepsis and septic shock.....	203
8.5.12. Innate immunity is over-activated in patients with septic shock in the early stages of the septic episode	204
8.5.13. Chemotactic cytokines are overexpressed in the plasma of patients with septic shock, altering the endothelium-mediated immune response	205
8.5.14. The adaptive immune response is not fully functional in the early hours of the development of septic shock.....	207
8.5.15. Immunomodulators are strongly overexpressed in patients with septic shock ...	208
8.5.16. Correlations between different cytokines and immune mediators.....	208
8.5.17. Leukocytes from septic patients have altered DNA methylation profiles	210
8.5.18. Organ dysfunction and lactate levels are associated with changes in DNA methylation.....	211
8.5.19. Functional and biological implications of DNA methylation changes that occur in patients with sepsis and septic shock.....	212
8.5.20. Hypomethylation and hypermethylation occur in DMR in the SS process	213

8.5.21. Validation of DNA methylation patterns by pyrosequencing in critical ICU, sepsis, and SS patients.....	214
8.6. DISCUSSION.....	215
 8.6.1. Current context of sepsis. Circulating Histones (and Pyroptosis) as key mediators of damage during Sepsis.....	215
 8.6.1. Role of the endothelium in the context of sepsis	218
 8.6.3. Role of acetylation as a post-translational modification of histones	220
 8.6.4. The immune system during the pathophysiology of sepsis	221
 8.6.5. DNA methylation as a modulator of the immune response and immunosuppression during sepsis.....	225
9. REFERENCIAS.....	231
10. ANEXOS	267
 ANEXO 1: Trabajos publicados como primer autor durante la Tesis Doctoral	269
 ANEXO 2: Trabajos publicados en colaboraciones durante la Tesis Doctoral	276
 ANEXO 3: Capítulos de libro publicados durante la Tesis Doctoral.....	281

TABLA DE ABREVIATURAS

Tesis Doctoral Jesús Beltrán-García

Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA
Ácido hidroxámico suberoilnilida	SAHA
Albúmina de suero bovino	BSA
Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol	DiBAC
Caspasa	CSP
Células endoteliales primarias de venas umbilicales humanas	HUVECs
Células mononucleares de sangre periférica	PBMCs
Células supresoras derivadas de células mieloides	MDSC
Células T reguladoras	Tregs
Ciclooxygenasa	COX
Coagulación intravascular diseminada	DIC
Dimetilsulfóxido	DMSO
Ditiotreitol	DTT
Dominio de pirina	PYD
Dominio de reclutamiento de activación de caspasa	CARD
Energía de colisión	CE
Enfermedad crítica crónica	ECC
Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos	GM-CSF
Fosfatidilserina	PS
Gasdermina	GSDM
Gel de poliacrilamida con docecilsulfato sódico	SDS-PAGE
H3 citrulinada	H3cit
ICAM-1 soluble	sICAM
Inhibidores de las histonas desacetilasas	HDACis
Inteferon	IFN
Interleuquina	IL
Ioduro de propidio	IP
Lipopolisacárido	LPS
Modificaciones post-traduccionales	MPTs
Molécula de adhesión celular vascular-1	VCAM-1
Molécula de adhesión intercelular	ICAM
Monitoreo de reacción multiple	MRM
Patrones moleculares asociados a dañ	DAMPs

Patrones moleculares asociados a patógenos	PAMPs
Potencial de reducción de potencia	DP
Procalcitonina	PCT
Proteína 10 inducible por interferón- γ	IP-10
Proteína 3 que contiene repeticiones ricas en leucina del dominio de unión a nucleótidos	NLRP3
Proteína C reactiva	PCR
Proteína inflamatoria de macrófagos 1	MIP-1
Proteína quimioatrayente de monocitos-1	MCP-1
Proteína tipo mota asociada a la apoptosis que contiene una CARD	ASC
Puntuación secuencial de evaluación de la insuficiencia orgánica	SOFA
Receptor tipo NOD	NLR
Receptor tipo Toll	TLR
Región con metilación diferencial	DMR
Repetición rica en leucina	LRR
Sal soluble de tetrazolio	MTT
Selectina	SEL
Shock séptico	SS
Síndrome de disfunción multiorgánica	MODS
Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión	PICS
Síndrome de respuesta compensatoria antiinflamatoria	CARS
SOFA rápido	qSOFA
Tetrametiletilendiamina	TEMED
Trampas extracelulares de neutrófilos	NETs
Trampas intracelulares inducidas por poros	PITs
Tricostatina A	TSA
Unidad de Cuidados Intensivos	UCI
Western Blot	WB

RESUMEN/ABSTRACT

Resumen

La sepsis es una afección potencialmente mortal causada por una respuesta anormal del huésped a una infección, produciendo respuestas fisiológicas alteradas que dañan los propios tejidos del paciente y pueden provocar disfunción orgánica e incluso la muerte. Asimismo, algunos pacientes sépticos progresan a shock séptico, caracterizado por alteraciones circulatorias, celulares y metabólicas sustanciales que aumentan el riesgo de mortalidad. A pesar de que la sepsis se caracteriza por un mal funcionamiento del sistema inmunológico, lo que a su vez conduce a una respuesta inmune alterada e inmunosupresión, la alta complejidad de la fisiopatología de la sepsis requiere una mayor investigación para comprender las respuestas inmunes que ocurren durante la sepsis. Asimismo, las histonas extracelulares circulantes han ganado relevancia como mediadores citotóxicos en la sepsis, ya que actúan como patrones moleculares asociados a daño, que inducen estrés oxidativo y activan el inflamasoma NLRP3. Estos mecanismos median la activación de la piroptosis, un mecanismo de muerte celular programada que produce inflamación mediante la expresión de IL-18, IL-1 β and IL-1 α . Sin embargo, a pesar de la evidencia de activación del inflamasoma en las células inmunes durante la sepsis, se desconoce si las histonas extracelulares son capaces de activar los inflamasomas endoteliales y sus consecuencias. En este trabajo destacamos el papel previamente desconocido de las histonas extracelulares, mediando la activación del inflamasoma NLRP3 y la piroptosis en las células endoteliales, contribuyendo a la disfunción endotelial y la desregulación de la respuesta inmune mediada por el endotelio. Asimismo, también demostramos cómo la acetilación de histonas disminuye la activación de la piroptosis. Además, demostramos que la piroptosis se produce en pacientes con shock séptico y los niveles de histonas circulantes se correlacionan con la expresión de citoquinas proinflamatorias y citoquinas piroptóticas, la liberación de factores de adhesión endotelial y la gravedad de la enfermedad. Proponemos la piroptosis mediada por histonas como un nuevo objetivo para desarrollar intervenciones clínicas. De manera similar, hemos analizado las respuestas inmunorelacionadas que ocurren durante las primeras etapas de la sepsis con el objetivo de proporcionar nuevos datos comparando las cantidades de citoquinas, inmunomoduladores y otros mediadores endoteliales en pacientes críticamente enfermos no sépticos, sépticos y de shock séptico. Nuestro enfoque ayudará a caracterizar rápidamente las respuestas inmunes alteradas en

pacientes sépticos y de shock séptico ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos. Finalmente analizamos el papel de la metilación del ADN en el control del sistema inmune séptico. Nuestros resultados demostraron el papel central de la metilación del ADN modulando la respuesta molecular en los pacientes de shock séptico y contribuyendo a la inmunosupresión, a través de la alteración de los patrones de metilación de los promotores de IL-10 y TREM-2.

Abstract

Sepsis is a life-threatening condition caused by an abnormal host response to an infection that produce altered physiological responses which damages own tissues of the patient and can result in organ dysfunction and in some cases death. Likewise, a subset of septic patients progresses to septic shock, characterized by substantial circulatory, cellular and metabolic abnormalities, which substantially increase the risk of mortality. Sepsis is characterized by a malfunction of the immune system and it can lead to an altered immune response and immunosuppression. Moreover, the high complexity of the pathophysiology of sepsis requires of further investigation to characterize the immune responses in sepsis and septic shock. Likewise, circulating extracellular histones have gained relevance as cytotoxic mediators in sepsis pathophysiology, since they act as damage-associated molecular patterns, which induce oxidative stress and activate NLRP3 inflammasome. Subsequently, inflammasome mediates pyroptosis activation, a programmed cell death mechanism that produces inflammation through the release of IL-18, IL-1 β and IL-1 α . However, despite inflammasome activation may occur in immune cells during sepsis, it is unknown if this process also takes place in endothelial cells and particularly whether extracellular histones are capable of activating endothelial inflammasomes and their consequences. In this work we highlight a previously unknown role for extracellular histones, that mediates the activation of NLRP3 inflammasome and pyroptosis in endothelial cells by contributing to endothelial dysfunction and the dysregulation of the immune response mediated by endothelium. Likewise, we demonstrated how histone acetylation decreases pyroptosis activation. Furthermore, we show how pyroptosis occurs in septic shock patients and how circulating histone levels correlate with the expression of pro-inflammatory and pyroptotic cytokines, the release of endothelial adhesion factors and septic shock severity. We propose histone-mediated pyroptosis as a new target to develop clinical interventions. Similarly, we have analyzed the immune-related responses occurring during the early stages of sepsis with the aim of providing new data by comparing the amounts of cytokines, immune modulators and other endothelial mediators in critically-ill non-septic patients, septic and septic shock patients. Our approach will help to rapidly characterize the altered immune responses in septic and septic shock patients.

admitted in the Intensive Care Unit. Finally, we also analyzed the role of DNA methylation in the control of septic immune system. Our results demonstrated the central role of DNA methylation modulating the molecular response in septic shock patients and contributing to immunosuppression, through the alteration of DNA methylation patterns of IL-10 and TREM2 promoters.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sepsis y shock séptico

En el tercer y último consenso internacional sobre la sepsis y el choque séptico (en adelante shock séptico (SS)) (Sepsis-3), se definió la sepsis como "una afección potencialmente mortal que surge cuando la respuesta del organismo a la infección daña los propios tejidos del huésped". Asimismo, el SS es "un subconjunto de la sepsis en el que las anomalías circulatorias, celulares y metabólicas particularmente profundas se asocian con un mayor riesgo de mortalidad que la sepsis" (1).

Las pautas actuales para el manejo de la sepsis indican el uso de antibióticos lo antes posible, acompañado de reanimación con líquidos, uso de vasopresores y, si es necesario, terapia de apoyo para la insuficiencia orgánica, que depende de la etapa de la enfermedad (2). Actualmente, la puntuación secuencial de evaluación de la insuficiencia orgánica (SOFA, “Sequential Organ Failure Assessment”), es una herramienta clínica que permite evaluar el grado de afectación orgánica en pacientes que están críticamente enfermos con sospecha de infección (2). No obstante, las herramientas de identificación como el SOFA parecen tener diferentes indicaciones según el país donde se asigna el paciente. En este sentido, se ha validado el SOFA rápido (qSOFA) para identificar a los pacientes adultos con probabilidad de tener mal pronóstico, especialmente en el entorno de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) hospitalaria (1,3,4). El qSOFA se diferencia principalmente del SOFA en la rapidez con la que se pueden identificar pacientes graves con un elevado riesgo, lo cual resulta muy útil en patologías como la sepsis. Sin embargo, aunque el qSOFA es altamente específico para seleccionar pacientes graves, no es diagnóstico de sepsis, ya que es preciso calcular el SOFA para confirmar la disfunción orgánica. En este sentido, la discriminación por mortalidad hospitalaria es superior cuanto mayor es la puntuación SOFA (1,5). No obstante, la escala SOFA por sí misma no es una herramienta para el diagnóstico temprano de la sepsis, y menos todavía para identificar pacientes con SS ni tampoco para predecir la evolución clínica de los pacientes críticos. La aparición de nuevos métodos que mejoren la identificación temprana de la sepsis puede brindar oportunidades para reducir, no solo la progresión a estados de más gravedad de la enfermedad y las muertes en la etapa hiperinflamatoria temprana o en el seguimiento a medio plazo (generalmente secundario a infecciones nosocomiales), sino también para evitar futuras morbilidades en los supervivientes, o al

menos contribuir a la mejora de su seguimiento clínico en los siguientes meses o años al episodio séptico (6–8).

A pesar de los avances en vacunas, antibióticos y las mejoras en la atención y los tratamientos aplicados en UCI, la sepsis presenta una incidencia mundial de 48 millones de casos al año y sigue siendo la principal causa de muerte por infección, estimada en más de 11 millones de muertes anuales en todo el mundo, de los cuales casi 3 millones son recién nacidos (9,10). Además, la sepsis es la causa más frecuente de muerte en la mayoría de las UCI (11). De hecho, la sepsis mata a más individuos anualmente que el cáncer de próstata, el cáncer de mama y el VIH conjuntamente, representando una de las mayores causas de muerte del mundo (12). No obstante, lo más preocupante es que el número de nuevos casos sigue incrementándose cada año a causa de la mayor esperanza de vida, el inapropiado o excesivo uso de los antibióticos (aparición de bacterias superresistentes) y el estilo de vida actual, entre otros factores (13).

En términos económicos, la sepsis cuesta mas de 24 mil millones de dólares solo en los Estados Unidos (14,15) y en Europa el coste de la sepsis está alrededor de los 7.600 millones de euros (6). Además del elevado coste económico asociado, la sepsis compromete la calidad de vida de los pacientes supervivientes ya que quedan con secuelas post-sepsis, incluyendo la inmunosupresión, el deterioro cognitivo, la depresión y el trastorno de estrés postraumático (16,17). En este sentido, los supervivientes de un episodio de sepsis pueden sufrir inmunosupresión a corto plazo con un mayor riesgo de sucumbir a las infecciones perpetradas por patógenos oportunistas, que en un estado normal serían adecuadamente controlados por un sistema inmune adecuado (18). De hecho, alrededor del 40% de los pacientes son rehospitalizados dentro de los 90 días posteriores al episodio de sepsis. Además, en comparación con los pacientes hospitalizados por otros diagnósticos, aquellos que sobreviven a la sepsis tienen un mayor riesgo de infección recurrente, insuficiencia renal aguda y nuevos eventos cardiovasculares en comparación con los pacientes de otras patologías (19). Además, en el paciente séptico también puede ocurrir una inmunosupresión a largo plazo que se manifiesta en los pacientes como una reducción significativa en la supervivencia entre los 5 y 8 años para los pacientes que han sufrido una sepsis en comparación con la población no afectada de la misma edad (20,21).

El reconocimiento temprano de la sepsis, la administración rápida de antibióticos apropiados y el tratamiento urgente de acuerdo con las directrices desarrolladas localmente pueden reducir significativamente las muertes por sepsis (22). Sin embargo, el diagnóstico de la sepsis no es fácil, ya que produce en el paciente una amplia variedad de alteraciones fisiopatológicas, (Figura 1) a veces simultáneas, que conducen a una diversidad de defectos fisiológicos funcionales, disfunción celular y deficiencias en la función normal de los órganos y tejidos. Algunas de estas complicaciones pueden conllevar desde un fallo en el endotelio, que cause alteraciones en la microcirculación y complicaciones como la aparición de trombos (23), hasta problemas renales (24) o hepáticos (25) (Figura 1). Uno de los principales problemas para el diagnóstico de la sepsis, es el tiempo (entre 6 y 48 horas) que demora un cultivo convencional en diferenciar el organismo causante de la infección (bacterias, virus u hongos), así como en un 30% de los casos, estas pruebas dan como resultado un falso negativo, el cual puede estar causado por el tipo de fármacos administrados al paciente antes de la prueba (26). Debido a que técnicas moleculares como la PCR son capaces de detectar ADN bacteriano, incluso cuando la bacteria ha sido eliminada (27), y que el tiempo que necesitan para la detección del microorganismo se reduce, métodos de diagnóstico como el SeptiFastTM están ganando relevancia. Las probabilidades de que al menos un microorganismo sea aislado en menos de 6 horas, aumentan hasta 13 veces en comparación con métodos de cultivo tradicionales (13.5; 95% CI, 5.05–36.06) (28). Además, sus rangos de sensibilidad varían del 42% al 73%, y su sensibilidad se halla entre el 50 y el 97% (29), lo que implica que aunque se haya reducido el tiempo de identificación del microorganismo causante de la infección, la sensibilidad todavía continúa siendo limitante. Cabe destacar que la necesidad de identificar al microorganismo causante de la infección es crucial en el menor tiempo posible, con el fin de aplicar el mejor tratamiento antimicrobiano posible.

Así mismo, existen otros parámetros moleculares que se tienen en cuenta a la hora de identificar un episodio séptico, como son el lactato, la proteína C reactiva (PCR) o la procalcitonina (PCT), entre otros (30,31). El mayor problema de este tipo de marcadores es que son inespecíficos, en el sentido de que son diversos los factores que pueden aumentarlos, pudiendo dar falsos positivos en ausencia de infección, y falsos negativos en casos de infección vírica o fúngica, puesto que, por ejemplo, la PCT no se eleva ante infecciones virales (31). Esto hace que sea difícil diagnosticar la sepsis,

especialmente en las primeras etapas. Del mismo modo, cuando los eventos fisiopatológicos en el organismo se vuelven evidentes, es mucho más difícil regresar a la homeostasis celular y orgánica en el paciente, siendo imposible en algunos casos.

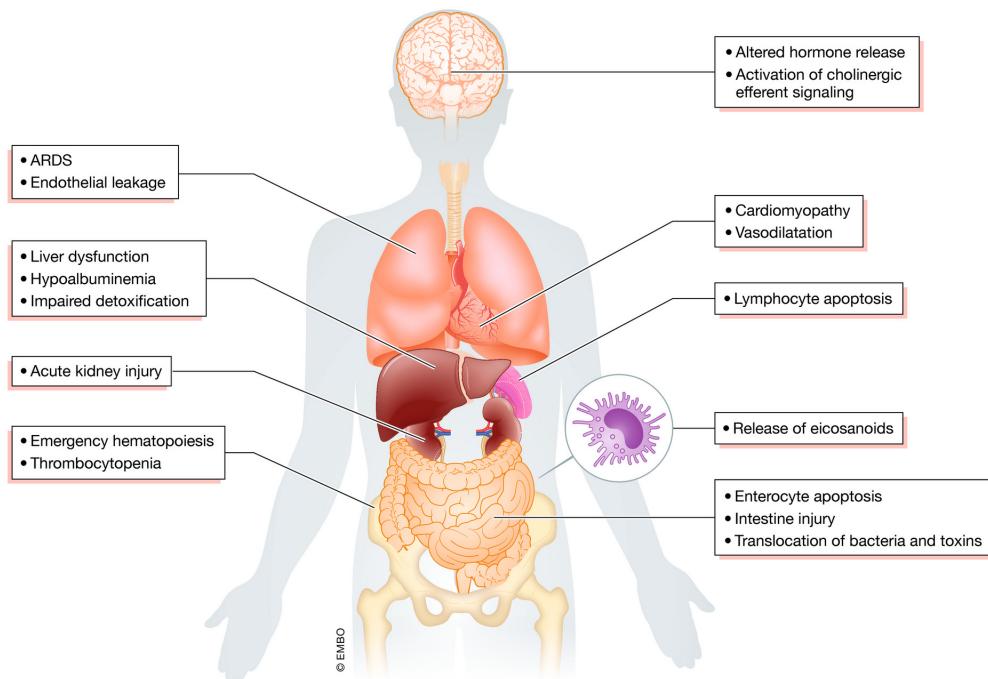


Figura 1. Alteraciones fisiopatológicas que ocurren durante el proceso séptico. Fuente: Imagen adaptada de Cavaillon JM et al. (32).

1.2 El sistema inmune en el contexto de la sepsis

A medida que progresla la sepsis se vuelve más difícil recuperar los mecanismos homeostáticos del paciente. Aunque los patógenos se eliminan por completo del organismo, se produce una pérdida progresiva de la capacidad inmune del paciente, por ello, el estudio del deterioro de la respuesta inmune debe abordarse analizando tanto la inmunidad innata como la adaptativa. En general, la respuesta inmune del huésped está, a su vez, asociada con el momento de la actividad de las células inmunes (horas para la respuesta inmune innata y días para la respuesta inmune adaptativa), aunque proporciona una protección duradera. En consecuencia, la desregulación de las respuestas innatas y adaptativas se asocia con efectos perjudiciales que, combinados con la insuficiencia orgánica, aumentan la mortalidad a corto y largo plazo en los pacientes que han sufrido una sepsis (33–37) (Figura 2).

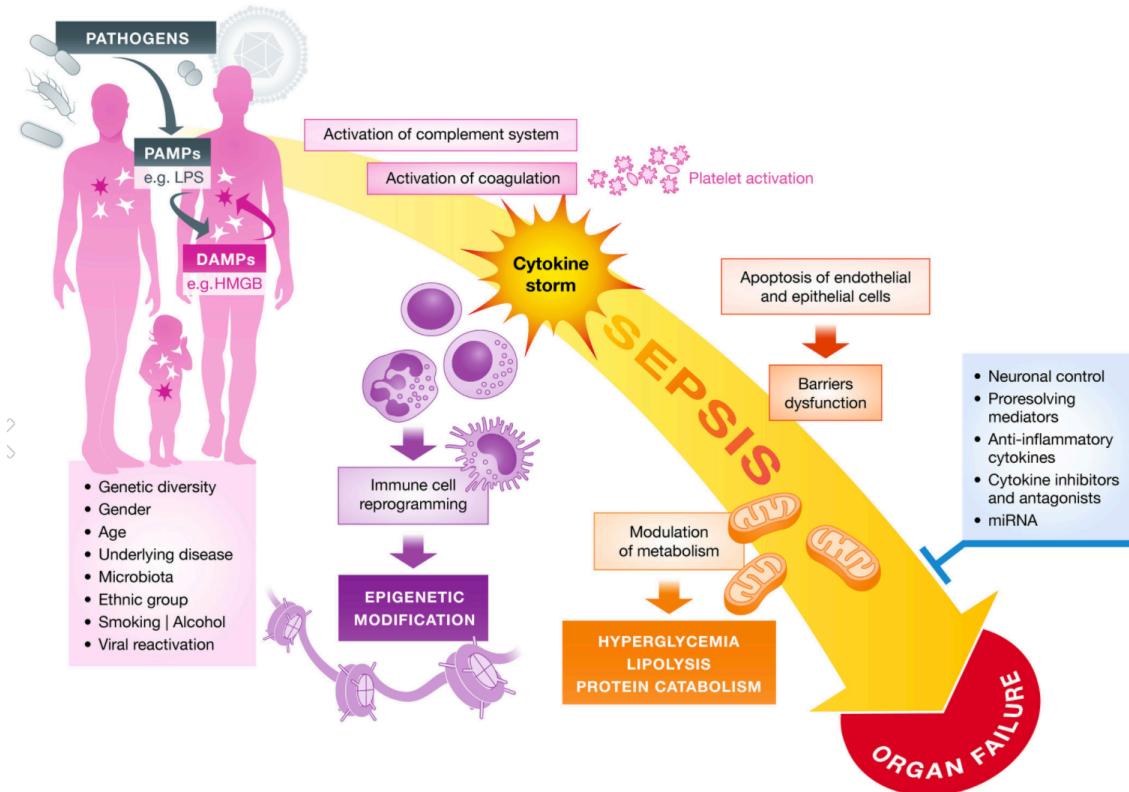


Figura 2.Procesos participantes y elementos que contribuyen a la sepsis y sus complicaciones. **Fuente:** Imagen reproducida de Cavaillon JM et al., (32).

La función del sistema inmune depende de un proceso bien regulado y orquestado de diferenciación de células hematopoyéticas hacia las células inmunes diferenciadas. Este proceso de diferenciación se basa en un control epigenético específico y bien coordinado (38), que se altera tanto durante los procesos infecciosos (39–41) como durante la sepsis (17,42,43). El modelo de proceso séptico más ampliamente aceptado propone que, después de la exposición a los patógenos, se produce una hiperregulación de la respuesta inflamatoria (hiperinflamación), también conocida como "tormenta de citoquinas". Durante la respuesta hiperinflamatoria, los componentes de la respuesta inmune adaptativa se reclutan para estimular una respuesta inmune intensa contra la infección. Sin embargo, simultáneamente a la fase de hiperinflamación, se produce un síndrome de respuesta compensatoria antiinflamatoria (del inglés compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS) (34,44). Este fenómeno induce el fallo o agotamiento del sistema inmune, que media en última instancia la inmunosupresión (45). De hecho, se ha propuesto que este proceso sea uno de los elementos que

contribuyen a la muerte del paciente a corto y largo plazo debido a la respuesta inmune agotada y la presencia de nuevas infecciones oportunistas (34,36,37).

Los pacientes inmunodeprimidos con sepsis tienen un mayor riesgo de infección secundaria adquirida en la UCI, y aproximadamente el 13% de los supervivientes a la sepsis mueren como resultado de dicha infección secundaria en el hospital (46). La inmunosupresión puede durar meses e incluso años y puede producir comorbilidades graves en muchos pacientes supervivientes a la sepsis (45), o incluso puede aumentar la mortalidad (Figura 3). Por lo tanto, la inmunosupresión debe considerarse un ejemplo adicional de insuficiencia orgánica de larga duración en la sepsis (45).

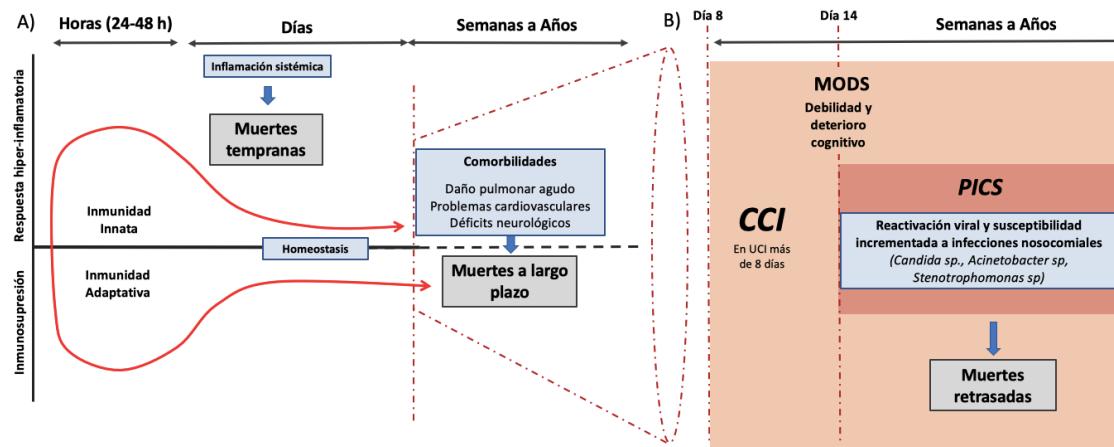


Figura 3. Modelo de progresión de la sepsis a y curso de sepsis post-ICU en relación con los eventos de respuesta inmunitaria. **A)** Las células del sistema inmune innato liberan altos niveles de citoquinas proinflamatorias que desencadenan la llamada "tormenta de citoquinas" e inducen la apoptosis de las células inmunes durante las primeras horas de sepsis, lo que causa la muerte prematura (en aproximadamente el 10% de los casos). La expresión simultánea y la liberación de mediadores pro- y anti-inflamatorios contribuyen a la desregulación del sistema inmunitario de los pacientes. (47-49). La mayoría de los pacientes pueden sobrevivir al proceso séptico inicial después de restablecer la homeostasis fisiológica e inmune. Sin embargo, otros pacientes mueren o sufren comorbilidades graves (es decir, lesión pulmonar aguda, problemas cardiovasculares o déficits neurológicos, entre otros) debido a la activación persistente de la inmunidad innata y la desregulación de la inmunidad adaptativa con la inmunosupresión crónica resultante acompañada de inflamación crónica de bajo grado (flechas rojas). Este modelo se basa en los trabajos de Hotchkiss y col.(34) y Venet y col. (45). **B)** El término Enfermedad Crónica Crítica (CCI por sus siglas en inglés) se ha utilizado para describir a pacientes que, después de 7 días en la UCI, manifiestan un curso complejo prolongado de eventos adversos relacionados con la sepsis y entran en un estado inmunosupresor que facilita el desarrollo de infecciones nosocomiales o la reactivación del virus (en 20% -40 % de casos), disfunción orgánica, deterioro y debilidad cognitiva y de movilidad, lo que lleva a los pacientes sépticos a muerte tardía. Este proceso se describe en el 5% de las admisiones en la UCI. Un subconjunto de pacientes con CCI puede sufrir PICS después de 14 días en una estancia en la UCI, que se caracteriza por una inflamación persistente de bajo grado, supresión inmune adaptativa y estado catabólico, que es responsable de producir la muerte en el 45% al 70% de los sobrevivientes de sepsis después de 2 a 3 años después del alta. **Fuente:** adaptado de nuestro trabajo (50).

Hay un subconjunto específico de pacientes, que generalmente tienen más de 65 años, que sufren lo que se conoce como enfermedad crítica crónica (ECC) debido a que los pacientes sufren de comorbilidades, y que generalmente dependen de la ventilación mecánica. Muchos no sobreviven después de meses de tratamiento fallido (51). Los pacientes con ECC a menudo sufren un síndrome conocido como PICS (síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión), considerado el PICS como un nuevo fenotipo del síndrome de disfunción multiorgánica (MODS) causado por una sepsis (52), lo que conduce a una mayor fragilidad, mala cicatrización de las heridas, mayor susceptibilidad a nuevas infecciones y una inmunosupresión persistente. Este síndrome no debe confundirse con el llamado Síndrome Post-UCI, que usa el mismo acrónimo "PICS" y describe la discapacidad restante entre los sobrevivientes que conduce a un deterioro en la cognición, la salud psicológica y la función física (53) (Figura 3).

No obstante, en la actualidad no hay biomarcadores disponibles capaces de predecir fenómenos de inmunosupresión en la sepsis más allá de las alteraciones en las células supresoras derivadas de células mieloides (MDSC), la expresión de monocitos HLA-DR y el aumento de la concentración de IL-6 (45), así como también se ha planteado el aumento de la IL-10 (34). Las MDSC pueden dividirse aproximadamente en dos subtipos, las MDSC granulocíticas y monocíticas, que inhiben la función de las células B y las células T (54). Por ende, además de agotar las células responsables de la capacidad inmune del huésped, se da un aumento en un subconjunto de células con características inmunosupresoras, como las células T reguladoras (Tregs) (55,56) y un aumento en MDSCs (45,52) en pacientes con PICS. Por lo tanto, las MDSCs pueden participar en inmunosupresión y particularmente en PICS (57). En cualquier caso, existe una necesidad obvia de considerar el potencial de predecir la inmunosupresión y el PICS y las comorbilidades derivadas en los supervivientes de sepsis (58).

1.3 Inflamasoma y sepsis

En 1992 se descubrió en las células del sistema inmune un nuevo mecanismo de muerte celular programada que mediaba la inflamación (59). No obstante, no fue hasta el 2001 cuando se acuñó el término “piroptosis” a este mecanismo de muerte celular,

postulándolo como un mecanismo de necrosis programada que mediaba inflamación (60). En este sentido, Boise y Collins, observaron que esta muerte celular estaba mediada por la activación de una proteína específica, concretamente la caspasa-1, y que era capaz de inducir inflamación, a diferencia de lo que sucedía en otros procesos de muerte celular como la apoptosis (61). En los últimos años se ha observado que este tipo de muerte celular se da en otras células además de las células inmunes. Concretamente, la muerte celular dependiente de caspasa-1 se ha observado en células del sistema inmunitario (61), en el sistema nervioso central (62) y en el sistema cardiovascular (63), indicando que este mecanismo podría estar jugando un papel significativo en gran cantidad de sistemas biológicos y patologías diversas. Este mecanismo recibió el nombre de piroptosis por el origen griego de la palabra, pues *pyro* hace referencia a la fiebre, y *ptosis* denota la caída, así pues, el término piroptosis describe una muerte celular programada proinflamatoria (60).

La piroptosis se desencadena por diversos estímulos patológicos, como cambios en el potencial de membrana, el estrés oxidativo, la hiperglucemia e incluso la propia inflamación (Figura 4), y juega un papel clave en el control de las infecciones microbianas. En la actualidad se puede observar piroptosis en monocitos, macrófagos, células dendríticas, y otros tipos celulares (64), todos ellos capaces de inducir mecanismos de inflamación.

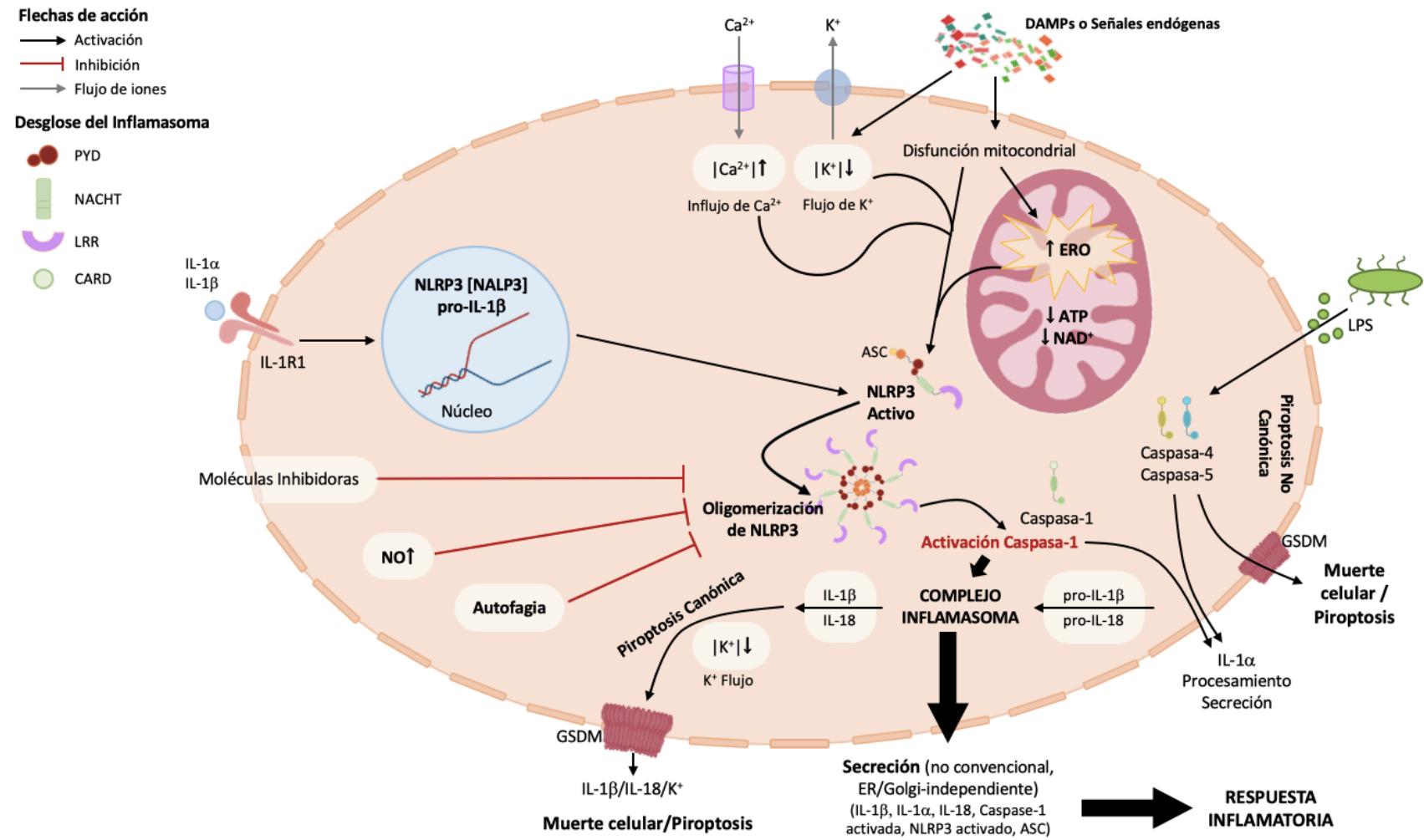


Figura 4. Esquema sobre los estímulos de activación e inhibición de la piroptosis canónica y no canónica. PYD: Dominio Pirina; NACHT: tipo de NLR (*Nod Like Receptor*); LRR: Repeticiones Ricas en Leucina; CARD: Dominio de Reclutamiento de Activación de la Caspasa; ASC: Proteína tipo mota asociada a la apoptosis que contiene una CARD; DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño; LPS: Lipopolisacárido; GSDM: Gasdermina. **Fuente:** Elaboración propia.

La piroptosis es distinta de otras formas de muerte celular reguladas, como la apoptosis, tanto en la morfología celular como en el mecanismo. La principal diferencia entre la apoptosis y la piroptosis radica en el proceso inflamatorio generado con la piroptosis, que no ocurre en el caso de la apoptosis. Así mismo, las caspasas involucradas también son diferentes. Las caspasas apoptóticas incluyen principalmente a las caspasas - 2, 8, 9, 10 (iniciación de apoptosis) y las caspasas - 3, 6, 7 (ejecución de apoptosis) (65). En cambio, la piroptosis se ejecuta a través de la Caspasa-1 (piroptosis canónica) o a través de la caspasa 4 y 5 (piroptosis no canónica) (66) (Figura 4). Además, en la apoptosis no se forman poros de membrana celular, como los mediados por Gasdermina D-N (GSDMD-N) en la piroptosis, ni libera factores inflamatorios propios. En este sentido, la piroptosis se caracteriza por una rápida rotura de la membrana plasmática (siendo positiva en Anexina V y en Ioduro de Propidio), seguida por la liberación de contenidos celulares y mediadores proinflamatorios, incluidos IL-1 β , IL-18 y IL-1 α (67). En cuanto a otros tipos de muerte celulares como la necrosis, la principal diferencia es que este tipo de muerte celular es un proceso celular no programado, a diferencia de la piroptosis o la apoptosis, y que por ende generan una respuesta molecular inespecífica y no regulada.

A diferencia de la mayoría de las citoquinas, la IL-1 β , la IL-18 y la IL-1 α no se secretan por el retículo endoplásmico, sino que se producen como proteínas precursoras biológicamente inactivas que se escinden antes de su secreción como citoquinas bioactivas (68). La IL-1 β madura es un mediador proinflamatorio que recluta células inmunitarias innatas a sitios de infección y modula células inmunitarias adaptativas (T helper 1 (Th1) y Th17). Del mismo modo, la IL-18 madura es importante para la producción de interferón γ (IFN- γ) y la potenciación de la actividad citolítica de los linfocitos asesinos naturales (NK) y las células Th1 y Th17, y puede polarizar las células T hacia los perfiles Th1 o Th2 en combinación con otras citoquinas (69). De hecho, la familia de citoquinas y receptores de interleuquina-1 (IL-1) es única en inmunología debido a que la familia de IL-1 y las familias de receptores Toll-like (TLR) comparten funciones muy similares, más que cualquier otra familia de citoquinas, por lo que la familia IL-1 está asociada principalmente con la inmunidad innata. De hecho, el miembro de la familia IL-1, la IL-1 α también funciona como DAMP, amplificando otro tipo de estímulos diferentes de la IL-1 β o la IL-18 (70) (Tabla 1). Lo que caracteriza la inmunidad innata es la falta de especificidad y, de hecho, las numerosas propiedades

biológicas de la IL-1 α son inespecíficas. Más que cualquier otra familia de citoquinas, los miembros de la familia de IL-1 están estrechamente relacionados con la inflamación dañina; sin embargo, los mismos miembros también funcionan para aumentar la resistencia inespecífica a la infección y al desarrollo de la respuesta inmune a antígenos extraños (70) (Tabla 1). Por lo tanto, las respuestas inflamatorias fundamentales como la inducción de la ciclooxygenasa tipo 2, la producción de múltiples citoquinas y quimioquinas, el aumento de la expresión de moléculas de adhesión o la síntesis de óxido nítrico son respuestas indistinguibles tanto para los ligandos IL-1 como para los TLR (70).

Tabla 1. Familia IL-1 de ligandos y receptores. Fuente: Adaptada de Charles A. Dinarello; 2018 (70). ND: no descrito

Familia IL-1	Receptor específico	Correceptor	Función
IL-1 α , IL-1 β	IL-1R1	IL-1R3	Pro-inflamatoria
IL-1 β	IL-1R2	IL-1R3	Anti-inflamatoria
IL-1Ra	IL-1R1	ND	Anti-inflamatoria
IL-18	IL-1R5	IL-1R7	Pro-inflamatoria
IL-33	IL-1R6	IL-1R3	Pro-inflamatoria
IL-36 α , β , γ	IL-1R6	IL-1R3	Pro-inflamatoria
IL-36Ra	IL-1R6	IL-1R3	Anti-inflamatoria
IL-37	IL-1R5	IL-1R8	Anti-inflamatoria
IL-38	IL-1R6	IL-1R9	Anti-inflamatoria

La piroptosis se da en dos fases (ver figura 4), por un lado, la caspasa-1 activada reconoce los precursores de IL-1 β e IL-18 inactivos y los convierte en citoquinas inflamatorias maduras. Por otro lado, la caspasa-1 escinde a Gasdermina-D (GSDMD) (un miembro de la familia de proteínas Gasdermina) y oligomeriza los productos amino terminales de 31 kDa (GSDMD-N) que median la formación de los poros de la membrana. La formación de estos poros de membrana promueve la liberación de factores inflamatorios, mediando la inflamación celular y, finalmente, la piroptosis (71,72). Así mismo, estos poros se han relacionado directamente con la formación y liberación de las NETs (73). Por su parte, IL-1 α se libera a través de la piroptosis no convencional, por lo que puede ser activada por otros productos como el

lipopolisacárido (LPS), presente en las membranas de las bacterias Gram-negativas y reconocido como el mediador microbiano más potente implicado en la patogénesis de la sepsis y el SS, a través de su capacidad de unión a los Toll-Like Receptors (TLRs) de las membranas celulares (74). La IL-1 α puede ser procesada tanto dependiente de Caspasa-1 como de forma independiente, aunque sigue el mismo patrón de liberación que la IL- β e IL-18, liberándose a través de los poros de membrana formados por la GSDMD y así mismo produciendo retroalimentación positiva (72).

La piroptosis se ha descrito como mediador clave de una amplia gama de enfermedades, entre ellas la sepsis (75). Esto se debe a que la piroptosis juega un papel fundamental regulando la respuesta inmune del cuerpo contra numerosas infecciones, ya sean bacterianas, víricas, de protozoo u hongos (72). En este sentido, la piroptosis se da de manera natural ya que las diferentes ILs (IL-1 α , IL1- β , IL18), la propia Caspasa-1 y especialmente los residuos de la GSDMD inducen muerte celular a multitud de patógenos invasores, debido a que también provocan poros en sus membranas (piroptosis) (72). Además, también se ha demostrado que la piroptosis actúa por una amplia gama de mecanismos, uno de ellos muy similar a la NETosis (proceso mediado por las trampas extracelulares de neutrófilos), llamado "pore-induced intracellular traps (PITs)", capaz de capturar bacterias y eliminarlas a través de eferocitosis (proceso de eliminación de células muertas) (76). Así mismo, también se ha descubierto que la IL-1 α y la Caspasa-4 y 5 (piroptosis no canónica) puede inducir la activación de Caspasa-1 activando así la vía canónica, demostrando ser un proceso altamente regulado (77).

1.4 Papel del endotelio en la sepsis

Como la sepsis es una afección sistémica, afecta prácticamente a todos los órganos y tejidos, siendo el endotelio uno de los primeros tipos celulares en encontrar y responder a la agresión (78–80). Durante la sepsis, las dos funciones más pronunciadas de las células endoteliales son amplificar la respuesta inmune y activar el sistema de coagulación. La activación y / o disfunción endotelial finalmente contribuyen al daño del órgano terminal durante la sepsis. Además, el endotelio proporciona un vínculo entre las respuestas inmunitarias locales y sistémicas, ya que es simultáneamente un

objetivo y una fuente de inflamación (81). Tras la estimulación, las células endoteliales expresan moléculas de adhesión y producen compuestos vasoactivos, citoquinas inflamatorias y quimioatrayentes, cambiando así de un estado anticoagulante al estado procoagulante (82). Si bien la activación endotelial ayuda localmente a combatir la fuente de infección, la activación sistémica puede resultar en trombosis microvascular, permeabilidad capilar, hipotensión, hipoxia tisular y, en última instancia, daño tisular.

En respuesta a las citoquinas inflamatorias (TNF- α e IL-1 en particular), la expresión de moléculas de adhesión [i.e. selectinas, integrinas y miembros de una superfamilia de inmunoglobulinas conocida como moléculas de adhesión intercelular (ICAM) y moléculas de adhesión celular vascular-1 (VCAM -1)] aumenta drásticamente en la superficie de las células endoteliales (Figura 5) (83).

En la fase inicial, los ligandos de carbohidratos de Sialil-Lewis que se encuentran en los leucocitos se unen libremente a la E-selectina y la P-selectina, lo que les permite rodar sobre el endotelio. En la segunda fase, los leucocitos rodantes son activados por quimioquinas liberadas localmente por macrófagos y células endoteliales para expresar integrinas en su superficie, lo que permite una adhesión más firme a ICAM-1 y VCAM-1 e inicia su migración transendotelial hacia los tejidos lesionados (84). Las quimioquinas que se unen al endotelio a través de heparán sulfatos forman un gradiente quimiotáctico que dirige la migración de los leucocitos (85). Además, el gradiente de quimioquinas (como CXCL8, CXCL1, CXCL2 y CXCL5) producido por las células inmunitarias y las células endoteliales promueve el reclutamiento de los neutrófilos de las reservas de la médula ósea y mejora la adhesión de los neutrófilos (85). La P-selectina en las células endoteliales no solo captura los leucocitos y promueve su rodamiento, sino que también activa las integrinas a través del ligando 1 de la glicoproteína de la P-selectina (PSGL-1) e induce una mayor activación de los leucocitos (86).

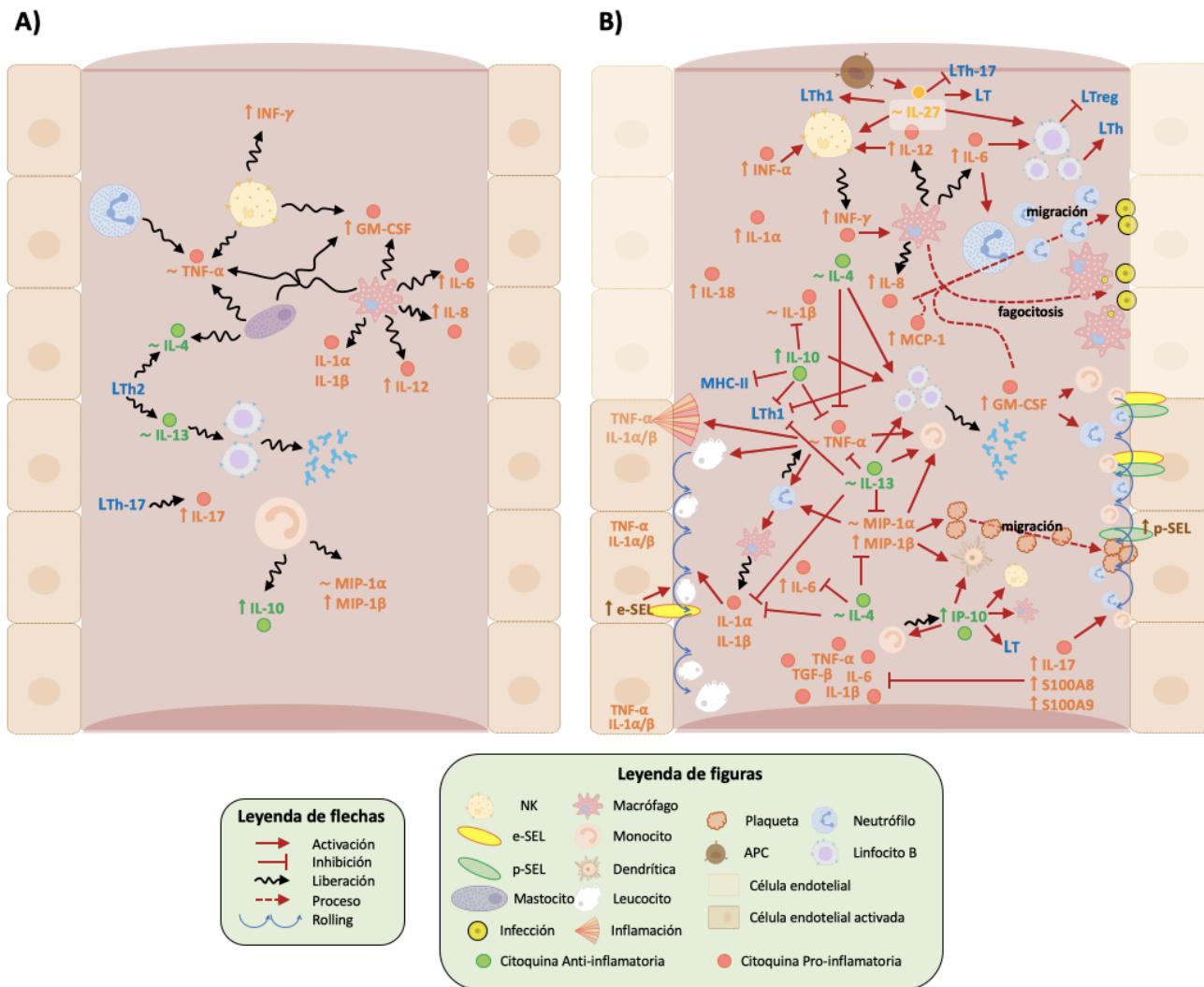


Figura 5. Esquema de la respuesta inmunitaria temprana en pacientes con (a) Esquema de liberación de diferentes células inmunitarias e inmunomoduladores que son liberados durante la fisiopatología de la sepsis; (b) Regulación de la respuesta molecular temprana en pacientes con SS. Las flechas hacia arriba indican sobreexpresión, hacia abajo regulación a la baja, ~ indica que no varían en comparación con las muestras control. Los nombres en naranja son citoquinas proinflamatorias, las verdes son anti-inflamatorias y los azules son células. Imagen adaptada de nuestro trabajo: Beltrán-García et al., High-throughput molecular characterization of the early immune response in septic and septic shock patients

Mientras tanto, a medida que progresan las respuestas inflamatorias, las isoformas solubles de las moléculas de adhesión del reclutamiento de leucocitos se desprenden de las superficies celulares y se acumulan en el plasma sanguíneo circulante para reducir las interacciones leucocito-endotelio y proteger al huésped de daños colaterales excesivos (87). La medición de estas moléculas de adhesión solubles también se ha propuesto como una herramienta de diagnóstico para la detección temprana de la sepsis, así como para la predicción de la gravedad y el desenlace de la sepsis. Las concentraciones séricas de moléculas de adhesión como la E-selectina, P-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 aumentan durante la sepsis (88) y se correlacionan con la gravedad de la sepsis y la mortalidad (89). Los niveles de E-selectina aumentan significativamente con el inicio de la disfunción orgánica relacionada con la sepsis y disminuyen después de que la disfunción orgánica se ha resuelto (89). De hecho, algunos estudios han demostrado que en comparación con marcadores clásicos de infección bacteriana como la procalcitonina, la medición de los niveles circulantes de E-selectina o P-selectina tiene mayor sensibilidad y especificidad para predecir el desarrollo futuro de sepsis en pacientes de UCI (90). Por otra parte, otros estudios han demostrado que mientras que los niveles de la ICAM-1 soluble (sICAM-1) se elevan significativamente en pacientes con sepsis, también aumentan (aunque en menor grado) en pacientes con inflamación sistémica sin sepsis (91). No obstante, los niveles de sICAM-1 se correlacionan directamente con la gravedad de la sepsis y la disfunción orgánica (91). Si bien es bastante sensible a la disfunción orgánica y la gravedad de la sepsis, también se observa un aumento moderado en los niveles de moléculas de adhesión circulantes en otras afecciones que están asociadas con daño vascular (como traumatismos o derivación cardiopulmonar), por lo que su uso como biomarcador debe tomarse con cuidado.

Si bien la expresión de las moléculas de adhesión es crucial para el reclutamiento de células inmunes para combatir la infección, la selección de moléculas de adhesión en el tratamiento de la sepsis sigue siendo controvertida. Curiosamente, un estudio demostró que en un modelo de ratón de sepsis polimicrobiana, el uso de anticuerpos contra ICAM resultó en un mayor reclutamiento de neutrófilos en el sitio de infección con una disminución simultánea de la infiltración en otros órganos (como pulmón, timo y bazo) (92). No obstante, a pesar de que el papel de las moléculas de adhesión endotelial en la

sepsis es innegable, sorprendentemente pocos estudios se han centrado en apuntar a ellas como candidatas para desarrollar futuros tratamientos para la sepsis.

En definitiva, la pérdida de la función endotelial es una característica fundamental en la sepsis, ya que altera la homeostasis vascular y activa procesos como trombosis, inflamación o remodelación vascular. Además, el daño endotelial desempeña un papel central en la progresión a insuficiencia orgánica durante la sepsis y es uno de los principales contribuyentes a la mortalidad mediada por la sepsis (93–95). Más importante aún, se ha demostrado que preservar la función de barrera endotelial mejora el pronóstico de los pacientes sépticos (96–98). El glicocáliz dañado y la muerte celular de las células endoteliales conducen a un aumento en la permeabilidad vascular, lo que favorece el paso de proteínas y fluidos, provocando una fuga intersticial (99). Los cambios fenotípicos endoteliales severos y/o persistentes contribuyen a la alteración del flujo sanguíneo microcirculatorio, la hipoperfusión tisular y la muerte celular, lo que en su conjunto conduce al fallo orgánico (100).

1.5 Histonas extracelulares y sus modificaciones post-traduccionales

Las histonas son las unidades básicas para el ensamblaje de los nucleosomas, ya que contribuyen a la conformación de la cromatina y a la regulación de la expresión génica mediante las modificaciones post-traduccionales (MPTs), mayoritariamente en las colas de las histonas. Las histonas se han descrito ampliamente como agentes antimicrobianos (101,102) capaces de inducir citotoxicidad en los patógenos invasores. Sin embargo, en los últimos años, el papel de las histonas extracelulares como mediadores citotóxicos ha ganado relevancia en la fisiopatología de la sepsis y otros trastornos relacionados con la inflamación (103) y la inmunosupresión (17,104). Además, se ha descrito cómo las histonas extracelulares agravan los fenotipos clínicos de diversas enfermedades en las que las histonas han demostrado ser un mediador relevante (105,106).

Particularmente en la sepsis, las histonas extracelulares se liberan de los neutrófilos a través de un proceso conocido como NETosis (73,107). La NETosis es un proceso de defensa activo que consiste en la liberación de proteínas granulares y cromatina para formar una matriz de fibrilla extracelular conocida como NET (trampa extracelular de

neutrófilos) capaz de unirse a los patógenos y contribuir a su eliminación (19). La formación de las NETs es una estrategia celular muy eficaz de eliminar los patógenos, no obstante, también inducen daño a las células del huésped, en particular a las células endoteliales, causando así daño en el endotelio, y contribuyendo a la fisiopatología de la sepsis. Así mismo, el daño endotelial contribuye a la disfunción endotelial, fallo orgánico y muerte (23,107) debido a que las histonas pueden actuar como patrones moleculares citotóxicos asociados a daño (DAMPs) (103), que a su vez pueden mediar la señalización a través de las membranas celulares.

El grupo de Abrams ha demostrado que las histonas circulantes actúan como mediadores del daño tisular en órganos distantes (es decir, pulmones, corazón, páncreas, etc.) (94). Corroborando esas observaciones, se han encontrado histonas liberadas en el torrente sanguíneo en pacientes con traumatismo severo, pancreatitis, sepsis (94,107) y shock séptico (105,106), así como en complicaciones patológicas como la coagulación intravascular diseminada (DIC) (95). Esto se debe a que las histonas liberadas al torrente sanguíneo inician la activación de la trombina, un proceso que contribuye a la trombosis microvascular en lugares de inflamación severa (108).

Por otro lado, centrándonos en las MPTs, se ha observado que la acetilación de las histonas en los neutrófilos tienen un efecto inmunoestimulador de los NETs (21,109). Además, se sabe que la presencia de H3 citrulinada (H3cit) en los neutrófilos es crucial para la activación de la NETosis (110). Sin embargo, no se tiene constancia de que exista una correlación entre los niveles de acetilación de las histonas circulantes y los niveles de H3cit en los NETs, a pesar de que se ha observado que el uso de inhibidores de las histonas desacetilasas (HDACis) tienen efectos inmunomoduladores positivos (110) y tienen efectos beneficiosos en modelos animales de SS, limitando la secreción de citoquinas (111). No obstante, otro estudio ha demostrado que la inhibición de las HDAC1/2 estimula la liberación de citoquinas pro-inflamatorias en lugar de inhibirlas (112), por lo que existe cierta controversia. En este sentido, un estudio más reciente en un modelo de SS en ratones C57BL/6J demostró que la tubastatina A (un inhibidor de la HDAC6) inhibió la producción de citoquinas y disminuyó drásticamente el daño en el hígado y la apoptosis de los macrófagos, mejorando la supervivencia de los ratones. Sin embargo, el MS-275 (un inhibidor de HDACs 1, 2 y 3) no produjo los mismos beneficios (113). Así mismo, el tratamiento con HDACis mejora significativamente el

fenotipo en las células y los tejidos cuando fueron tratados con SAHA y TSA, así como las características clínicas en modelos animales de sepsis (58,114,115). Si bien estos ejemplos ponen de manifiesto el papel de modificaciones de las histonas en sepsis, no se dispone de información sobre la relación de las MPTs con la acción citotóxica particular de las histonas, ni sobre la evolución clínica de los pacientes. Tampoco se dispone de información sobre los procesos de remodelación de la cromatina que expliquen el fenómeno de inmunosupresión que sufren uno de cada tres pacientes tras un episodio de sepsis (116).

Por otra parte, en los últimos años, algunos trabajos han enfatizado el papel de las histonas en la estimulación de los receptores Toll-like (TLR) y los receptores NOD-Like (NLR) en la sepsis, ya que estos receptores tardíos reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y una gran variedad de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) (97). Entre las NLR, la proteína 3 que contiene repeticiones ricas en leucina del dominio de unión a nucleótidos (NLRP3) desempeña un papel fundamental en la inmunidad innata y media la activación del complejo molecular de caspasa-1 y por ende la piroptosis, que promueve la IL-1 β pro-inflamatoria y producción de IL-18 (98,117), como se ha explicado anteriormente. El inflamasoma desempeña un papel clave en la muerte celular mediada por sepsis (118–121). No obstante, a pesar de las evidencias de que las histonas circulantes son capaces de activar el inflamasoma y por ende mediar piroptosis en las células inmunes (122), se desconoce si también son capaces de mediar piroptosis en otros tipos celulares.

1.6 Epigenética y sepsis. Papel de la metilación del ADN en el contexto de la sepsis

La metilación del ADN es un proceso epigenético que generalmente se asocia con la represión génica. La adición de un grupo metilo suele ocurrir en las citosinas ubicadas en las islas CpG al producir la metilación simultánea de muchas de estas citosinas, lo que contribuye al silenciamiento génico y los procesos de transmisión a largo plazo de este perfil epigenético a través de distintas generaciones de células. La metilación del ADN y las MPTs de las histonas pueden actuar coordinadamente para diferenciar

aquellas células que derivan de linajes mieloides y linfoides para, así, regular la respuesta inmune (123,124).

Por lo tanto, durante el desarrollo hematopoyético, el perfil de metilación cambia progresivamente con el desarrollo de linfocitos T y B, mientras que los niveles globales de metilación disminuyen de manera constante. Sin embargo, la metilación del ADN parece bastante estable durante la diferenciación y activación tanto de los neutrófilos como de los macrófagos (125). La identificación de cambios en la metilación del ADN en promotores particulares de los genes clave implicados en la inflamación, la diferenciación y la función de las células inmunitarias puede proporcionar herramientas potenciales no solo para comprender la fisiopatología de la sepsis y la heterogeneidad de la enfermedad, sino también para proporcionar nuevos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (126).

Centrándonos en la sepsis, por ejemplo, Zemmour *y col.* estudiaron cambios en el patrón de metilación del locus *FAM101A* en 100 pacientes con sepsis o shock séptico y encontraron niveles elevados de copias no metiladas en pacientes sépticos (127). De hecho, encontraron que más de diez copias / mL de *FAM101A* sin metilar era un fuerte biomarcador predictivo del desenlace fatal en pacientes sépticos (Tabla 2).

Así mismo, Dhaset *y col.* analizaron la metilación del ADN en muestras de sangre tomadas de recién nacidos con sepsis neonatal utilizando kits Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina, Inc., CA, EE. UU.) y encontraron hasta 81 CpG metiladas diferencialmente ubicadas en 64 genes. De los genes identificados, los autores encontraron hipermetilación en los genes *PCDHB*, que codifican para cadherinas involucradas en la adhesión de células leucocitarias y en la vía de señalización Wnt (128). Específicamente, encontraron que los genes *PCDHB11*, *PCDHB12*, *PCDHB16*, *PCDHB5*, *PCDHB6*, *PCDHB7* y *PCDHB9* estaban hipermetilados en leucocitos de los recién nacidos que sufrían sepsis neonatal (128). Así mismo, en el trabajo publicado recientemente por nuestro grupo en una cohorte de pacientes con sepsis neonatal hallamos aproximadamente 1050 DMRs, entre las cuales sólo 32 presentaban diferencias en los valores-beta del 10% (129). En este trabajo nuestro grupo de investigación identificó hipometilados los genes *EGOT*, *IL10*, *CPT1B*, *PILRA*, *ELANE*, *TREM1*, *PRTN3*, *MIR145*, *S100A8*, *CSTA*, *MS4A3*, *ATP8B4*, *CPT1B*,

CMY45, LRG1, and CD300LB, cuya función está implicada principalmente en la defensa contra patógenos y procesos inflamatorios. Además, se encontraron otros genes hipermetilados (*CD3G, CD3D, LTA, TXK, UBASH3A* y *SIT*), cuya función está relacionada principalmente con la inmunidad adaptativa (activación de LT) (129). Por otra parte, Dhas y col. observaron hipermetilación del gen *CCS* e hipometilación del gen *DEGS2*. El papel particular de estos genes en la sepsis aún no se conoce, pero probablemente estén relacionados con los mecanismos protectores contra el estrés oxidativo y el metabolismo de los esfingolípidos, respectivamente (130,131).

Más recientemente, Lorente-Sorolla y col. han observado cambios en la metilación del ADN en monocitos de individuos que han sufrido sepsis, específicamente *IL1A, CCL22, CCR2* y *STAT3* en el conjunto de genes hipermetilados y *HLA-A, SOCS1, IL1R2* y *CD46* en el grupo de genes hipometilados (Tabla 2). Además, los autores identificaron una relación significativa entre los cambios en la metilación del ADN y los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10 y la citoquina proinflamatoria IL-6, que aumentaron significativamente en pacientes con sepsis. Así mismo, los cambios más relevantes fueron observados en genes con un papel clave para la función de los monocitos, incluida la vía mediada por IFN- γ y la clase MHC II proteínas (132).

Tabla 2 Genes con metilación diferencial del ADN en pacientes sépticos y de shock séptico. **Fuente:** Beltrán-García J, et al. (50).

Gen	Estado de metilación	Función del gen	Valor de Diagnóstico / Pronóstico	Localización	Ref
<i>PCDHB</i>	Hipermetilado	Codifica para una subfamilia de cadherinas no-clásicas, moléculas de adhesión celular dependientes de calcio. Juega un papel clave en la adhesión celular leucocitaria y en la vía de	Identificar biomarcadores potenciales para el pronóstico de la sepsis neonatal que pueden mejorar las estrategias de	5q31.3	(128)

		señalización Wnt.	tratamiento.		
<i>NFkB1</i>	Hipometilado	NFkB es un factor de transcripción que juega un papel fundamental en la inflamación y en la inmunidad.	Analizar la asociación de la metilación de NFkB1 con una mortalidad aumentada en 30 días, en pacientes con sepsis severa	4q24	(133,134)
<i>CALCA</i>	Hipometilado	CALCA juega un rol crítico en la inducción de la vasodilatación y elevando el AMPc plaquetario. La región promotora 5' de este gen, contiene elementos de respuesta específicos de infección microbiana que regulan la transcripción de PCT durante la infección bacteriana.	Identificar marcadores epigenéticos para sepsis bacterianas en recién nacidos pretérmino	11p15.2	(135,136)
<i>FAM101</i>	No metilado	FAM101A participa en la regulación de la arquitectura de la actina perinuclear y la estructura nuclear a través de la interacción con las filaminas. Un número de copias no metiladas >10 copias/mL de FAM101A en el cfDNA pueden predecir un desenlace fatal en pacientes sépticos.	Predicción de muerte en pacientes sépticos	12q24.31	(127,137)

<i>FOXP3</i>	Hipometilado	FOXP3 es un factor de transcripción crucial en el desarrollo y la función inhibidora de las células Treg. FOXP3 juega un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmunológico.	Evaluar la anergia de los linfocitos después de un SS y encontrar un biomarcador sustituto estandarizable de la disminución de la capacidad proliferativa de los linfocitos después de la sepsis.	Xp11.23	(138–140)
<i>IL1A</i>	Hipermetilado	La IL-1 es producida por macrófagos activados, neutrófilos y células endoteliales que regulan la respuesta inmune. Las diferentes isoformas de IL-1 están implicadas en la respuesta inflamatoria y se identifican como pirógenos endógenos.	Encontrar biomarcadores basados en la metilación del ADN que expliquen la contribución a largo plazo a los monocitos que podrían usarse potencialmente como un marcador del pronóstico del paciente séptico.	2q14.1	(132)
<i>CCL22</i> <i>CCR2</i>	Hipermetilado	CCL22 ayuda en el tráfico de linfocitos T a sitios inflamatorios. CCR2 regula la expresión de citoquinas de células T y la diferenciación de células T en células T auxiliares 17 (Th17) durante la inflamación.	16q21 y 3p21.31 respectivamente	16p13.13	
<i>SOCS1</i>	Hipometilado	SOCS1 tiene un papel clave en la regulación negativa de			

		las citoquinas a través de la vía JAK / STAT3.		
<i>HLA-A</i>	Hipometilado	El HLA-A muestra principalmente péptidos virales y derivados de tumores en las APC, guiando la respuesta inmune de las células T específicas de antígeno para eliminar las células infectadas o transformadas.		6p22.1
<i>IL1R2</i>	Hipometilado	IL1R2 es un receptor de IL-1.		2q11.2
<i>CD46</i>	Hipometilado	La función principal del CD46 es regular a la baja la respuesta de Th1. Son numerosos los patógenos bacterianos y virales que se unen a este receptor e inducen un fenotipo inmunosuprimido de las células T.		1q32.2
<i>ANGPT2</i>	Hipometilado	ANGPT2 regula la estabilidad de los vasos y el remodelado vascular. En ausencia de inductores angiogénicos, ANGPT2 puede inducir apoptosis endotelial, causando eventos de regresión vascular.	Encontrar marcas de metilación de ADN específicas para identificar biomarcadores potenciales para pacientes con sepsis	8p23.1 (141)

MHC clase II, isotipo <i>DQ β-I</i> y <i>DR β-I</i>	Hipometilado	Ambas proteínas juegan un papel clave en la unión de péptidos derivados de antígenos, y las presentan en su superficie celular para ser reconocido por las células T-CD4.		6p21.32
<i>PON1</i>	Hipermetilado	PON1 media protección enzimática contra lipoproteínas de baja densidad y sus modificaciones oxidativas, evitando los consecuentes eventos que causan formación de ateroma.		7q21.3

Otros estudios como el de Binnie *y col.* han encontrado recientemente, usando los arrays de metilación Infinium 450K (Illumina), regiones diferencialmente metiladas en el ADN aislado de sangre total de pacientes críticos con sepsis y no sépticos en las primeras 24 h de la admisión en UCI (142). Concretamente Binnie *y col.* han encontrado una serie de genes con metilación diferencial asociados a regiones génicas que desempeñan un papel importante en sepsis como *C3*, *MPO*, *ANGPT2*, *LPO*, *MHC* clase I A y C, *MHC* clase II isotipo *DQ β-I* e isotipo *DR β-I*, *LIPA*, *PON1*, *FCG2A*, *IL23A*, *TIMP2*, entre otros. Es importante destacar que Binnie *y col.* han encontrado una correlación de la metilación del ADN con fenotipos clínicos de mayor severidad y peor pronóstico (142) y Lorente-Sorolla *y col.* encontraron que la metilación del ADN también se correlacionó con la disfunción orgánica (puntuación SOFA) en pacientes sépticos (132). Todos estos resultados sugieren que los cambios específicos en la metilación del ADN pueden proporcionar biomarcadores potenciales para la sepsis. Los cambios de metilación del ADN en estos genes destacan la relación entre los genes que experimentan cambios en la metilación del ADN y las vías relacionadas con la

adquisición de tolerancia a endotoxinas, lo que puede contribuir a generar un ambiente inmunosupresor.

Los recientes avances obtenidos con el análisis de metilación del ADN llevados a cabo en muestras tomadas de pacientes sépticos han permitido comenzar a comprender los intrincados mecanismos subyacentes a la compleja fisiopatología de la enfermedad, incluida la desregulación de respuesta inmune inflamatoria e inmunitaria del huésped, y la reprogramación de células inmunes e inmunoparálisis. Así mismo, estudios anteriores han descrito cómo la exposición al LPS altera la metilación del ADN en modelos celulares humanos (143–145). Estos hallazgos fueron confirmados recientemente por Lorente-Sorolla *y col.* quienes observaron que los monocitos humanos expuestos a LPS sufren cambios de metilación del ADN en paralelo con la adquisición de tolerancia a endotoxinas (132). Además, se ha demostrado que durante la sepsis aumenta la metilación global del ADN en las células sanguíneas de los recién nacidos que sufren sepsis neonatal (129,146).

Muchos genes relacionados con procesos sépticos están regulados por la metilación de sus promotores, como en la *IL6* y otros genes que codifican *IL8*, *TNFA* y *TLR* (*TLR2* y *TLR4*). Sin embargo, otros estudios como el llevado a cabo por Tendl *y col.* no observaron ningún cambio de la metilación en los promotores de estos genes, al menos no en el ADN de las muestras de sangre de recién nacidos prematuros con sepsis (136). Lo que estos autores mostraron fue cómo cambia la metilación en ocho sitios CpG en el promotor del gen *CALCA*, el cuál también se puede utilizar como un biomarcador epigenético para la sepsis bacteriana en recién nacidos prematuros (136). Este es un enfoque interesante para diagnosticar la sepsis, ya que esta región genómica contiene una respuesta específica a la infección microbiana, como elementos que regulan la transcripción de PCT durante la infección bacteriana (Tabla 2) (147). Los autores también mostraron la modulación del estado de metilación del sitio CpG -769, que estaba parcialmente metilado en la sepsis de inicio tardío, pero esta metilación desapareció cuando la sepsis estaba en remisión (136).

Por otra parte, también se ha observado una pérdida general de 5mc durante la diferenciación *ex vivo* de monocitos a macrófagos o células dendríticas (148,149). De hecho, los estudios han demostrado que DNMT3b regula la polarización y la

inflamación mediada por los macrófagos. Así, los niveles elevados de DNMT3b están asociados con la expresión de macrófagos proinflamatorios M1, mientras que la caída de los niveles de expresión de DNMT3b impulsa la diferenciación de los macrófagos en macrófagos M2 antiinflamatorios (150). DNMT1 también se ha asociado a la liberación de citoquinas proinflamatorias en macrófagos al mediar la hipermetilación de *SOC1* (151), que se sabe que perjudica la activación de la producción de STAT4 e IFN- γ durante la activación de las células NK.

Por ende, la metilación del ADN en genes clave específicos puede contribuir a la tolerancia a endotoxinas (132) y contribuir a que se activen eventos de inmunosupresión después de la "tormenta de citoquinas" en pacientes sépticos (17,148). Durante el proceso hiperinflamatorio en la sepsis, la región promotora del gen *NFKB1* de nt-227 / -8 sufre hipometilación en los neutrófilos en comparación con linfocitos y monocitos (134). Además, estos autores también observaron que la exposición a LPS no altera el estado de metilación de este gen y, por lo tanto, sugiere que la metilación del ADN es necesaria para la rápida expresión de este factor. Así mismo, el estado hipometilado de la región promotora de *NFKB1* en los neutrófilos depende del polimorfismo (-94ins / delATTG) (rs28362491) en el gen *NFKB1*, que está asociado con un aumento de la mortalidad a los 30 días en pacientes con sepsis grave (Tabla 2) (133). Siguiendo con NF- κ B, Rump *y col.* demostraron que la metilación del ADN en el promotor del gen *AQP5* que codifica para la aquaporina 5 en el sitio de unión a NF- κ B repercute en la mortalidad en la sepsis (152).

Por otra parte, Baron *y col.* han descubierto que el promotor de *FOXP3* está hipometilado en las Treg en comparación con las células T CD4 + vírgenes (153). Por tanto, el análisis del estado de metilación del gen *FOXP3* en células Treg de pacientes sépticos puede ayudar a comprender cómo esta regulación epigenética podría participar en la disminución de la proliferación de células T (Tabla 2) (140). Esto es lo más importante ya que un aumento de Treg puede desempeñar un papel clave en la mediación de la inmunosupresión post-séptica mediante la inhibición de la respuesta inflamatoria en infecciones posteriores (154). Por lo tanto, esto podría implicar la posibilidad de que al evaluar el estado de metilación de *FOXP3*, sería posible predecir la expansión de Tregs y la inmunosupresión post-séptica.

Es de destacar que la metilación del ADN contribuye a la diferenciación de las células B de memoria. De hecho, las metiltransferasas de ADN (DNMT) se expresan en gran medida en las células B de memoria, donde los genes relacionados con la inmunidad muestran patrones de metilación del ADN distintivos (155). La identificación de patrones específicos de metilación del ADN en la dinámica de las células B, la producción de las células B reguladoras (Breg) y su contribución a la disfunción inmunológica podría ayudar a aclarar la inmunosupresión en la sepsis. En este sentido, estudios recientes han demostrado la reducida capacidad de proliferación de las células B, así como una mayor proporción de células B agotadas en pacientes con shock séptico, acompañadas de un mayor número de Breg y Treg (156). Curiosamente, la expresión de HLA-DR disminuye en las células B durante la inmunosupresión en pacientes con shock séptico (156) y, hasta la fecha, se sabe que los isótipos de MHC-II (HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ) están regulados por la metilación del ADN (157–159). Además, se ha demostrado recientemente cómo las MDSC promueven la inmunosupresión mediada por células B a través de PD-L1, que confiere a las células B la capacidad de suprimir la activación de las células T CD8+ y la adquisición de un fenotipo efector (160). Además, las MDSC pueden inhibir la función de las células T mediante la privación de L-arginina (esencial para las funciones de las células T) mediante la expresión de arginasa-1 (158). En consonancia con esto, se ha demostrado cómo la hipometilación del promotor *ARG1* puede disminuir en las MDSC mediante el uso de 9-tetrahidrocannabinol (159), un cannabinoide exógeno, que es un potente inductor de las MDSC y su función inmunosupresora. Como resultado de estos cambios principales de metilación, la mayoría de los pacientes con sepsis muestran rápidamente signos de inmunosupresión profunda.

En definitiva, la sepsis es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, de hecho, mata a más personas cada año que el cáncer de próstata, el cáncer de mama y el VIH / SIDA juntos, y el número de casos aumenta cada año. Hoy en día, 1 de cada 5 muertes a nivel mundial están asociadas con la sepsis (161). Así mismo, el shock séptico en particular representa un síndrome muy preocupante en las Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), y deben realizarse más esfuerzos para reducir las altas tasas de mortalidad asociadas con esta enfermedad. Por ende, la identificación de los mecanismos moleculares que subyacen a la fisiopatología de la sepsis y el shock séptico es una necesidad clínica actual, especialmente para poder tratar rápidamente a los

pacientes críticos y decidir las terapias que se deben aplicar. En este sentido, la caracterización de los mecanismos moleculares guiados por las histonas extracelulares podría arrojar luz sobre las bases moleculares de la enfermedad, permitiendo desarrollar terapias eficaces contra la sepsis, además de proveer biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Así mismo, es necesario conocer el estado inmune de estos pacientes, especialmente en los primeros estadios de la enfermedad, ya que a partir de las primeras 4 horas tras sufrir una sepsis, el pronóstico de los pacientes empeora drásticamente. Así mismo, se necesitan nuevos datos sobre el papel que juega la metilación del ADN en la progresión y gravedad de la enfermedad sepsis, colaborando a caracterizar los mecanismos moleculares que guían los fenotipos clínicos de los pacientes sépticos. En este sentido, el hallazgo de nuevas regiones específicas con metilación diferencial (DMR) podría mejorar el manejo clínico al introducir la posibilidad de utilizarlo como nuevos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de sepsis y shock séptico.

2. HIPÓTESIS

La liberación de histonas al torrente sanguíneo es uno de los fenómenos principales que contribuyen al mal pronóstico de la sepsis y el shock séptico. La hipótesis es que mayores concentraciones de histonas circulantes provocarán mayor daño celular y tisular, incrementando la severidad de la enfermedad, por lo que los niveles circulantes de histonas podrían servir para definir la gravedad, la extensión del daño orgánico, la velocidad de progresión de la enfermedad y el pronóstico del paciente. Así mismo, se postula que diferentes modificaciones post-traduccionales de histonas, principalmente la acetilación, pueden estar jugando un papel clave en la citotoxicidad mediada por las histonas, por lo que pueden ser grandes candidatos en terapia. Además, patrones de metilación del ADN específicos servirán para clasificar distintos fenotipos clínicos y pronóstico evolutivo en los pacientes críticos, estableciendo así protocolos de intervención personalizados enfocados a mejorar la supervivencia de los pacientes sépticos.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal es desarrollar herramientas de diagnóstico, pronóstico y terapia que permitan la clasificación de fenotipos particulares de sepsis y shock séptico, así como posibles tratamientos personalizados para responder a la hipótesis planteada.

Para alcanzar este objetivo principal es necesario definir los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterizar los mecanismos moleculares que median las histonas extracelulares al entrar en contacto con células humanas, concretamente con células endoteliales humanas, incluyendo los mecanismos de respuesta antioxidante, función endotelial y muerte celular.
2. Analizar el efecto de la acetilación, como modificación post-traduccional en histonas, sobre los mecanismos moleculares que median las histonas extracelulares sobre las células endoteliales humanas.
3. Caracterizar la respuesta inflamatoria e inmune que ocurre en los primeros estadios de la sepsis, tanto en pacientes sépticos como pacientes de shock séptico.
4. Analizar las correlaciones de las histonas circulantes con diferentes marcadores de severidad y pronóstico de la enfermedad, así como con diferentes citoquinas pro- y anti-inflamatorias, mediadores inmunes y de daño endotelial.
5. Evaluar el papel de la metilación del ADN en la sepsis, a través del análisis de los patrones de metilación del ADN, globales y específicos, en células mononucleares de sangre periférica provenientes de pacientes de sepsis y shock séptico, así como su correlación con los fenotipos clínicos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cultivo celular

En este trabajo se emplearon una línea celular de células tumorales HeLa para obtener los extractos purificados de histonas y células endoteliales primarias de venas umbilicales humanas (HUVEC) obtenidas de cordón umbilical humano en el Hospital Clínico Universitario de Valencia, para la evaluación de la citotoxicidad celular, inflamación, disfunción endotelial y desregulación inmune mediada por las histonas extracelulares. Las líneas HeLa provienen del repositorio de la Unidad de Cultivos Celulares de la Unidad Central de Investigación de Medicina de la Universitat de València. Las líneas HUVEC fueron cedidas por el Grupo de Investigación en Células Endoteliales (LinCE) del Departamento de Fisiología de la Facultat de Medicina i Odontología de la Universitat de Valencia.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Médica local (CEIm del Hospital Clínico Universitario de Valencia) el 30 de junio de 2016. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes.

Procedimiento de obtención de las células endoteliales HUVEC

Las venas umbilicales fueron tratadas con 1% de colagenasa (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), y las HUVEC obtenidas fueron cultivadas en medio de crecimiento específico, EGM-2 (Lonza, Cultek, Barcelona, España). Las HUVEC que se utilizaron en este estudio tenían de 3 a 6 pases.

Procedimiento de cultivo celular de las células HeLa

Las células HeLa se cultivaron en medio de cultivo Iscove's Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) High Glucose (Invitrogen, San Diego, CA, EE.UU.), suplementado con el 10% de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen, San Diego, CA, EE.UU.) y el 1% de penicilina / estreptomicina (Invitrogen, San Diego, CA, EE.UU.). Las células HeLa se sembraron en frascos de cultivo T-150 (162 cm²) con una densidad de siembra de 4,6 x 10⁶ y se consideraron en confluencia a una densidad de 18,4 x 10⁶.

Todas las células se incubaron a 37°C en la incubadora Thermo Scientific, Heracell 150i CO₂ incubator (Thermo Scientific, New York, NY, EE.UU.) en atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Cuando el cultivo llegó a la confluencia, se hizo el pase celular y la

expansión de células necesaria para cada uno de los experimentos que se realizó a continuación.

4.2. Selección de pacientes y controles

4.2.1. Diseño del estudio

Estudio observacional prospectivo longitudinal realizado en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Clínico Universitario de Valencia desde diciembre 2016 a enero 2020, realizado en una cohorte de pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Clínico Universitario de Valencia, con diagnóstico de sepsis y shock séptico, y pacientes con eventos cerebrovasculares.

4.2.2. Comité ético

El estudio titulado “Epigenética e inmunosupresión. Uso de las histonas circulantes y sus modificaciones post-traduccionales como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en sepsis y shock séptico” ha sido aprobado por el Comité Científico Interno de la Fundación de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia – Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA en su reunión del 22 de septiembre de 2016, encontrándolo conforme con los requisitos de capacitación del solicitante, la adecuación del proyecto a los medios existentes, la adecuación de la memoria y el interés de los resultados del proyecto para el área de salud.

El estudio titulado “Epigenética e inmunosupresión. Uso de las histonas circulantes y sus modificaciones post-traduccionales como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en sepsis y shock séptico” ha sido aprobado por el Comité ético de investigación clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia en su reunión del 30 de junio de 2016, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la Declaración de Helsinki, y en la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO y los acuerdos del Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los

Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina.

4.3 Preparación del ácido hidroxámico suberoilanilida (SAHA).

El ácido hidroxámico suberoilanilida (SAHA) (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EE.UU.), también conocido como Vorinostat, se preparó a una disolución de 5 mM con dimetilsulfóxido (DMSO). El SAHA (Figura 6) es un compuesto químico perteneciente una clase muy grande de moléculas que inhiben las histonas deacetilasas (HDAC). Los inhibidores de las histonas desacetilasas (HDACi) tienen un amplio espectro de actividades, entre ellas la de regular las modificaciones post-traduccionales de histonas y por lo tanto se consideran reguladores de los mecanismos epigenéticos.

Se probaron diferentes concentraciones de SAHA (0-100 µM) para identificar el mayor efecto de hiperacetilación sobre las histonas y una menor citotoxicidad. Para la evaluación de la actividad desacetilasa se evaluó el grado de acetilación de los residuos H2AK5ac, H3K9ac y H4K8ac. El tratamiento se aplicó a las células HeLa 24 h en cada condición. Finalmente, se seleccionó 50 µM de SAHA como la concentración de trabajo para inducir la hiperacetilación de histonas.

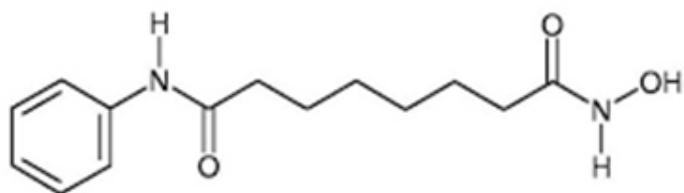


Figura 6. Estructura química del SAHA.

4.4 Purificación de las histonas nativas e hiperacetiladas de las células HeLa.

Para obtener las histonas a partir de células HeLa se utilizó un protocolo desarrollado por Shechter, Hake y Allis (162), posteriormente adaptado en nuestro laboratorio.

El protocolo consiste en:

Primer día:

1. Lavar las células procedentes de un T160 (o cualquier otro frasco de cultivo) con PBS frío (a unos 4°C).
2. Transferir los pellets a un tubo de 1,5mL.
3. Centrifugar 5 min a 2.000 rpm (400G aprox.).
4. Descartar el sobrenadante.
5. Resuspender los pellets en 1mL de buffer hipotónico de Lisis (Tris-HCl 10 mM pH = 8, KCl 1mM, MgCl₂ 1,5 mM) con 10µL/mL de ortovanadato (que es un inhibidor de fosfatasas), y 2µL/mL de inhibidor de proteasas (Fisher Scientific, Hampton, EEUU).
6. Poner la resuspensión de los pellets nucleares en rotación durante 30 min en la cámara fría.
7. Centrifugar 10 min a 4°C a 10.000 rpm.
8. Resuspender el pellet en 400µL de 0,4N de H₂SO₄ (las histonas son solubles en estas condiciones) y poner la suspensión en rotación durante la noche a 4°C.

Segundo día:

9. Centrifugar 10 min a 13.000 rpm a 4°C y transferir el sobrenadante a un tubo de 1,5mL nuevo.
10. Añadir 132µL de TCA al 100% e invertir el tubo para precipitar las histonas.
11. Incubar en hielo durante 30 min (aconsejable invertir el tubo cada 10 min).
12. Centrifugar 10 min a 13.000 rpm a 4°C. Tirar el sobrenadante.
13. Lavar el pellet con 0,5mL de acetona a 4°C.

14. Centrifugar 10 min a 13.000 rpm a 4°C. Tirar el sobrenadante. Dejar secar los pellets al aire y resuspenderlos con 50µL H₂O.

4.5 Cuantificación de los extractos proteicos mediante el método de Bradford.

Es un método colorimétrico que se basa en la unión del colorante hidrofóbico, Coomassie Blue G-250, a las proteínas con aminoácidos básicos (especialmente a arginina) y aminoácidos aromáticos. Las disoluciones acuosas de este colorante en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo (465 nm), pero al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul que se mide a 595nm. Es relativamente sensible a la presencia de contaminantes tales como restos de detergente, lípidos, líquidos orgánicos como el metanol y las soluciones básicas, pero no presenta interferencia con sustancias reductoras como el ditiotreitol (DTT) y el β-mercaptopetanol, que sí interfieren con los ensayos de Lowry y BCA (163). El método de Bradford es simple, rápido, barato y sensible (Rango de sensibilidad 1-15µg) (163). En primer lugar, se prepara una dilución 1:5 del reactivo Bradford en agua miliQ en un volumen suficiente para todas las muestras a ensayar (considerar 200µL por pocillo y tres réplicas por cada muestra y concentración de la curva) y se conserva a 4°C

A continuación, se prepara una disolución stock de 10 mg/mL de BSA (Bovine Serum Albumina) que se utiliza para preparar las disoluciones de la recta patrón utilizando la ecuación ($V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$). Adicionalmente se preparó un blanco que no contenía BSA.

Preparación de la placa multipocillos:

> Muestras:

1. Añadir 195µL de la solución diluida de Bradford a cada pocillo.
2. Añadir 2µL de muestra más 3µL de agua miliQ en 3 pocillos (serán 3 réplicas) y resuspender con pipeta varias veces.

> Recta Patrón

1. Añadir 195µL de la solución diluida de Bradford a cada pocillo.
2. Añadir 5µL de la solución stock de cada concentración en 3 pocillos (serán 3 réplicas) y resuspender con pipeta varias veces.

> Blanco

1. Añadir 195µL de Solución diluida de Bradford a cada pocillo.

2. Añadir 5 μ L de agua MQ en 3 pocillos (serán 3 réplicas) y resuspender con pipeta varias veces.

Se incuba la placa a temperatura ambiente protegida de la luz (cubierto con papel de aluminio o en un cajón), como mínimo, es recomendable hacerlo unos 5 min, no obstante, puede alargarse un poco más pero nunca tiempos superiores a 1 hora. Finalmente medir la absorbancia a 595 nm en el Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, New York, NY, EE.UU.).

4.6 Análisis de los niveles de expresión proteica mediante Western Blot

La detección específica de proteínas y modificaciones post-traduccionales de las mismas se realizó mediante la técnica de Western Blot (WB). Esta técnica permite la detección y semicuantificación de proteínas específicas gracias a la reacción antígeno-anticuerpo. Para la detección de las proteínas de interés se requiere la separación de estas según su peso molecular mediante una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 10 % con docecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

- Preparación de la muestra para el análisis de las histonas hiperacetiladas

Los extractos proteicos cuantificados fueron preparados con el tampón de carga (Tris 40mM, EDTA, azul de bromofenol 0,01%, sacarosa 40%, SDS 4% y β -mercaptoetanol 25%), dejando todas las muestras a la misma concentración. Tras calentarlas 5 min a 95°C, se procedió a la separación electroforética de las mismas en gel SDS-PAGE y a su posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa (Nitrocellulose Transfer Membrane, Whatman GmbH, Dassel, Alemania). La detección de proteínas fue realizada empleando anticuerpos específicos.

- Electroforesis en gel

Se procedió a la carga de las muestras de proteínas en el gel de poliacrilamida al 15%. Resolving gel: agua MiliQ 2,75mL, acrilamida 40% 3 mL, Solución II (Tris-HCl 2M pH 8,8, SDS 20%) 2,08mL, APS 10% 160 μ L y TEMED (tetrametiletilendiamina) 9,6 μ L. Stacking gel: 4,5%: agua MiliQ 1,87mL, acrilamida 40% 3,5mL, Solución III

(Tris-HCl 2M pH 6,8, SDS 20%) 750µL, APS 10% 100µL y TEMED 6µL) por el tamaño en kDa de la proteína de interés, dentro de la cubeta (BioRad, Wertheim, Alemania) con Running buffer (Tris 25mM, Glicina 190mM, SDS 0,1%, pH 8.3) durante 1 hora a 120V-140V.

- Electrotransferencia

Una vez transcurrida la electroforesis en gel, se procedió a realizar la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Nitrocellulose Transfer Membrane, Whatman GmbH, Dassel, Alemania). Para ello se empleó un tampón de transferencia (Tris 25mM, glicina 192 mM, pH 8,3, metanol 20%) y un voltaje de 120V durante 1 hora a 4°C, de manera que las proteínas del gel se desplazaron hacia el polo positivo y quedaron atrapadas por la membrana mediante interacciones hidrofóbicas.

- Tinción del gel

El gel fue separado de la membrana y se dejó teñir con solución de azul de Coomassie (Coomassie R-250 1,25 g. etanol 250 ml, ácido acético 50 ml y 1200 ml de agua) para comprobar que las proteínas habían sido transferidas a la membrana.

- Bloqueo

Para bloquear los lugares de unión de la membrana libres tras la transferencia, se sumergió la membrana en tampón de bloqueo, 0,05g/ml de BSA, en PBS-Tween (Tris 20mM, NaCl 137mm, pH 7,6, Tween 0.1%) durante una hora. El bloqueo de la membrana facilita que el anticuerpo se una solo a su antígeno específico, reduciendo así las uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana o falsos positivos.

- Detección de las proteínas

En esta fase, se comprueba la presencia en la membrana de una determinada proteína. Para ello, se emplea un anticuerpo primario específico y un anticuerpo secundario unido a un enzima que, en presencia de su sustrato, catalice una reacción colorimétrica, fluorescente o quimioluminiscente. De esta forma, se hace patente la unión con el antígeno (la proteína) así como su localización. Este método se realiza en dos pasos:

- Primer paso:

Para la comprobación del grado de acetilación inducida en las histonas in vitro mediante el tratamiento con SAHA, el proceso consistió en la unión del anticuerpo primario anti-H2AK5ac (39107, Active Motif) anti-H2BK5ac (39123, Active Motif), anti-H3K9ac (39585, Active Motif) y anti-H4K8ac (61103, Active Motif) a una concentración 1:1.000 en PBS-Tween con 0.01g/mL BSA, toda la noche a temperatura de 4°C en agitación suave. Para el análisis de la expresión proteica de proteínas apoptóticas, antioxidantes, de regulación endotelial y de función inmune mediada por el endotelio se utilizaron los siguientes anticuerpos específicos primarios: PRX-SO3 (Abcam, ab16830), PRX6 (Abcam, ab59543), GPX1 (Abcam, ab22604), Catalasa (Sigma-Aldrich, c0979), MnSOD (Abcam, ab13533), Cu / ZnSOD (Abcam, ab13498), eNOS (Santa Cruz Biotechnology, sc-653), COX-1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-19998), COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-19999), PGIS (Santa Cruz Biotechnology, sc-20933), TBXAS (Santa Cruz Biotechnology, sc-79181), Caspasa-3 (Cell Signaling, 9662), NLRP3 (Novus, NBP2-12446). Finalmente, β-actina (Sigma-Aldrich, a1978) (Sigma-Aldrich) como control de carga.

- Segundo paso:

Se realizó al día siguiente y consistió en: lavar las membranas tres veces con PBS-Tween con 0,01g/mL BSA, para eliminar el exceso de anticuerpo no unido que hubiera en la membrana. Luego se incubó durante una hora en agitación suave con anticuerpo secundario que reconoce de forma específica una región concreta del anticuerpo primario y va conjugado con la enzima peroxidasa de rábano para poder ser detectables, de manera que varios de estos anticuerpos se unirán a los anticuerpos primarios, amplificando la señal. El anticuerpo secundario utilizado para la detección de las histonas hiperacetiladas fue un anticuerpo anti-conejo (1:2500, CellSignalling), preparado en PBS-Tween con 0.01g/mL BSA. Los anticuerpos utilizados para la detección del resto de proteínas fueron: anti-ratón (Sigma-Aldrich, NA931V), anti-cabra

(Santa Cruz Biotechnology sc2020) y anti-conejo (Sigma-Aldrich, NA934V), utilizándose el específico en cada análisis.

Se realizaron tres lavados con PBS-Tween durante 5 min.

- Detección quimioluminiscente

Las membranas se incubaron con 1mL de mezcla 1:1 de los reactivos del kit de revelado EC.LTM Western Blotting Detection Reagents (Amersham GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Suecia) y tras esto se detectó la señal quimioluminiscente utilizando el sistema de captura de imagen (ImageQuant LAS-4000, General Electrics).

4.7 Evaluación de la viabilidad celular de las células HUVEC tras la exposición a diferentes concentraciones de histonas nativas e histonas hiperacetiladas.

4.7.1. Microscopía de campo claro

Las imágenes de microscopía óptica se adquirieron utilizando una unidad de exploración láser confocal Leica TCS-SP2 equipada con rayos láser de argón y helio-neón y unida a un microscopio invertido Leica BM1RB (Leica Microsystems, Manheim, Alemania). Las células HUVEC se mantuvieron en una cubierta de vidrio con cámara de 2 cm² Lab-TeK II (Nunc, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). El procedimiento seguido para la adquisición de las imágenes fue el siguiente:

1. Las células HUVEC fueron tratadas con histonas nativas e hiperacetiladas durante 4 horas.
2. Pasadas las 4 horas se procedió a la toma de imágenes sin realizar un lavado previo ya que este podría eliminar restos de células en apoptosis o necróticas. Esto es debido a que se presupone que las células muertas no van a estar pegadas a la placa y por tanto se perderán al realizar los lavados, falseando así los datos obtenidos. Se fotografiaron 5 campos y se realizaron 5 réplicas de cada uno.
3. Una vez realizadas las fotos se realizó el tratamiento de imágenes mediante el software ImageJ incluyendo la barra de longitud en la placa y regulando el

brillo-contraste para intentar conseguir la mayor homogenización posible de las muestras (164).

4.7.2. Citometría de flujo

Para la determinación cuantitativa del efecto citotóxico en células HUVEC provocado por la exposición a las histonas extracelulares nativas y acetiladas se utilizó la técnica de citometría de flujo. Este es un método analítico mediante el que se mide la emisión de múltiples fluorescencias y la dispersión de la luz (light scatter) de las células o partículas microscópicas, alineadas secuencialmente mediante una corriente líquida laminar cuando son presentadas de forma individual y a gran velocidad (hasta miles de células por segundo) frente a un haz de luz laser de longitud de onda adecuada.

Esta técnica permite diferenciar poblaciones celulares dentro de la muestra analizada, según el tamaño relativo, la complejidad de sus membranas y/o por su reactividad con diversos fluorocromos o anticuerpos con especificidad frente a algún componente celular. Este es un método de lectura rápido que permite analizar un elevado numero de células (en el caso de este trabajo, 10.000 células por cada réplica técnica) y proporciona datos cuantitativos y la posibilidad de analizar múltiples parámetros en poblaciones celulares, obteniendo un registro computarizado del resultado.

Para el análisis de la viabilidad y muerte celular se empleó el kit de detección de apoptosis Annexin V-FITC (Roche, Basilea, Suiza) que realiza una doble tinción con Anexina V y Ioduro de propidio (IP), siendo capaz de diferenciar entre células viables, células en estados de apoptosis tempranos y tardíos y células necróticas. El protocolo seguido para el desarrollo de esta técnica fue el propuesto por la casa comercial.

La Fosfatidilserina (PS) es un fosfolípido de la membrana citoplasmática que, en condiciones fisiológicas, está localizada en la parte interna o la parte citosólica de la misma. Cuando una célula entra en apoptosis, la PS queda expuesta en la superficie de la membrana celular. La Anexina V, es una proteína con una alta afinidad por la PS de la membrana celular muy usada para identificar células apoptóticas con PS expuestos. El Ioduro de Propidio (IP), es una molécula fluorescente estándar que se usa en las pruebas de Citometría de Flujo para diferenciar las células viables de las no viables. Las células viables con la membrana plasmática intacta no son permeables al IP, mientras

que las membranas de las células dañadas o muertas sí lo son. Así, las células que dan positivo para el Anexina V y negativo para el IP están experimentando apoptosis temprana, mientras que las células que se tiñen positivamente para Anexina V y IP pueden estar experimentando las últimas fases de apoptosis o apoptosis tardía (o están empezando a sufrir necrosis) (165). Las células que no se tiñen con Anexina V y sí lo hacen con IP, están experimentando necrosis. Las células que no se tiñen con Anexina V ni con IP son células viables o están en apoptosis no detectable.

Para el análisis del cambio de potencial de membrana se empleó el reactivo DiBAC (Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol) (Thermo Fisher, Massachusetts, Estados Unidos) Por otro lado, la sonda sensible al potencial (DiBAC) puede ingresar a las células despolarizadas donde se une a las proteínas o la membrana intracelular y exhibe una fluorescencia mejorada y un cambio espectral rojo. La finalidad del uso de esta técnica es analizar la polarización de membrana. El aumento de la despolarización da como resultado un influjo adicional del colorante aniónico y un aumento de la fluorescencia. Por el contrario, la hiperpolarización está indicada por una disminución de la fluorescencia. Este bis-oxonal tiene un máximo de excitación de 490 nm y un máximo de emisión de 516 nm. La sonda DiBAC queda excluida de las mitocondrias debido a su carga negativa, lo que hace que sea una sonda más recomendable que las carbocianinas para medir los potenciales de membrana plasmática (166).

4.8 Extracción y purificación de ARN de células en cultivo

Para poder cuantificar la expresión génica de las células en un momento dado se debe realizar previamente la extracción del ARN celular. Con la obtención del ARN, se realizó una rt-PCR (reverse transcription-PCR) y posteriormente se cuantificaron los niveles de expresión mediante q-PCR (PCR cuantitativa o en tiempo real). Se trabajó en campanas de flujo laminar para mantener la esterilidad. La extracción del ARN se realizó utilizando el kit miRNeasy Mini Kit (50) (Qiagen). Este kit permite extraer el ARN celular conservando los miARN, lo cual, a pesar de reducir el rendimiento final, representa una gran ventaja, ya que permite utilizar la misma extracción para poder realizar posteriores análisis de expresión de miARNs mediante la misma técnica, RT q-

PCR. Se sembraron células HUVEC en placas de 12 pocillos y se crecieron las células hasta obtener una confluencia de un 80% aproximadamente. Posteriormente se trataron las células HUVEC con diferentes concentraciones de histonas (0, 2, 5, 10, 25, 50ng/ μ L), tanto hiperacetiladas como en condiciones basales.

Pasadas 4 horas de tratamiento, se extrajo el ARN celular siguiendo el protocolo siguiente:

1. a) Añadir 700 μ L de Qiazol Lysis Reagent. Recoger el lisado en un tubo de microcentrifuga. Vortear o pipetear para mezclar y deshacer posibles agregados celulares. Puede utilizarse una jeringa y una aguja (calibre 20 -0,9 mm-) 5-10 veces.
b) Tripsinizar y recoger células. Añadir 700 μ L de Qiazol Lysis Reagent. Vortear o pipetear para mezclar.
2. Incubar 5 min a T^a ambiente.
3. Añadir 140 μ L de cloroformo. Agitar vigorosamente durante 15 segundos.
4. Incubar a T^a ambiente 2-3 min.
5. Centrifugar durante 15 min a 12.000G a 4°C.
6. Transferir la fase superior a un “collection tube” (proporcionado en el kit) evitando transferir la interfase. Añadir 1,5 volúmenes de etanol 100% y mezclar con la pipeta. No centrifugar.
7. Transferir 700 μ L de muestra, incluyendo cualquier precipitado que se haya podido formar, en una RNeasy Mini spin column” dentro de un “collection tube” de 2mL (proporcionado). Centrifugar a \geq 8.000G durante 15 segundos a T^a ambiente. Eliminar el eluido.
8. Repetir el paso 7 utilizando el resto de la muestra. Eliminar el eluido.
9. Añadir 700 μ L de “Buffer RWT” a la columna. Centrifugar 15 segundos \geq 8.000G para lavar la columna. Eliminar el eluido.
10. Añadir 500 μ L de “Buffer RPE” a la columna. Centrifugar a \geq 8.000G durante 15 segundos a T^a ambiente. Eliminar el eluído.
11. Añadir otros 500 μ L de “Buffer RPE” a la columna. Centrifugar a \geq 8.000G durante 2 min a T^a ambiente. Retirar la columna sin que contacte con el eluído.
12. Colocar la columna en un nuevo “collection tube” de 2mL. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.

13. Transferir la columna a un nuevo “collection tube” de 1,5mL. Añadir 30-50 μ L de agua libre de ARNasas directamente a la membrana de la columna. Centrifugar 1 min a \geq 8.000G para eluir el ARN.
14. Si el rendimiento de ARN esperado es de más de 30 μ g, repetir el paso 13 con un segundo volumen de 30-50 μ L de agua libre de ARNasas. Eluir en el mismo “collection tube”.

El ARN purificado se cuantificó con el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, New York, NY, EE.UU.). Se utilizó como blanco 1 μ L de agua libre de ARNsas. Se midió la absorbancia de 1,5 μ L de muestras a 260nm con la que obtuvimos la concentración de ARN. Tras medir las concentraciones de cada muestra, éstas se congelaron a -80°C.

4.9. Análisis de la expresión génica mediante RT q-PCR.

La cuantificación de la expresión génica se realizó utilizando RT-qPCR. En primer lugar, se realizó una retrotranscripción (RT-PCR) que fue preparada en una placa de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 10 μ L de la muestra correspondiente de ARN (100 ng de muestra, completando hasta los 10 μ L con agua libre de ARNasas) y 10 μ L de mix de PCR (10xRT buffer (2 μ L), 25x dNTP Mix 100mM (2 μ L), 10x Random primers (0,8 μ L), multiscribe reverse transcriptase (1 μ L) y agua libre de nucleasas (4,2 μ L)) (High-Capacity cADN Archive kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

La mezcla de reacción se introdujo en el QuantiStudio 5 (ThermoFisher Scientific) y se dejó en un primer paso de incubación a 25°C durante 10 min, el cuál permite la unión de los hexámeros aleatorios, seguido de un periodo de 120 min a 37°C que permite la síntesis del ADN copia (ADNc), seguido de una fase final de inactivación a 95°C durante 5 min.

Una vez obtenido el ADNc se procedió a la cuantificación mediante qPCR. En nuestros experimentos se utilizaron los ensayos prediseñados de Taqman Gene expression assays (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) que emplean sondas fluorescentes que poseen en uno de sus extremos un fluoróforo y en el otro extremo un “quencher” que evita la emisión de fluorescencia por parte del fluoróforo del otro extremo. No

obstante, al realizarse la unión de las sondas, la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa elimina uno de los extremos, alejando al “quencher” del fluoróforo y permitiendo la emisión de la fluorescencia. Ambas fluorescencias (quencher y fluoróforo) son detectadas tras la excitación con el láser correspondiente.

Para llevar a cabo esta PCR cuantitativa se colocó 1 μ L de cada una de las muestras en los pocillos correspondientes de una placa de 384 pocillos y se añadieron 3.5 μ L de agua libre de ARNasas, 1 μ L TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies) y 5 μ L TaqManH Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, P/N 4304437, Foster City, CA. EE.UU.) obteniendo un volumen total por pocillo de 10 μ L, formados por la mezcla de los cebadores específicos para SOD1 (Hs00533490_m1, Life Technologies), SOD2 (Hs00167309_m1, Life Technologies), GPX-1 (Hs00829989_m1, Life Technologies), CAT (Hs 00156308, Life Technologies), NOS3 (Hs01574665_m1, Life Technologies), PGIS (Hs00919949_m1, Life Technologies), TBXAS1 (Hs01022706_m1, Life Technologies), V-CAM-1 (Hs01003372_m1, Life Technologies) I-CAM-1 (Hs00164932_m1, Life Technologies), SEL-E (Hs00174057_m1, Life Technologies), COX-1 (Hs00377726_m1, Life Technologies), COX-2 (Hs00153133_m1, Life Technologies), IL-1a (Hs00174092_m1, Applied Biosystems), IL-1b (Hs01555410_m1, Applied Biosystems), IL-6 (Hs00174131_m1, Applied biosystems), IL-18 (Hs01038788_m1, Applied Biosystems) y gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) (Hs02758991_g1, Applied Biosystems). Las muestras se colocaron por triplicado para cada uno de los genes y se cuantificó en el termociclador ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA. EE.UU.).

Se mantuvo durante 10 min a 95°C para activar el enzima, seguido de 45 ciclos en los que se mantuvo la temperatura a 95°C durante 15 segundos para disminuirla a 60°C durante un minuto.

A partir de la señal de fluorescencia detectada, la cuantificación se puede hacer de manera absoluta, obteniendo la cantidad exacta de moléculas de ADN por comparación con una curva estándar, o de manera relativa empleando genes de referencia con expresión constitutiva para determinar las diferencias que existían entre ellos y los genes de interés. En nuestro estudio se empleó la cuantificación relativa que utiliza el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para la obtención de estos datos relativos. Para ello se emplean valores

de CT (cycle threshold), correspondiente al número de ciclo de PCR en el cual la fluorescencia detectada se diferencia del ruido de fondo. Este valor es inversamente proporcional a la cantidad de ADN inicial y es característico de cada una de las reacciones. El método $2^{-\Delta\Delta CT}$ permite comparar la CT del gen problema con la CT del gen de referencia. En este caso se empleó GAPDH como gen de referencia, mediante la ecuación $2^{-\Delta\Delta CT}$ dónde:

$$\Delta\Delta CT = (Ct_{gen\ interés} - Ct_{gen\ referencia}) - (Ct_{medio\ gen\ interés} - Ct_{medio\ gen\ referencia})$$

Para poder aplicar esta fórmula es necesario que la eficiencia de la reacción en ambos genes, el problema y el de referencia, sea aproximadamente igual. Para ello se compararon las curvas estándar de cantidades de ARN conocidas para cada uno de los dos genes. Conociendo las pendientes de las rectas obtenidas, a partir de representar el logaritmo de la concentración frente al CT, se comprobó que la eficiencia de reacción era similar en ambos genes.

4.10. Extracción de ADN de PBMCs humanas

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron de la sangre total de los participantes del estudio recolectada en tubos anticoagulantes (EDTA), utilizando el método Ficoll-Paque. El ADN se extrajo utilizando el DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Inc., EE. UU.). Se trató 1 μ g de ADN genómico con conversión de bisulfito utilizando el kit de metilación de ADN EZ-96 (Zymo Research, Irvine, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante para los ensayos Infinium.

4.11. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó siguiendo el protocolo de extracción proteica de nuestro laboratorio:

1. Poner 150 μ L de tampón de lisis (HEPES pH 7.4 20mM, NaCl 100mM, Triton X-100 1%, NaF 50mM, B-glicerofosfato 10 mM, PMSF 1 mM, PIC 2 μ L, ortovanadato 10 μ L y H₂O hasta completar 10 mL de disolución stock) y pipetear varias veces.
2. Dejar incubar durante 15 min en hielo, agitar de vez en cuando y agitar intensamente durante 30 segundos.
3. Centrifugar a 13.000g durante 10 min a 4°C y recoger el sobrenadante y congelarlo a -20°C.

4.12. Análisis de los niveles de carbonilación de proteínas mediante inmunodetección

Es conocido que el estrés oxidativo puede producir daño oxidativo en biomoléculas constituyentes de los componentes celulares como son las proteínas, el ADN y los lípidos (167).

Las proteínas sufren varios tipos de oxidación; una de ellas, la formación de grupos carbonilo, que ha sido utilizada metodológicamente para evaluar el grado de daño oxidativo en diferentes sistemas biológicos. La carbonilación de proteínas es un daño oxidativo irreversible que se produce en las proteínas, que a menudo conduce a una pérdida de la función de la proteína. La carbonilación consiste en la oxidación de las cadenas laterales de aminoácidos proteicos, se produce en aminoácidos como la lisina, arginina, prolina y treonina, entre otros aminoácidos, catalizada por medio de metales que forman grupos carbonilos en las cadenas laterales de las proteínas (168). Los productos de la carbonilación de estos residuos son el semialdehído glutámico (producto de la oxidación de arginina y prolina) y semialdehído aminoadípico (producto de la oxidación de lisina). La carbonilación se considera como un indicador generalizado de daño oxidativo severo.

El procedimiento experimental consistió en:

1. Ajustar a una concentración de 10ng en un volumen de 10 μ L con H₂O bidestilada.

2. Derivatizar con 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP-hidrazone) por su reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), utilizando el kit de detección de oxidación de proteínas Kit Oxi-BlotTM (Merck Millipore, Kenilworth, EE.UU.).
3. Desnaturalizar los 10ng de proteínas con 1.65μL de SDS al 36%. La solución de proteína se trató con 10μL de DNPH 1X, para el alícuota control se le añade la solución de derivatización control y se incuba durante 15 minutos.
4. Pasado este tiempo añadir 7.5μL de la solución neutralizadora y 1.43μL β-mercptoetanol.
5. Hidratar la membrana de transferencia de nitrocelulosa (GE Healthcare, Chicago, EE.UU.) y un papel de Whatman 3MM (GE Healthcare, Chicago, EE.UU.) con 5mL de ASB 0.01g/mL en solución PBS-Tween 4mM y Tween 0.1%.
6. Posteriormente se ponen encima de un papel de filtro seco y debajo de estos tres papeles de secar. Verter 1μL de cada muestra preparada anteriormente sobre la membrana, incluyendo los controles positivos y negativos de proteínas carboniladas.
7. Dejar secar durante unos minutos.
8. Una vez seco, realizar el bloqueo usando 5mL de 0.01g/mL de ASB en solución de PBS-Tween durante 1 h.
9. Después del bloqueo, realizar la incubación con el anticuerpo primario usando el anticuerpo de conejo anti-proteínas carboniladas (1: 1000; Merck Millipore, Kenilworth, EE.UU.) en 5mL de 0.01g/mL de ASB en solución de PBS-Tween.
10. Incubar la membrana durante la noche a 4°C y con agitación suave.
11. Al día siguiente, lavar la membrana tres veces con 0.01g/mL de ASB en solución de PBS-Tween, con el fin de eliminar el anticuerpo que no se unía.
12. Después, la membrana se incuba con el anticuerpo secundario anti-conejo (1:2500; Cell Signalling, Danvers, EE.UU.) con peroxidasa de rábano conjugada.
13. Realizar tres lavados con 0.01g/mL de ASB en solución de PBS-Tween con el fin de eliminar el anticuerpo no unido.
14. Posteriormente, la membrana se incuba con el reactivo de ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, Chicago, EE.UU.).

15. Las imágenes de quimioluminiscencia se obtienen con LAS-4000 (GE Healthcare, Chicago, EE.UU.). Las muestras se analizaron por triplicado para cada línea celular.

4.13. Evaluación de la expresión del inflamasoma mediante la medición de los niveles catalíticos de Caspasa-1

La caspasa-1 es un miembro de la familia de las proteasas cisteína ácido aspártico-específicas y un componente esencial del inflamasoma. Las células inmunes innatas responden a los patógenos y a otras señales de peligro con la formación del complejo del inflamasoma y la conversión del zimógeno de procaspasa-1 en caspasa-1, que es catalíticamente activa. La activación de la caspasa-1 da como resultado: 1) el procesamiento y la liberación de citoquinas, IL-1 β e IL-18 y 2) piroptosis, una forma inmunogénica de muerte celular similar a la apoptosis, pero más agresiva (50–53).

El inflamasoma es un complejo multiprotéico formado por la caspasa-1, PYCARD, también llamada ASC (proteína moteada asociada a apoptosis que contiene una CARD: dominio de reclutamiento de caspasa en C-terminal), una NALP (tipo de receptor tipo NOD) y en ocasiones una caspasa-5 o caspasa-11.

La composición exacta del inflamasoma depende del activador que inicia el ensamblaje del inflamasoma. No obstante, todas las proteínas que ensamblan el inflamasoma son capaces de detectar antígenos microbianos individualmente y reaccionar en consecuencia, formando el inflamasoma (Figura 7).

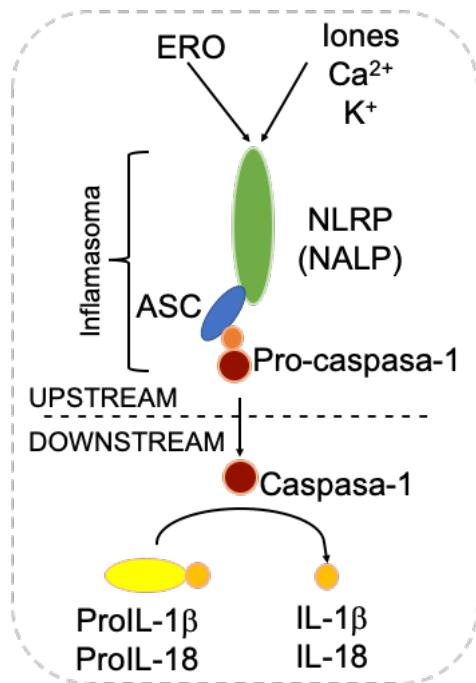


Figura 7. Cascada molecular durante el ensamblaje del inflamasoma. **Fuente:** Elaboración propia.

Nota: Para confirmar que la inhibición de MG-132 y la inhibición de Ac-YVAD-CHO están completas, es recomendable medir la luminiscencia a los 60 minutos, 90 minutos y 120 minutos. La placa se puede dejar en el luminómetro con ajustes de lectura cinética para leer cada 30 minutos. Una vez que la señal se ha estabilizado, después de que la inhibición de MG-132 y la inhibición de Ac-YVAD-CHO está completa, la vida media de la señal es de aproximadamente 3 horas. Se recomiendan que se mida la luminiscencia dentro de las 3 horas posteriores a la adición del reactivo Caspase-Glo® 1.

4.14. Evaluación del efecto del Inhibidor MCC950 sobre la viabilidad celular mediante MTT

El inhibidor MCC950 se ha descrito ampliamente debido a su actividad específica sobre la oligomerización de la estructura NLRP3, clave en el ensamblaje del Inflamasoma. Por lo tanto, este inhibidor impide la oligomerización del NLRP3 y, como consecuencia, el ensamblaje del Inflamasoma.

Para analizar el efecto de este inhibidor sobre la viabilidad celular, las células HUVEC se trataron como se ha descrito anteriormente, con un rango de 0-20 μM del inhibidor

MCC950. Tras dos horas de exposición se añadieron 50 μ g/mL de histonas y se incubó durante 4 horas más. Tras el tratamiento, se analizó la viabilidad mediante el ensayo de MTT.

Este ensayo está basado en la reducción de una sal soluble de tetrazolio (MTT) de color amarillo, en un formazán insoluble de color azul. Esta reducción se realiza en el interior de la célula por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. La metabolización de la sal de tetrazolio (MTT) a formazán produce un cambio de color desde amarillo hasta color púrpura. Este cambio de color es directamente proporcional al número de células vivas capaces de metabolizar la sal.

Para llevar a cabo esta prueba, se preparó la MTT como solución stock a una concentración de 5 mg/mL en PBS. Tras disolverla, se esteriliza por filtración y se conserva en una botella de vidrio opaco a 4°C. Esta solución stock se diluye en el medio de cultivo adecuado en la proporción: 1mL de MTT por cada 10mL de medio (dilución 1:11) y se mantiene a 37 °C, en oscuridad, para que se produzca la reacción. Para redisolver el formazán insoluble en agua se emplea dimetilsulfóxido (DMSO) puro.

4.15. Medición de los niveles circulantes de histonas por espectrometría de masas

4.15.1 Preparación de la muestra

Las muestras de plasma se centrifugaron 15 min a 15.000 g para la deslipidación. Se diluyeron 2 μ L de cada muestra de plasma en 8 μ L de H₂O. Se mezclaron 2 μ L de cada plasma diluido 1/5 (25 μ g) en 18 μ L de BA 50mM junto con 25fmol de péptidos Heavy Mix en un volumen final de 20 μ L. Los residuos de cisteína se redujeron en DTT 2 mM (DL-Ditiotreitol) en ABC 50 mM a 300 W de microondas durante 3 min.

Los grupos sulfhidrilo se alquilaron con IAM 5 mM (yodoacetamida) en ABC 50 mM en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 min. La reacción se detuvo con TFA (ácido trifluoroacético) a una concentración final del 1%.

4.15.2 Análisis de las histonas circulantes por espectrometría de masas

Los experimentos de espectrometría de masas se realizaron en un espectrómetro 5500QTRAP híbrido triple cuadrupolo / lineal de masas con trampa de iones (ABSIEX), equipado con un sistema cromatográfico Micro M3 MicroLC en la Unidad de Proteómica del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental, SCSIE, de la Universitat de València.

Brevemente, el protocolo consistió en utilizar 10 μ L de digestión tríptica (aproximadamente 9 g de proteína y 25 fmol de cada péptido marcado isotópicamente (Spike-In peptide)) los cuales se inyectaron en una columna Trap (10X0.3mm Trap Cartridge Chromxp C18CL 5um, ABSCIEX) y luego se cargó y se separó en una columna analítica (ChromXP C18, 120A, 3 μ m, 150x0,3mm). La elución se realizó con un gradiente lineal de 0 a 35% de B en A durante 30 minutos. (A: 0.1% FA; B: ACN, 0.1% FA) a una velocidad de flujo de 5 μ L/min.

El 5500 QTRAP funcionó en modo Multiple Reaction Monitoring (MRM). Los datos de MRM se adquirieron en modo positivo con un voltaje de pulverización de 5500 V, gas de cortina: 25 psi, gas de fuente de iones: 25psi, potencial de entrada (EP): 10 y potencial de salida (EXP): 16.

La energía de colisión (CE) y el potencial de reducción de potencia (DP) se optimizaron previamente en cada transición. Se realizó una cuantificación relativa de cada histona y las relaciones de área (ligera / pesada) para todas las transiciones, que se calcularon utilizando el software Skyline 4.2.1.19058 (laboratorio MacCoss) y la concentración de la proteína de interés como fmol/ uL de suero inicial y convertida a ng/mL de proteína.

Los péptidos pesados (Spike-In) utilizados para la cuantificación de cada una de las histonas circulantes se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencia primaria de los péptidos Spike-In marcados isotópicamente para el estudio MRM-MS de cuantificación de las histonas circulantes en plasma sanguíneo.

Proteína	Péptido
Histona H2B	LLLPGELAK
Histona H3	STELLIR
Histona H4	Media de: DNIQGITKPAIR and VFLENVIR

4.16. Análisis de los niveles de Caspasa-1 circulante presente en el plasma de los pacientes

Los niveles de Caspasa-1 humana circulantes se midieron usando el ELISA de caspasa-1 humana (RayBiotech, Parkway, Peachtree Corners, EE. UU.).

El protocolo que se siguió es el que se explica a continuación:

1. Llevar todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente (18 - 25°C) antes de usar.
2. Etiquetar las tiras removibles de 8 pocillos según sea apropiado para su experimento.
3. Agregar 100 µl de cada estándar y la muestra en los pocillos correspondientes. Cubrir los pocillos e incubar durante 2.5 horas a temperatura ambiente en agitación suave.
4. Desechar la solución y lavar 4 veces con 1X Wash Solution. Lavar llenando cada pocillo con tampón de lavado (300 µl) con una pipeta multicanal o aparatos de autolavado. Después del último lavado, eliminar cualquier tampón de lavado restante aspirando o decantando.
5. Agregar 100 µl de anticuerpo biotinilado preparado previamente 1X a cada pocillo. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave.
6. Desechar la solución. Repetir el lavado como en el paso 4.
7. Agregar 100µL de solución de estreptavidina preparada a cada pocillo. Incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.
8. Desechar la solución. Repetir el lavado como en el paso 4.

9. Agregar 100 μ L de Reactivo de sustrato de un solo paso TMB (reactivo H) a cada pocillo. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación suave.
10. Agregar 50 μ L de solución de parada (reactivo I) a cada pocillo. Leer la absorbancia a 450nm inmediatamente utilizando el espectrofotómetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, Silicon Valley, EE.UU.).
11. La actividad de Caspasa-1 se calculó restando la absorbancia obtenida del ensayo (450nm) a la absorbancia basal de la placa (650nm). Los cálculos se representaron utilizando el GraphPad Prism v6.

4.17. Análisis de los niveles de IL-18 circulante presente en el plasma de los pacientes

Los niveles de IL-18 humana se midieron mediante el kit de análisis ELISA de IL-18 humana (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE. UU.).

El protocolo aplicado consistió en:

1. Lavar las tiras de micropocillos dos veces con aproximadamente 400 μ L de tampón de lavado por pocillo con la aspiración completa del contenido entre lavados. Permitir que el tampón de lavado se asiente en los pozos durante aproximadamente 10-15 segundos antes de la aspiración.
1. Después del último paso de lavado, vaciar los pocillos para eliminar el exceso de tampón de lavado. No permitir que los pocillos se sequen.
2. Agregar la dilución estándar en la placa de micropocillos: Añadir 100 μ L del diluyente de las muestras y duplicar en todos los pocillos estándar.
3. Agregar 100 μ L de diluyente de muestra por duplicado a los pocillos en blanco.
4. Agregar 50 μ L de diluyente de muestra a los pocillos de muestra.
5. Agregar 50 μ L de cada muestra por duplicado a los pocillos de muestra.
6. Preparar el conjugado de biotina
7. Agregar 50 μ L del conjugado de biotina a todos los pocillos.
8. Cubrir con una película adhesiva e incubar a temperatura ambiente (18°C- 25°C) durante 2 horas, si es posible en un agitador de microplacas.

9. Preparar el conjugado Streptavidin-HRP.
10. Retirar la película adhesiva y vaciar los pocillos. Lavar las tiras de micropocillos 6 veces según el punto 1 del protocolo. Continuar inmediatamente al siguiente paso.
11. Agregar 100 µL del conjugado Streptavidin-HRP diluida a todos los pocillos, incluidos los pocillos que actúan como controles (blanco).
12. Cubrir con una película adhesiva e incubar a temperatura ambiente (18°C- 25°C) durante 1 hora, si es posible en un agitador de microplacas.
13. Retirar la película adhesiva y vaciar los pocillos. Lavar las tiras de micropocillos 6 veces según el punto 1. Continuar inmediatamente con el siguiente paso.
14. Pipetear 100 µL de solución de sustrato TMB a todos los pocillos.
15. Incubar las tiras de micropocillos a temperatura ambiente (18°C-25°C) 10 minutos. Evitar la exposición directa a la luz intensa. El desarrollo del color en la placa debe ser monitoreado y la reacción del sustrato se detendrá antes de que los pocillos positivos ya no se pueden medir correctamente. La determinación del período de tiempo ideal para el desarrollo del color debe hacerse individualmente para cada ensayo. Se recomienda agregar la solución de parada cuando el estándar más alto ha desarrollado un color azul oscuro.
16. Detener la reacción enzimática rápidamente pipeteando 100 µL de Stop Solución en cada pocillo. Es importante que la solución de parada se extienda rápida y uniformemente a través de los micropocillos para inactivar completamente la enzima. Los resultados deben ser leídos inmediatamente después de agregar la solución de parada o dentro de una hora si las tiras de micropocillos se almacenan a una temperatura de 2°C a 8°C en la oscuridad.
17. Leer la absorbancia de cada pocillo en un espectrofotómetro usando 450nm como la longitud de onda primaria (opcionalmente 620nm como la longitud de onda de referencia; 610nm a 650nm es aceptable). Determinar la absorbancia de las muestras y los estándares para proceder a la cuantificación matemática.

4.18. Análisis de los niveles de diferentes citoquinas circulantes presentes en el plasma de los pacientes

Niveles plasmáticos de IL-1 α , IL-1 β , IL-12p70, interferón (IFN) - α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-10, tumor factor de necrosis (TNF- α , factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), proteína inflamatoria de macrófagos 1 (MIP-1 α , MIP-1 β , proteína quimioatractante de monocitos-1) (MCP-1), E-selectina, P-selectina, molécula de adhesión intercelular 1 (sl-ICAM1), IL-4, IL-13, IL-17 y proteína 10 inducible por interferón- γ (IP-10) en muestras de individuos sanos ($n = 10$), los pacientes críticamente enfermos no sépticos ($n = 6$) y los pacientes con sepsis ($n = 10$) y SS ($n = 15$) se midieron con el panel ProcartaPlex de 20 plex de inflamación humana (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la siguiente manera:

4.18.1. Preparación de las muestras:

1. Recolectar las muestras en citrato de sodio o tubos de EDTA. Si se usa heparina como anticoagulante, no debería tener más de 10 UI de heparina por mL de sangre recolectada debido a que un exceso de heparina puede dar valores falsamente altos de algunos de los analitos.
2. Centrifugar las muestras a $1,000 \times g$ a 4°C durante 10 minutos dentro de los 30 minutos de la recolección.
3. Recoger la fracción de plasma y usar inmediatamente o alicuotarla y almacenarla a -80°C .

4.18.2. Protocolo experimental

1. Definir el mapa de placas. Marcar los pocillos estándar, de muestra y blancos.
2. Agregar perlas magnéticas a la placa. Debido a que se trata de un panel combinable, las perlas magnéticas están provistas a la concentración de trabajo 1X.
3. Lavar las perlas magnéticas.
 - a. Insertar de forma segura la placa de 96 pocillos en el dispositivo magnético portátil, asegurándose de que la placa esté sujetada por las

- pestañas y esperar 2 minutos para permitir que las perlas se acumulen en el fondo de cada pozo.
- b. Eliminar el líquido en los pocillos invirtiendo rápidamente el dispositivo portátil.
 - c. Agregar 150 μ L de tampón de lavado (1X) en cada pocillo y esperar 30 segundos para permitir que las perlas se acumulan en el fondo de cada pocillo.
 - d. Retirar el tampón de lavado de los pocillos invirtiendo rápidamente el dispositivo portátil
4. Agregar las muestras, los estándares y los blancos con el "buffer específico" y luego incubar.
 - a. Para suero y plasma: agregar 25 μ L de tampón de ensayo universal (1X) a cada pocillo seguido por 25 μ L de estándares preparados o muestras.
 - b. Para los blancos: agregar 25 μ L adicionales de tampón de ensayo universal
 - c. Sellar la placa con el sello de placa provisto. Cubrir el plato con la tapa de microplaca negra y agitar a 500 rpm durante 60–120 minutos a temperatura ambiente.
 - d. Alternativamente, la placa de 96 pocillos puede incubarse durante la noche. Agitar la placa de 96 pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente a 500 rpm y luego ponerla a 4°C y almacenarla en una superficie nivelada. Después de la incubación durante la noche, agitar la placa durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente a 500 rpm.
 5. Lavar la placa de 96 pocillos dos veces siguiendo el paso 3.
 6. Agregar la mezcla de anticuerpos de detección e incubar.
 - a. Agregar 25 μ L de mezcla de anticuerpos de detección (1X) a cada pocillo.
 - b. Sellar la placa con un nuevo sello de placa, cubrir la placa con la tapa de microplaca negra e incubar 30 minutos en un agitador de placas a T^a ambiente a 500 rpm.
 7. Lavar la placa de 96 pocillos dos veces siguiendo el paso 3.
 8. Agregar la solución SAPE e incubar.
 - a. Agregar 50 μ L de solución SAPE a cada pocillo

- b. Sellar la placa con un nuevo sello de placa, cubrir la placa con la tapa de microplaca negra e incubar 30 minutos en un agitador de placas a T^a ambiente a 500rpm.
9. Lavar la placa de 96 pocillos dos veces siguiendo el paso 3.
10. Preparar la placa de 96 pocillos para analizar en un instrumento Luminex TM.
 - a. Agregar 120µL de buffer de lectura en cada pocillo.
 - b. Sellar la placa con un nuevo sello de placa, cubrir la placa con la tapa de microplaca negra e incubar 30 minutos en un agitador de placas a T^a ambiente a 500 rpm.
 - c. Retirar el sello de placa y ejecutar la placa en un instrumento Luminex TM (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE. UU.).
11. Los datos generados por el Luminex están en PDF. Para analizar los datos se plasmaron en un documento de análisis de datos con el software GraphPad Prism v6 y se le aplicó la estadística correspondiente a cada análisis.

4.19. Análisis de los niveles de circulantes de IL-18, IL-27, S100A8 y S100A9 mediante ELISA

Los niveles de IL-18 humana se midieron por triplicado usando el ELISA de IL-18 humana (Thermo Fisher, Massachusetts, EE. UU.). La IL-27 en el plasma de pacientes con sepsis y shock séptico se midió por triplicado utilizando el kit ELISA de IL-27 humana (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE. UU.). Por último, se midieron S100A8 y S100A9 por triplicado con el kit ELISA Human S100A8 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) y el kit ELISA Human S100A9 (MyBioSource, San Diego, California, EE. UU.).

4.19.1. Procedimiento seguido para analizar los niveles de IL-18

1. Determinar el número de tiras de micropocillos necesarias para probar el número deseado de muestras más el número apropiado de pocillos necesario para ejecutar espacios en blanco y estándares. Cada muestra, estándar, Las muestras de control en blanco y optionales deben analizarse en duplicar.

2. Lavar las tiras de micropocillos dos veces con aproximadamente 400 µL de tampón de lavado por pocillo con aspiración completa del contenido de los micropocillos entre lavados. Dejar que el tampón de lavado se asiente en los pocillos durante unos 10-15 segundos antes de la aspiración.
3. Después del último paso de lavado, vaciar los pocillos para eliminar el exceso de tampón de lavado.
4. Dilución estándar en la placa de micropocillos (como alternativa, la dilución estándar se puede preparar en tubos. Para ello, añadir 100 µL de la muestra diluida en duplicado en todos los pocillos estándar).
5. Mezclar el contenido de la curva patrón por aspiración y eyección repetida.
6. Añadir 100 µL de diluyente de muestras por duplicado a los pocillos del blanco.
7. Añadir 50 µL de diluyente de muestras a los pocillos de muestras.
8. Agregar 50 µL de cada muestra por duplicado a los pocillos de muestra.
9. Preparar el conjugado de biotina, y añadir 50 µL de conjugado de biotina a todos los pocillos.
10. Cubrir con una película adhesiva e incubar a temperatura ambiente (18 ° C a 25 ° C) durante 2 horas, si es posible en un agitador de microplacas.
11. Preparar estreptavidina-HRP.
12. Retirar la película adhesiva y vacíe los pocillos.
13. Lavar las tiras de micropocillos 6 veces de acuerdo con el punto 2 del protocolo. Continuar inmediatamente al siguiente paso.
14. Añadir 100 µL de estreptavidina-HRP diluida a todos los pocillos, incluidos los pocillos en blanco.
15. Cubrir con una película adhesiva e incubar a temperatura ambiente (18 ° C a 25 ° C) durante 1 hora, si es posible en un agitador de microplacas.
16. Retirar la película adhesiva y vaciar los pocillos. Lavar las tiras de micropocillos 6 veces de acuerdo con el punto 2. Continuar inmediatamente al siguiente paso.
17. Añadir 100 µL de solución de sustrato TMB en todos los pozos.
18. Incubar las tiras de micropocillos a temperatura ambiente (18 ° C a 25 ° C) durante unos 10 minutos. Evitar la exposición directa a luz intensa. Se debe controlar el desarrollo del color en la placa y la reacción del sustrato se detiene antes de que los pocillos positivos ya no se pueden registrar correctamente. Se recomienda agregar la solución de parada cuando el estándar más alto ha

desarrollado un color azul oscuro. La reacción del sustrato debe detenerse tan pronto como el Estándar 1 ha alcanzado una densidad óptica de 0,9 a 0,95.

19. Detener la reacción enzimática colocando rápidamente 100 µL de Stop solución en cada pocillo. Los resultados deben leerse inmediatamente después de agregar la solución de parada o dentro de una hora si las tiras de micropocillos se almacenan entre 2 ° C y 8 ° C en la oscuridad.
20. Leer la absorbancia de cada micropocillo en un espectrofotómetro utilizando 450 nm como longitud de onda primaria (opcionalmente 620 nm como la longitud de onda de referencia; 610 nm a 650 nm es aceptable).
21. Determinar la absorbancia de ambos, muestras y estándares.

4.19.2. Procedimiento seguido para analizar los niveles de IL-27

1. Lavar las tiras de micropocillos dos veces con aproximadamente 400µL de tampón de lavado. Dejar que el tampón de lavado se asiente en los pocillos durante unos 10-15 segundos antes de la aspiración.
2. Después del último paso de lavado, vaciar los pocillos y golpear ligeramente las tiras de micropocillos para eliminar el exceso de tampón de lavado.
3. Añadir 50µL de diluyente de muestras a todos los pocillos.
4. Añadir 50µL de las concentraciones estándares diluidas previamente
5. Añadir 50µL del diluyente calibrador por duplicado a los pocillos del blanco.
6. Agregar 50µL de cada muestra por duplicado a los pocillos de muestra.
7. Preparar el conjugado de biotina
8. Añadir 50µL de conjugado de biotina diluido a todos los pocillos, incluido los pocillos en blanco.
9. Cubrir con una película adhesiva e incubar a temperatura ambiente (18°C a 25°C) durante 2 horas en un agitador de microplacas.
10. Preparar estreptavidina-HRP.
11. Retirar la película adhesiva y vaciar los pocillos.
12. Lavar las tiras de micropocillos 4 veces según el punto 2 del protocolo.
Continuar inmediatamente al siguiente paso.
13. Añadir 100µL de estreptavidina-HRP diluida a todos los pocillos, incluidos los pocillos en blanco.

14. Cubrir con una película adhesiva e incubar a temperatura ambiente (18°C a 25°C) durante 1 hora en un agitador de microplacas.
15. Retirar la película adhesiva y vaciar los pocillos. Lavar las tiras de micropocillos 4 veces según el punto 2 del protocolo. Continuar inmediatamente al siguiente paso.
16. Añadir 100 µL de solución de sustrato TMB en todos los pocillos.
17. Incubar las tiras de micropocillos a temperatura ambiente (18°C a 25°C) durante 30 minutos. Evitar la exposición directa a luz intensa. Se debe controlar el desarrollo del color en la placa y la reacción del sustrato se debe detener antes de que los pocillos positivos ya no se puedan registrar correctamente. La reacción del sustrato debe detenerse tan pronto como el Estándar 1 ha alcanzado una DO de 0,9-0,95.
18. Detener la reacción enzimática colocando rápidamente 100 µL de Stop Solución en cada pocillo. Los resultados deben leerse inmediatamente después de agregar la solución de parada o dentro de una hora si las tiras de micropocillos se almacenan entre 2°C y 8°C en la oscuridad.
19. Leer la absorbancia de cada micropocillo en un espectrofotómetro utilizando 450nm como longitud de onda primaria (opcionalmente 620nm como la longitud de onda de referencia; 610nm a 650nm es aceptable).
20. Determinar la absorbancia de ambos muestras y estándares.

4.19.3. Procedimiento seguido para analizar los niveles de S100A8 y S100A9

1. Para la curva estándar, agregar 100 µL de estándares a los pocillos correspondientes. Para las muestras, agregar 100 µL de muestras diluidas a los pocillos.
2. Cubrir los pocillos e incubar durante 2,5 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4 ° C con agitación suave.
3. Desechar la solución y lavar 4 veces con 1X Wash Buffer. Lavar llenando cada pocillo con Wash Buffer (300 µL) con una pipeta multicanal. Después del último lavado, retirar cualquier volumen de tampón de lavado restante aspirando o decantando.
4. Añadir 100 µL de conjugado de biotina a cada pocillo.
5. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave.

6. Desechar la solución. Repetir el lavado como en el paso 3.
7. Añadir 100 µL de solución preparada de estreptavidina-HRP a cada pocillo.
8. Incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.
9. Desechar la solución. Repetir el lavado como en el paso 3.
10. Añadir 100 µL de sustrato TMB a cada pocillo. El sustrato comenzará a ponerse azul.
11. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con agitación suave.
12. Añadir 50 µL de solución de parada a cada pocillo. Golpear suavemente el costado del plato para mezclar. La solución cambia de azul a amarillo cuando la reacción está completada.

Todos los datos generados de los distintos procedimientos se analizaron con el software GraphPad Prism v6, representando los resultados obtenidos y realizando las pruebas estadísticas oportunadas para cada ensayo.

4.20. Análisis global de la metilación del ADN mediante Arrays EPIC 850 K

2.20.1. Preparación de los arrays 850K y lectura en un sistema HiScan SQ (Illumina)

El análisis global de la metilación del ADN a partir de PBMCs se realizó con las matrices Infinium Human DNA Methylation EPIC 850K BeadChip (Illumina Inc, San Diego, California) utilizadas para el análisis de > 850.000 sitios CpG, que cubren el 99% de los sitios CpG en genes descritos con regulación por metilación del ADN y el 95% de las islas CpG, incluyendo la información de proyectos como ENCODE y FANTOM5.

Se utilizaron 4µL de ADN convertido con bisulfito siguiendo el protocolo del ensayo de metilación de Illumina Infinium HD. Primero, se realizó un primer paso de amplificación del genoma completo seguido de fragmentación enzimática, precipitación y resuspensión. Posteriormente, las muestras procesadas se hibridaron con BeadChips 850K EPIC de metilación humana a 48 °C durante 16 horas. El ADN no hibridado específicamente se eliminó por lavado. Posteriormente, se realizó una extensión de un

solo nucleótido utilizando el ADN tratado con bisulfito hibridado como molde y los nucleótidos incorporados marcados con biotina (ddCTP y ddGTP) y 2,4-dinitrofenol (ddATP y ddTTP). Después de la extensión de una sola base, se realizaron rondas repetidas de tinción con una combinación de anticuerpos que diferenciaban el DNP y la biotina fijándolos en diferentes fluoróforos. Finalmente, el BeadChip se lavó para posteriormente ser escaneado en un escáner Illumina HiScan SQ (Illumina Inc, San Diego, California).

4.20.2. Análisis de la metilación diferencial

El código R utilizado para el análisis de la metilación ha sido extraído de “MethylationArrayAnalysis: A cross-package Bioconductor workflow for analysing methylation array data” (169) y se basó también en el trabajo final de máster titulado “Identification of biomarkers based on dna methylation for diagnosis and prognosis of neonatal sepsis” de Paula Navarrete López (Master Bioinformática Universidad de Valencia) cuyo trabajo fue publicado (129).

Brevemente, El paquete minfi en R (170) se utilizó para leer los archivos .idat sin procesar obtenidos de la matriz EPIC de Illumina, evaluar su calidad y realizar la normalización de cuantiles, así como para la exclusión de sondas que pueden interferir en el análisis posterior (171). Las sondas de metilación de ADN se filtraron con el objetivo de eliminar las sondas con un valor p de detección deficiente ($<0,01$) en cualquiera de las muestras, así como las sondas que coincidían en las posiciones descritas de los SNP, las sondas relacionadas con los cromosomas sexuales (cromosomas X e Y) y los descritos como sondas reactivas múltiples (172).

La prueba estadística para evaluar regiones diferencialmente metiladas (DMRs, acrónimo inglés para differential methylated regions) se realizó utilizando el paquete mCSEA (173), que es un paquete R basado en el método Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) para identificar DMRs de Illumina Infinium 450K y datos de matriz EPIC y es especialmente útil para detectar diferencias sutiles, pero consistentes, de metilación en fenotipos complejos entre grupos (pacientes no sépticos en UCI, pacientes con sepsis y shock séptico). Para cada una de las posibles comparaciones entre grupos, se obtuvieron

las regiones diferencialmente metiladas ubicadas en genes y promotores, utilizando un valor de p ajustado (FDR) de corte de 0,05.

Además, se utilizó el paquete DMRcate para obtener sitios CpG metilados diferencialmente entre los 3 grupos (pacientes de UCI, sepsis y Shock séptico) considerando un umbral de FDR de 0,05. La comparación de control de choque, que muestra un gran número de CpG metilados diferencialmente, se anotó luego como DMR.

Finalmente, el análisis funcional se realizó utilizando el paquete clusterProfiler (174) mediante un análisis de sobrerrepresentación (ORA), que se aplicó a los conjuntos DMR obtenidos por ambos enfoques (mCSEA y DMRcate). Estos DMR se enriquecieron en términos de GO, así como en rutas de KEGG, lo que resultó en procesos biológicos y rutas metabólicas sobrerrepresentadas.

Todos los pasos computacionales se realizaron utilizando scripts R de diseño propio optimizados en la Unidad de Bioinformática y Diagnóstico Computacional de EpiDisease S.L.

4.21. Validación de la metilación de genes candidatos por pirosecuenciación

La pirosecuenciación es una tecnología que permite determinar el orden de una secuencia de ADN mediante luminiscencia. Se basa en el principio de la secuenciación por síntesis en el que se detecta la incorporación de nucleótidos al ADN por acción de la ADN polimerasa. La particularidad de este método es que detecta la liberación de pirofosfato cuando los nucleótidos son incorporados. A partir del pirofosfato se generará luz por medio de diversas reacciones enzimáticas en cadena. En los últimos años la pirosecuenciación ha ganado relevancia en el análisis de la metilación del ADN. Para ello, después de la amplificación mediante PCR, la pirosecuenciación es utilizada para determinar los nucleótidos convertidos por el bisulfito. El tratamiento del ADN con bisulfito convierte los residuos de citosina a uracilo pero no afecta a los residuos de 5-metilcitosina. Por lo tanto, el ADN tratado con bisulfito solo mantiene las citosinas

metiladas, mostrando información acerca del estado de metilación de un segmento de ADN a nivel de nucleótido.

Para realizar el análisis, se obtuvo ADN a partir de PBMCs como se ha descrito previamente. Posteriormente, a este ADN se le realizó un tratamiento de conversión con bisulfito, como se ha explicado en el paso anterior, utilizando el kit “EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). A continuación, 5µL de ADN convertido con bisulfito se amplificaron mediante PCR, y posteriormente se realizó el análisis por pirosecuenciación para analizar los niveles de metilación de cada citosina en los promotores de los genes seleccionados, utilizando el kit “PyroMark PCR Kit” (Qiagen, Hilden, Alemania). Para ello, se diseñaron primers tanto de ampliación por PCR, como primers de pirosecuenciación (Tabla 4). Posteriormente se cargó 10µl del ADN amplificado por PCR y 3µl de Beads magnéticas. Las condiciones de la pirosecuenciación utilizadas fueron las estándar proporcionadas por el equipo. Específicamente, el protocolo seguido fué:

1. Sacar las bolas magnéticas (Ref. 182974203) de 4°C justo antes de usarlas
2. Vortearlas.
3. Utilizar una pipeta multi-dispensación para dispensar un máximo de 4 pocillos cada vez ya que precipitan muy rápidamente.
4. Dispensar 3 µl de bolitas magnéticas.
5. Descartar las bolitas que queden al final de las 4 dispensaciones.
6. Repetir el vorteado del vial de bolitas antes de cada pipeteo.
7. Añadir 10 µl del ADN amplificado en la suspensión de bolitas magnéticas. El software indica la posición de cada muestra, o utilizar la plantilla PreRun.

El equipo usado fue el Pyromark Q48 autoprep. El diseño de los primers se realizó utilizando el software “PyroMark Assay Design 2.0”. Los parámetros utilizados para el diseño consistieron en; tamaño del primer entre 18-30 nucleótidos, tamaño óptimo del amplicon: 60-120 nucleótidos, concentración de primer: 0,2µM, T^a de hibridación: 50-

72°C, máxima diferencia de hibridación entre primers permitida: 10°C, máxima diferencia de %GC: 50.

El diseño del análisis de pirosecuenciación y el diseño de las placas se realizó utilizando el software “Pyromark Q48 Autoprep”.

Tabla 4. Set de primers utilizados en los experimentos de pirosecuenciación.

Gen	Primer Forward PCR	Primer Reverse PCR	Primer Pirosecuenciación
IL10	GTTGATTTTTGGGA GAATAGTT	AAAACCCAATTATT CTCAATCCCATTAT	GGGGAGAAATAGTTG TT
IL17	GTGAGATGTTTGTT GATTGGATTAGAT	ACCAAAACTTCATT TCCTATCC	TGTTGATTGGATT AGATAGTA
IL18	GGTATAGGTTTGAA GGTATAGAG	CTTAAACCCCCCTTC AAACAAACTCTT	TGGAAGGTATAGAG TTTAA
IFGR2	GGGGGAGAGTTGAAA GTTTAA	TAAAACCCCCACCCC TCCTAA	TGGGGGTTATTAAA GTAAA
TREM2	GGGAGAATATGTAGTG TTTGTATATAAAAG	ACTCTATCATTATTCC CATACTAAACTTT	AGTTAGGGAAAAAA GATG

4.22. Análisis estadístico

La estadística se calculó con SPSS v23 y para los gráficos se utilizó el software Prism v9 (Software Inc. CA, EE. UU.). Los valores se expresaron como media \pm SEM. Se utilizó un análisis de varianza unidireccional para determinar la diferencia entre grupos en los experimentos *in vitro*. Cuando se encontró un efecto de interacción, se realizaron múltiples comparaciones utilizando la prueba post hoc del método Scheffé. Se consideró significancia a * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$, como se indicó en cada caso.

Para los estudios realizados en las muestras clínicas provenientes de los pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos, la normalidad de las muestras se determinó con la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y las muestras no siguieron una distribución gaussiana. Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para analizar las diferencias entre dos grupos no apareados con un nivel de significancia de 0.05. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para analizar las diferencias entre los

controles de la UCI, los pacientes con sepsis y SS, seguida de una prueba post hoc con la corrección de Bonferroni para α ($0,05 / 3$). Para el análisis de correlación entre variables se utilizó la prueba rho de Spearman.

5. Resultados

5.1 Inducción de hiperacetilación en histonas humanas

La hiperacetilación de histonas humanas se llevó a cabo en células HeLa empleando el reactivo SAHA (Vorinostat) como se indica en la sección Materiales y métodos.

Para analizar la mejor concentración para el tratamiento con SAHA se realizaron tratamientos a las 24h de la siembra celular con diferentes concentraciones de este inhibidor de histonas desacetilasas (HDACi).

La purificación de las histonas se realizó como se describió anteriormente (Materiales y métodos). Los niveles de histonas hiperacetiladas se determinaron analizando los niveles de H2AK5ac, H3K9ac y H4K8ac mediante Western Blot (Figura 8A).

Los resultados obtenidos mostraron niveles más elevados de histonas hiperacetiladas H2A (Lys5), H3 (Lys9) y H4 (Lys8) para las células HeLa tratadas con 50 μ M y 100 μ M de SAHA (Figura 8B).

En base a estos resultados se decidió que para los siguientes experimentos se utilizaría SAHA 50 μ M debido a la alta relación de histonas hiperacetiladas que se obtuvieron en comparación con el control y 25 μ M, y para evitar la alta toxicidad celular obtenida con SAHA 100 μ M (Figura 8C).

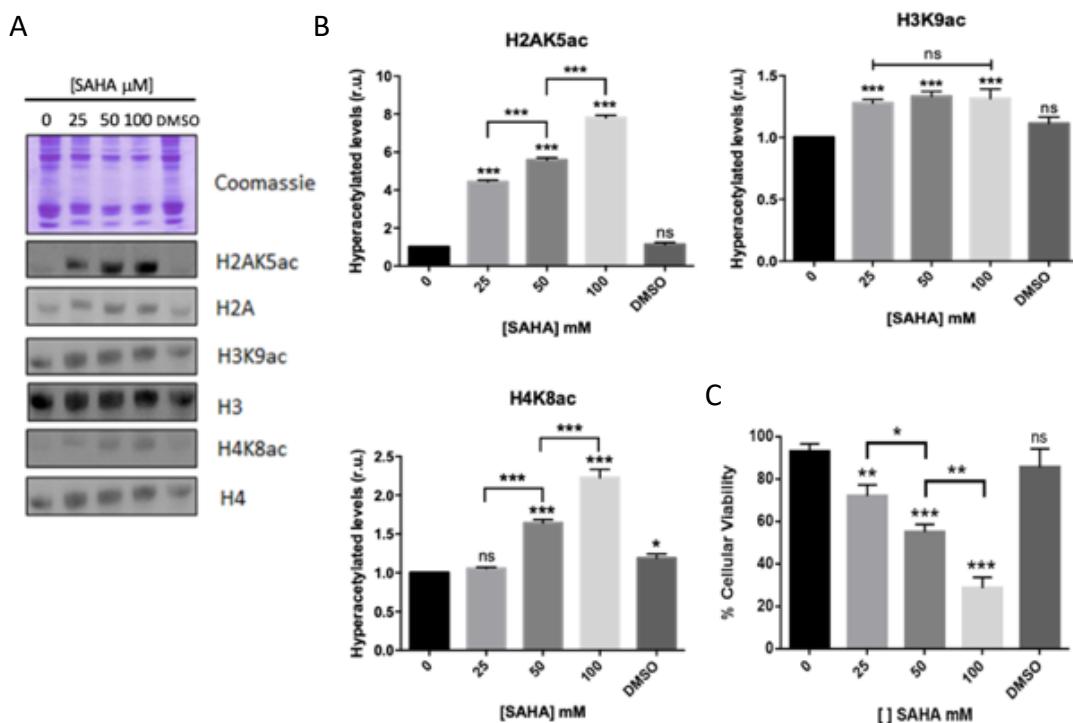


Figura 8. Análisis de hiperacetilación de histonas con tratamiento SAHA. (A) Análisis de hiperacetilación de histonas mediante Western blot (WB) usando SDS-PAGE al 15%. (B) Viabilidad celular de células HeLa tratadas con SAHA (C) Niveles de acetilación de histonas relativos analizados por WB usando anti-H2AK5ac, anti-H395ac y

anti-H4K8ac. Los niveles de histonas H2A, H3 y H4 totales se utilizaron como normalizadores en la densitometría de cada banda específica. Los datos se expresan como media \pm SEM de tres experimentos independientes. ns = p-valor no significativo; * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 frente a histonas 0 μ g/mL. Las líneas en la parte superior de las columnas indican diferencias entre las condiciones comparadas.

5.2 Las histonas extracelulares humanas inducen alteraciones en los patrones de muerte, adhesión y agregación celular en HUVEC

El análisis sobre el efecto citotóxico que poseen las histonas extracelulares humanas en HUVEC, en condiciones nativas e hiperacetiladas, se evaluó utilizando extractos de histonas purificados a concentraciones de 0, 2, 5, 10, 25 y 50 μ g/mL (Figura 9) definidos en base a los experimentos preliminares realizados por nuestro grupo y otros autores (93,96,175).

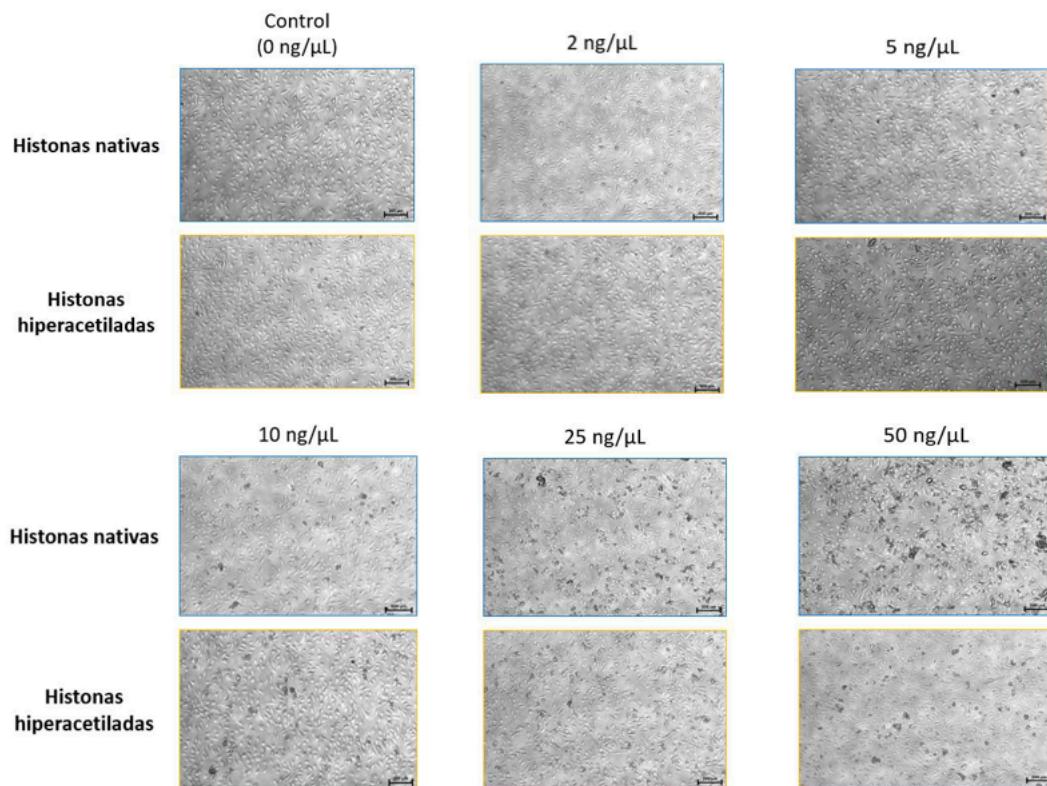


Figura 9. Análisis de la citotoxicidad mediada por histonas nativas e histonas hiperacetiladas sobre células endoteliales humanas (HUVEC) con un tiempo de tratamiento t = 4 horas. Las células tratadas con histonas extracelulares en condiciones nativas se muestran en las fotografías con el borde azul, mientras que las células tratadas con histonas hiperacetiladas se muestran en las fotografías con el borde naranja. Imágenes representativas de un único campo. Objetivo 10X. Microscopio: microscopio invertido Leica BM1RB (Leica Microsystems, Manheim, Alemania). N=5.

Los resultados obtenidos indicaron una mayor citotoxicidad en HUVEC cuando las células fueron incubadas con las histonas nativas. El efecto citotóxico es visible desde las primeras concentraciones con las que son tratadas las HUVEC y se apreció una mayor mortalidad y agregación celular a medida que se aumentó la concentración de las histonas extracelulares. En cambio, las imágenes de microscopía de campo claro mostraron una menor citotoxicidad para las HUVEC incubadas con histonas hiperacetiladas, con lo que se observó que la acetilación, como PTMs en histonas, posee un efecto citotóxico menor que las histonas nativas en células endoteliales humanas. Así mismo, las imágenes demuestran que las HUVEC tratadas con histonas nativas tienden a alterar sus patrones de adhesión y a una mayor agregación celular, efecto mucho menos pronunciado cuando se tratan las HUVEC con histonas hiperacetiladas a las mismas concentraciones.

5.3 Las histonas extracelulares humanas inducen muerte celular a través de mecanismos de apoptosis y piroptosis en HUVEC

El análisis sobre los mecanismos moleculares mediados por las histonas extracelulares humanas, en condiciones nativas e hiperacetiladas, sobre las HUVEC se evaluó por citometría de flujo, utilizando las mismas concentraciones anteriores de 0, 2, 5, 10, 25 y 50 μ g/mL de histonas extracelulares nativas e hiperacetiladas (Figura 10).

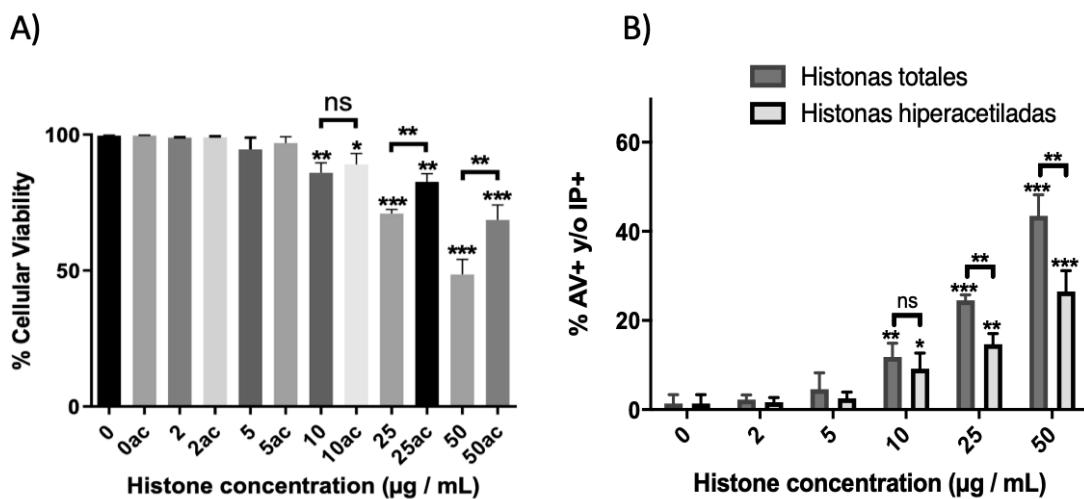


Figura 10. Análisis de la viabilidad celular y los mecanismos de muerte celular mediados por las histonas extracelulares nativas e hiperacetiladas (ac). A) Viabilidad celular. B) Muerte celular, analizada como AV positiva y/o Ioduro de Propidio positivo.

Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo mostraron una viabilidad celular disminuida que se correspondió con un aumento de la señal en las células positivas para la

anexina V- (AV) y / o yoduro de propidio (PI), de 10 μ g/mL a 50 μ g/mL después de la exposición de HUVEC a las histonas nativas o hiperacetiladas en comparación con la condición control (0 μ g/mL) (Figura 10A y Figura 10B, respectivamente). En particular, las HUVEC tratadas con 50 μ g/mL de histonas nativas indujeron más células positivas para AV/PI que las tratadas con histonas hiperacetiladas, es decir, mayor muerte celular.

Aunque, *a priori*, se asume que las células positivas para AV son células apoptóticas en los primeros estadios, y que las células positivas para AV + PI están en una fase de apoptosis tardía, es conocido que la piroptosis también es positiva para AV y PI, y por ello es detectada mediante citometría de flujo como apoptosis tardía (176), por lo que la mortalidad observada podría deberse tanto a mecanismos de apoptosis como de piroptosis. Con el fin de caracterizar molecularmente los mecanismos de muerte celular observados, se midió la actividad de caspasa-1 (CSP-1) (Figura 11A) y la expresión de caspasa-3 (CSP-3) activada (Figura 11B y Figura 11C) como marcador de piroptosis y apoptosis, respectivamente (177,178).

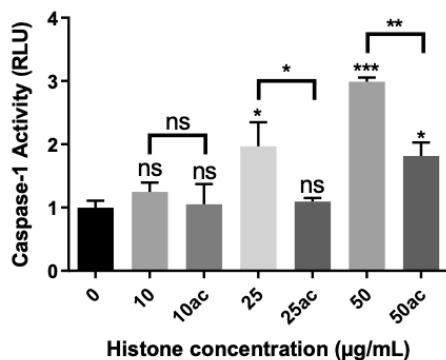
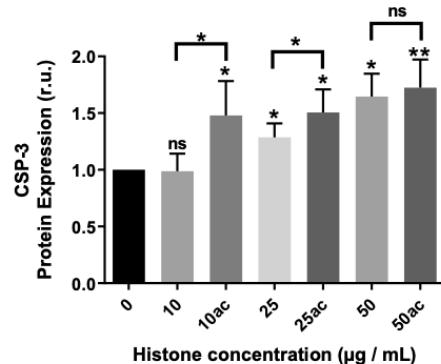
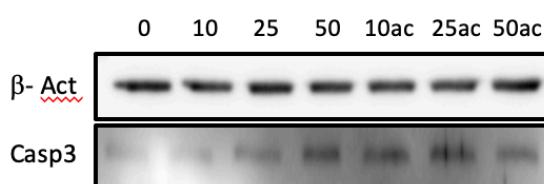
A**B**

Figura 11. Análisis del efecto de la exposición por parte de células HUVEC a histonas extracelulares en condiciones nativas e hiperacetiladas (ac). A) Actividad de caspasa-1 medida usando el kit de reactivos Caspase-Glo® 1 (Promega); (B) Niveles de proteína de caspasa- determinados por WB; (C) Niveles de proteína caspasa-3 en relación con β -actina determinados por densitometría de bandas específicas en la membrana del WB.

Nuestros resultados indicaron que las HUVEC activaron mecanismos de piroptosis y apoptosis tras su exposición a las histonas extracelulares humanas. En consecuencia, 50 μ g/mL de histonas extracelulares, tanto nativas como hiperacetiladas, mostraron los niveles más altos de expresión de CSP-3 (Figura 11D y Figura 11E). Sin embargo, se observó la activación de CSP-1 en HUVEC expuestas a 25 μ g/mL de histonas nativas, pero no en las expuestas a histonas extracelulares hiperacetiladas. Cuando se trataron las HUVEC con 50 μ g/mL de histonas nativas e hiperacetiladas, la CSP-1 demostró estar activa en ambas condiciones, pero en menor grado en las HUVEC expuestas a histonas hiperacetiladas (Figura 11C).

5.4 Caracterización de la piroptosis y sus productos.

Debido a que las histonas extracelulares demostraron ser capaces de aumentar los niveles de CSP-1 activada en un modelo de células endoteliales primarias, y que esta se correlacionaba con el aumento de la citotoxicidad celular, se decidió analizar los productos de la piroptosis para comprobar si este aumento en la actividad de CSP-1 se traducía en un aumento de las ILs piroptóticas. Es decir, si el aumento de CSP-1 se traducía directamente en un aumento de la muerte celular mediante piroptosis (ver Figura 4).

Para ello, se analizaron los niveles de expresión tanto de las ILs piroptóticas producidas por la vía canónica (IL-1 β y IL-18) como la producida por la vía no canónica (IL-1 α). Así mismo, dado que la actividad de la CSP-1 está regulada por el inflamasoma, se decidió caracterizar el tipo de inflamasoma que estaba mediando la activación de la CSP-1. Específicamente se evaluó NLRP3, debido a que es el inflamasoma mejor caracterizado, el que se activa bajo mayor número de estímulos y es el único, junto con NLRP1, que se ha demostrado que es capaz de activarse por DAMPs como las histonas extracelulares (179,180).

Los resultados demostraron que las células expuestas a las histonas extracelulares nativas poseían niveles de expresión muy elevados en todas las ILs piroptóticas (Figura 12A, Figura 12B y Figura 12C), siendo menores los niveles de expresión de las células endoteliales expuestas a las mismas condiciones de histonas extracelulares hiperacetiladas (Figura 12A, Figura 12B y Figura 12C). Estos resultados demostraron que los niveles elevados de CSP-1 se traducen en un incremento de la expresión de IL-1 α , IL-1 β y IL-18, y por ello en un aumento de la muerte celular, principalmente a través de mecanismos de piroptosis (Figura 12D). Así mismo, los niveles de expresión proteica del inflamasoma NLRP3 fueron más elevados en las células endoteliales expuestas a histonas extracelulares nativas. De hecho, las HUVEC

expuestas a histonas extracelulares hiperacetiladas no mostraron cambios significativos en los niveles de expresión de NLRP3 (Figura 12D).

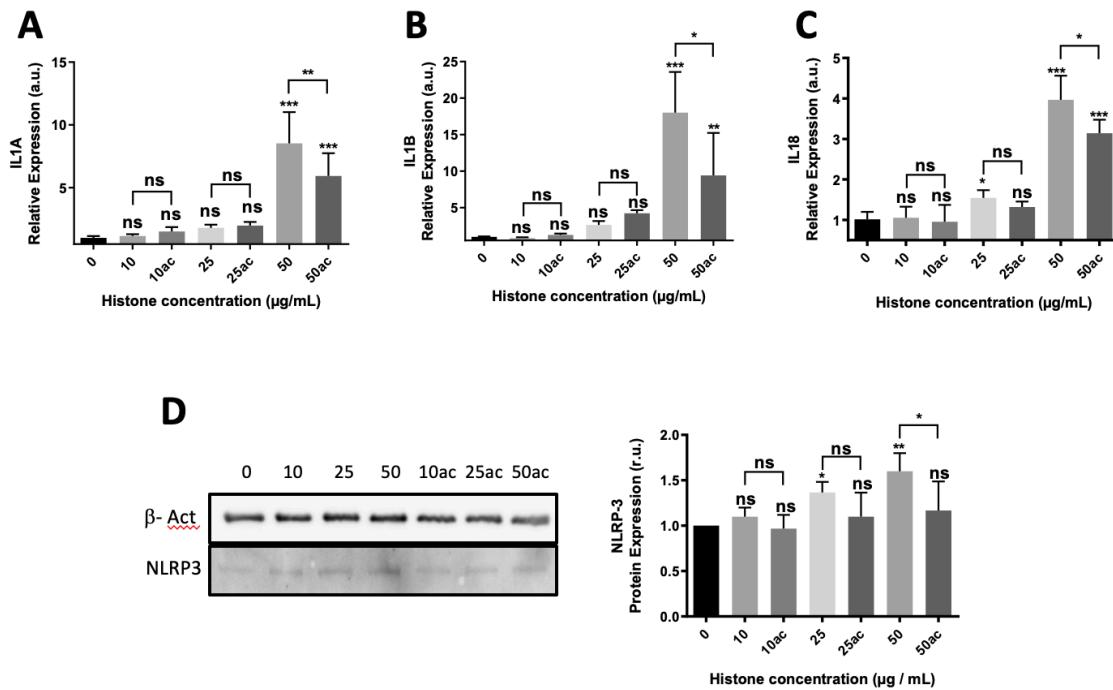


Figura 12. Efecto de las histonas extracelulares sobre la apoptosis, la piroptosis y el inflamasoma después de la incubación con histonas extracelulares nativas o hiperacetiladas (ac): (A) Expresión del gen de IL1A determinada por RT-qPCR. B-C) Expresión relativa de citoquinas inflamatorias como marcadores de activación de la piroptosis; (B) IL1B; (C) IL18; (D) Niveles de inflamasoma NLRP3 en relación con β -actina determinados por densitometría de bandas específicas en la membrana de WB. Los datos se expresan como media \pm SEM de 3-5 experimentos independientes. ns = p-valor no significativo; * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001 en comparación con histonas 0 $\mu\text{g/mL}$. Las líneas en la parte superior de las columnas indican diferencias entre las condiciones comparadas.

5.5 Las histonas extracelulares inducen estrés oxidativo, mediando despolarización de la membrana plasmática y alterando la respuesta enzimática antioxidante en HUVEC.

El estrés oxidativo es uno de los inductores de muerte celular por excelencia, habiéndose demostrado su papel en multitud de procesos citotóxicos como la apoptosis o la necrosis (181). Así mismo, varios autores han demostrado la interconectividad entre el estrés oxidativo, la activación de NLRP3 y la inflamación (175,182). Por ello, medimos los marcadores de estrés oxidativo, el potencial de membrana y los niveles de enzimas antioxidantes en HUVEC, tras ser expuestas a las histonas extracelulares nativas e hiperacetiladas.

Nuestros resultados mostraron que las histonas extracelulares nativas indujeron estrés oxidativo en HUVEC debido al aumento de los niveles de proteínas carboniladas totales y la forma oxidada de Peroxiredoxina-6 (Prdx6) (Figura 13A Figura 13B). Estos resultados indican que las histonas nativas indujeron más daño por estrés oxidativo que las histonas hiperacetiladas, probablemente como consecuencia del aumento del potencial de membrana, que indujo una despolarización de la membrana en las HUVEC, como demuestran nuestros resultados (Figura 13C). Asimismo, observamos que las histonas extracelulares nativas inducían una alteración en el potencial de membrana (despolarización) de manera dosis-dependiente, al contrario que las histonas hiperacetiladas, que no modificaban el potencial de membrana celular (Figura 13C). Cuando analizamos la respuesta frente al estrés oxidativo, los niveles de ARNm de las enzimas antioxidantes que reducen al radical superóxido (es decir, superóxido dismutasa 1 (SOD1), superóxido dismutasa 2 (SOD2)) así como las enzimas antioxidantes que eliminan el peróxido de hidrógeno (es decir, la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa 1 (GPX1)) aumentaron de manera dosis-dependiente (Figura 13D). Asimismo, los niveles proteicos de las enzimas antioxidantes fueron más altos en HUVEC expuestas a las histonas nativas que en aquellas células expuestas a las histonas hiperacetiladas (Figura 13E, Figura 12F). Los niveles más bajos de marcadores de estrés oxidativo y la menor inducción de enzimas antioxidantes en HUVEC expuestas a histonas hiperacetiladas sugieren que la hiperacetilación producen un efecto deletéreo menor relacionado con el estrés oxidativo inducido por las histonas extracelulares.

Finalmente, para demostrar el control de los interruptores redox involucrados en la activación del inflamasoma y la piroptosis, las HUVEC fueron preincubadas durante 1 hora con 0,5mM y 1mM de glutatión etil-ester (GSH-EE) antes de la exposición de 4 horas a las histonas extracelulares (50µg/mL). Los resultados obtenidos demostraron que GSH-EE 1mM fue capaz de reducir la piroptosis mediada por las histonas extracelulares y también disminuyó la muerte celular (Figura 13G), así como también produjo una disminución en la producción de IL-1 α , IL-1 β e IL-18 como productos de la piroptosis (Figura 13H).

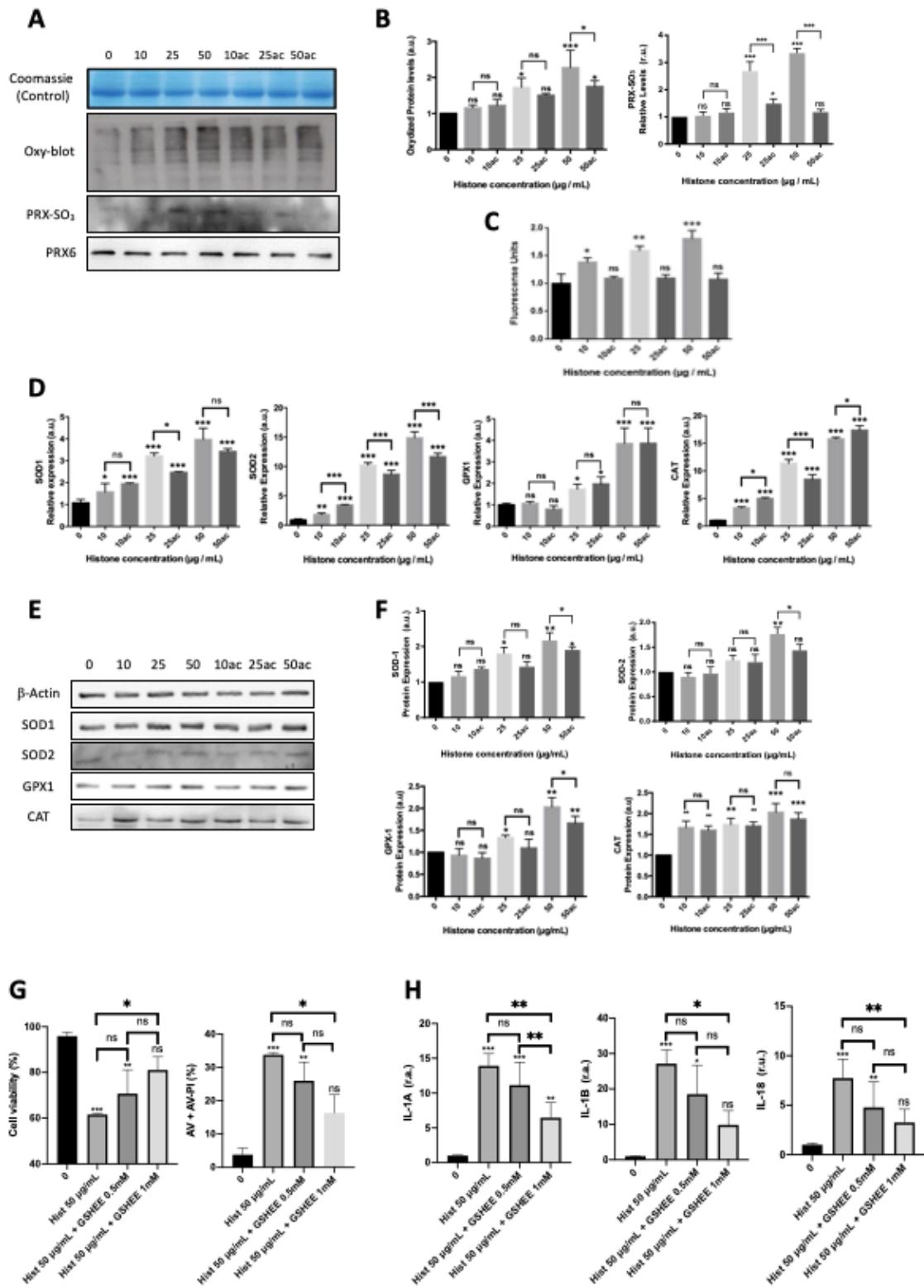


Figura 13. Análisis de marcadores de estrés oxidativo, potencial de membrana y defensas antioxidantes en HUVEC tratadas con diferentes concentraciones de histonas extracelulares nativas o hiperacetiladas. (A) Oxiplot de las proteínas carboniladas y WB para Prx6-SO3 oxidado, se usó el gel de azul Coomassie como control de carga para el oxiblot, y los niveles totales de PRX6 se usaron como referencia de su forma peroxidada; (B) Densitometría de los niveles relativos de proteínas carboniladas y Prx6-SO3 oxidado; (C) Potencial de membrana medido con la sonda

DIBAC mediante el uso de citometría de flujo después de contar 10.000 células por cada condición; (D) Expresión relativa de genes que codifican enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2, GPX1 y CAT) por RT-qPCR; (E) el WB de las enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2, GPX1 y CAT); (F) Expresión relativa de las enzimas antioxidantes cuantificada por densitometría de bandas específicas en la membrana WB, empleando β -actina como control de carga. (G) Viabilidad de las células HUVEC y células positivas a Anexina V/PI después de la incubación con GSH-EE y el tratamiento con histonas nativas analizadas por citometría de flujo después de contar 10.000 células por cada condición; (H) Niveles de expresión relativa de IL1A (izquierda), IL1B (centro) e IL18 (derecha) determinados por RT-qPCR. Los datos se expresan como media \pm SEM de 3-6 experimentos independientes. ns = p-valor no significativo; * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001 frente a histonas 0 μ g/mL. Las líneas en la parte superior de las columnas indican diferencias entre las condiciones comparadas.

5.6 Las histonas extracelulares afectan las vías de biosíntesis de prostanoïdes en HUVEC

La ciclooxygenasa-1 (COX-1) juega un papel importante en la generación de prostanoïdes durante la homeostasis vascular. La COX-2 es inducida por citoquinas proinflamatorias y estrés oxidativo, y es la principal fuente de biosíntesis de los prostanoïdes durante la inflamación (183). Nuestros resultados indicaron que las histonas extracelulares indujeron la sobreexpresión de COX1 y COX2 de manera dosis-dependiente (Figura 14A, Figura 14B, Figura 14C). Curiosamente, la expresión génica y los niveles de proteína de ambas ciclooxygenasas fueron más bajos en HUVEC tratadas con histonas hiperacetiladas que en las células tratadas con histonas nativas en las mismas condiciones (Figura 14A, Figura 14B, Figura 14C).

El endotelio vascular juega un papel clave en la regulación de la homeostasis vascular al controlar el tono vascular (184). Como las histonas extracelulares pueden mediar la muerte celular en HUVEC, es probable que las histonas extracelulares afecten la función propia de las células. En consecuencia, PGE₂ y TXB₂ son dos de los principales prostanoïdes vasculares responsables de mediar la relajación/contracción de los vasos sanguíneos. Son producidos respectivamente por la prostaciclina sintasa (PGIS) y la tromboxano sintasa (TBXAS). De forma aguda, la homeostasis vascular también depende del óxido nítrico (NO), producido por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS o NOS3), capaz de inducir rápidos cambios en la homeostasis vascular.

Con respecto a la síntesis de prostanoïdes, el aumento de los niveles de ARNm de PGIS (Figura 14D) se acompañó de una mayor cantidad de expresión proteica cuando las HUVEC fueron tratadas con 50 μ g/mL de histonas extracelulares (Figura 14E, Figura 14F, respectivamente). No obstante, a pesar del aumento en la expresión génica de TBXAS, en estas mismas condiciones, no se encontraron cambios en los niveles de proteínas.

Los niveles elevados de PGIS (Figura 14E, Figura 14F), pero no de TBXAS, cambiaron la relación PGIS/TBXAS (Figura 14G) lo que puede ocurrir en una alteración de la homeostasis

vascular. Además, las histonas extracelulares nativas disminuyeron la expresión de NOS3 en HUVEC (Figura 14H). Por el contrario, las histonas hiperacetiladas no disminuyeron los niveles de ARNm y proteínas para eNOS a concentraciones de histonas extracelulares por debajo de 50 μ g/mL (Figura 14E, Figura 14F, Figura 14I), sino que aumentaron los niveles de expresión de eNOS a 50 μ g/mL.

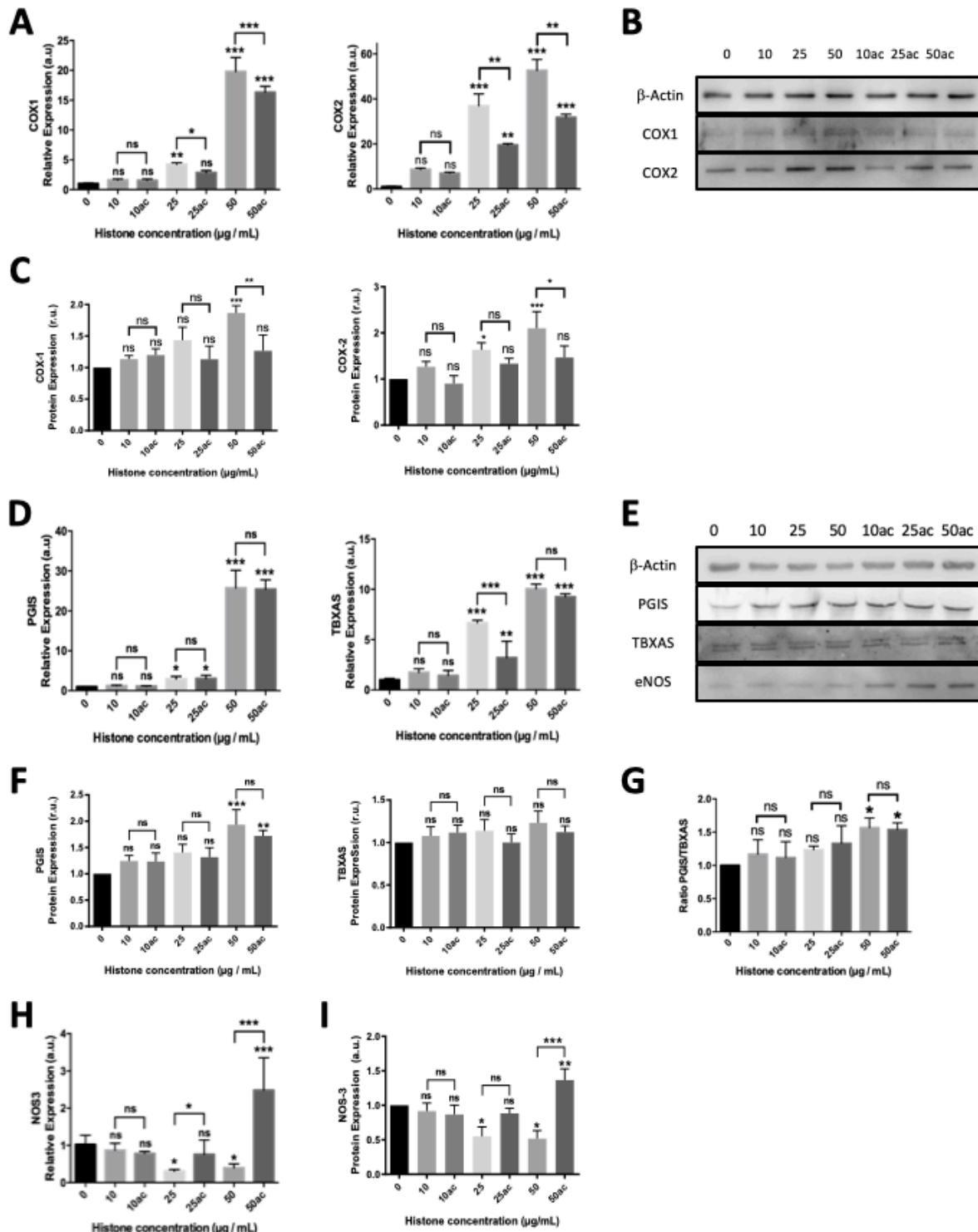


Figura 14. Las histonas extracelulares (nativas e hiperacetiladas) alteran las enzimas de producción de prostainoides de HUVEC a través de la regulación positiva de la vía COX - Prostanoides: (A) Expresiones relativas de COX1 y COX2 determinadas por qRT-PCR; (B) Imágenes WB representativas de COX-1 y COX-2 en HUVEC tratadas con histonas extracelulares durante 4h. Se utilizó β -actina como control de carga; (C) Niveles relativos de proteína COX1 y COX2 cuantificados por densitometría de bandas específicas en la membrana WB; (D) Niveles de expresión relativa de PGIS (izquierda) y TBXAS (derecha) determinados por qRT-PCR; (e) Niveles de proteína analizados por WB usando anti-PGIS, anti-TBXAS y anti-eNOS. Se utilizó β -actina como control de carga. Se muestra un experimento representativo de los tres realizados; (F) Niveles de proteína relativos de PGIS y TBXAS cuantificados

por densitometría de bandas específicas en la membrana de WB; (G) La relación PGIS/TBXAS de los niveles relativos de cada proteína evaluados por densitometría de bandas específicas en la membrana WB; (H) Niveles de expresión del gen NOS3 determinados por RT-qPCR; (I) Niveles relativos de eNOS de proteína cuantificados por densitometría de bandas específicas en la membrana de WB. La densitometría se evaluó mediante tres experimentos de WB independientes. Los datos se expresan como media ± SEM de tres experimentos independientes. ns = p-valor no significativo; * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001 en comparación con histonas 0µg/mL. Las líneas en la parte superior de las columnas indican diferencias entre las condiciones comparadas.

5.7 Las histonas extracelulares modifican los patrones de expresión de las moléculas de adhesión endotelial e inducen respuestas inflamatorias

La activación del inflamasoma NLRP3 en las células endoteliales después de la infección da lugar a una inflamación y desregulación de los factores de adhesión endotelial ICAM-1 y VCAM-1 (185).

Nuestros resultados indicaron que las concentraciones superiores a 25µg/mL de histonas extracelulares produjeron una sobreexpresión de IL6 (Figura 15A), que se relaciona con el aumento de ICAM1, VCAM1 y ESEL de una manera dosis-dependiente (Figura 15B, Figura 15C, Figura 15D). Nuestros resultados revelaron cómo la expresión de IL6 y diferentes moléculas de adhesión como ICAM1, VCAM1 y ESEL fueron menores en HUVEC tratadas con las histonas hiperacetiladas que con las histonas nativas, lo que indicó que la hiperacetilación puede reducir la señalización celular involucrada en la inflamación y la expresión de estas moléculas.

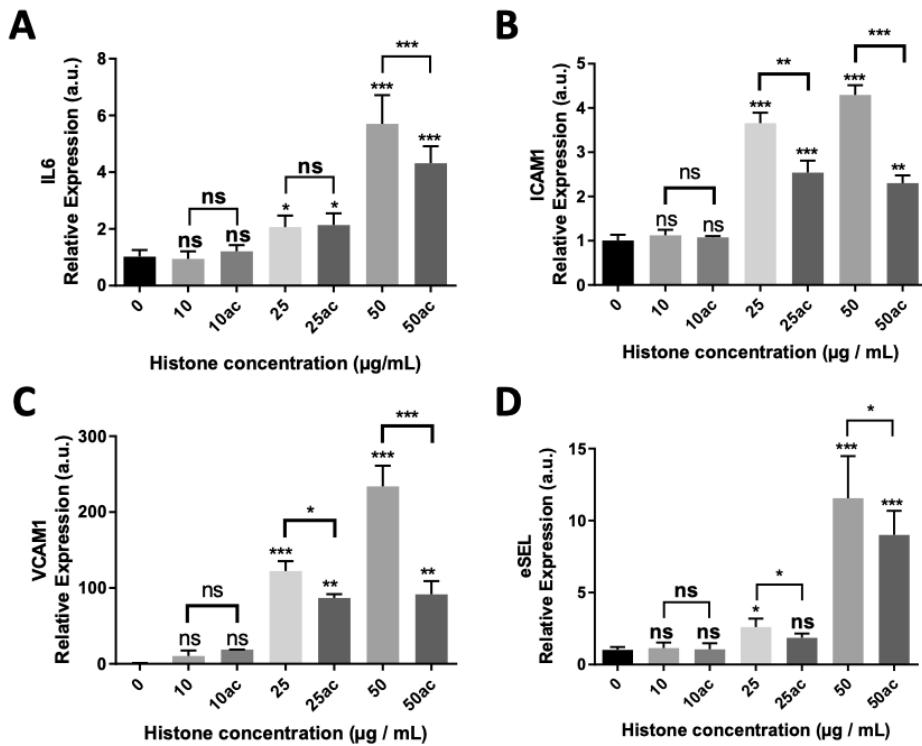


Figura 15. Expresión de factores de adhesión proinflamatorios y endoteliales en HUVEC expuestas a 10-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de histonas extracelulares (nativas e hiperacetiladas) durante 4h. Expresión relativa de (a) IL6; (b) ICAM1; (c) VCAM1 y (d) niveles de expresión del gen eSEL determinados por qRT - PCR. Los datos se expresan como media \pm SEM de tres experimentos independientes. ns = p-valor no significativo; * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001 frente a histonas 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las líneas en la parte superior de las columnas indican diferencias entre las condiciones comparadas.

5.8 La inhibición del inflamasoma previene los efectos posteriores mediados por histonas extracelulares en HUVEC

La apoptosis secundaria se identifica mediante señales positivas de Anexina V (AV) y PI, tal como ocurre con la piroptosis. En este sentido, para confirmar el papel que juegan tanto la apoptosis como la piroptosis en HUVEC cuando se exponen las células a las histonas extracelulares, analizamos por citometría de flujo la viabilidad celular incubando HUVEC con histonas extracelulares y dos inhibidores específicos, Z-LEHD-FMK (LEHD) un inhibidor de la apoptosis específico al bloquear la CSP-9 y MCC950, que inhibe el ensamblaje del inflamasoma NLRP3, inhibiendo así la piroptosis mediada por este inflamasoma.

Los resultados demostraron que las HUVEC pre-tratadas con LEHD recuperaron parte de la viabilidad celular cuando se trataron las células con histonas extracelulares nativas, lo que indica que están implicada la apoptosis como mecanismo que media la muerte celular en HUVEC (Figura 16A), como hemos demostrado anteriormente. Sin embargo, la mayor

viabilidad celular se recuperó cuando las HUVEC se trataron con MCC950, lo que indicó que el mecanismo que media la muerte celular a nivel endotelial por parte de las histonas es principalmente la piroptosis (Figura 16B), concretamente a través de NLRP3. No obstante, la apoptosis juega un papel más importante que la piroptosis cuando las HUVEC se expusieron a histonas extracelulares hiperacetiladas, ya que apenas hubo un efecto significativo en la viabilidad celular y muerte celular cuando se usó el fármaco MCC950 (Figura 16B, Figura 16C).

Para confirmar el bloqueo de la piroptosis cuando se inhibe el inflamasoma NLRP3, medimos los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias liberadas por el inflamasoma y demostramos que las HUVEC tratadas con MCC950 redujeron la expresión de las interleuquinas proinflamatorias IL1A, IL1B e IL18 (Figura 16D, Figura 16E, Figura 16F, respectivamente).

Con respecto a la respuesta antioxidante tras inhibir el inflamasoma, nuestros resultados demostraron solo una reducción estadísticamente significativa en la expresión de SOD2, lo que sugiere el papel de las histonas extracelulares en la mediación de la producción de superóxido mitocondrial (Figura 16). Además, también evaluamos los efectos en la función endotelial y la respuesta inmune mediada por el endotelio en HUVEC tras inhibir el inflamasoma. Nuestros resultados indicaron una disminución en la expresión de PGIS y TBXAS y restauraron los niveles de NOS3 (Figura 16G, Figura 16H, Figura 16I, respectivamente), después de inhibir el inflamasoma en HUVEC incubadas con las histonas nativas. Así mismo, también se observó una expresión disminuida de COX1 y COX2 tras exponer a las células al inhibidor del ensamblaje del inflamasoma MCC950 y tratarlas con histonas hiperacetiladas (Figura 16), en comparación a cuando sólo fueron expuestas a histonas hiperacetiladas, sugiriendo una reducción del perfil inflamatorio en HUVEC. Estos resultados concuerdan con la expresión disminuida de la citoquina IL6 proinflamatoria observada después de inhibir el inflamasoma (Figura 16L). Además, dado que la sobreexpresión de IL6 se correlacionó con un aumento en las moléculas de adhesión endotelial, como se describió anteriormente, medimos nuevamente sus niveles de expresión tras inhibir el inflamasoma NLRP3 con el MCC950. Los resultados obtenidos demostraron que la inhibición del inflamasoma evitaba la sobreexpresión de factores de adhesión endotelial en HUVEC tratadas con histonas extracelulares nativas, ya que se consiguió restaurar los niveles de ICAM1 y VCAM1 a niveles similares a los de las HUVEC control (Figura 16M, Figura 16N) y reducir los niveles de eSEL (Figura 16O).

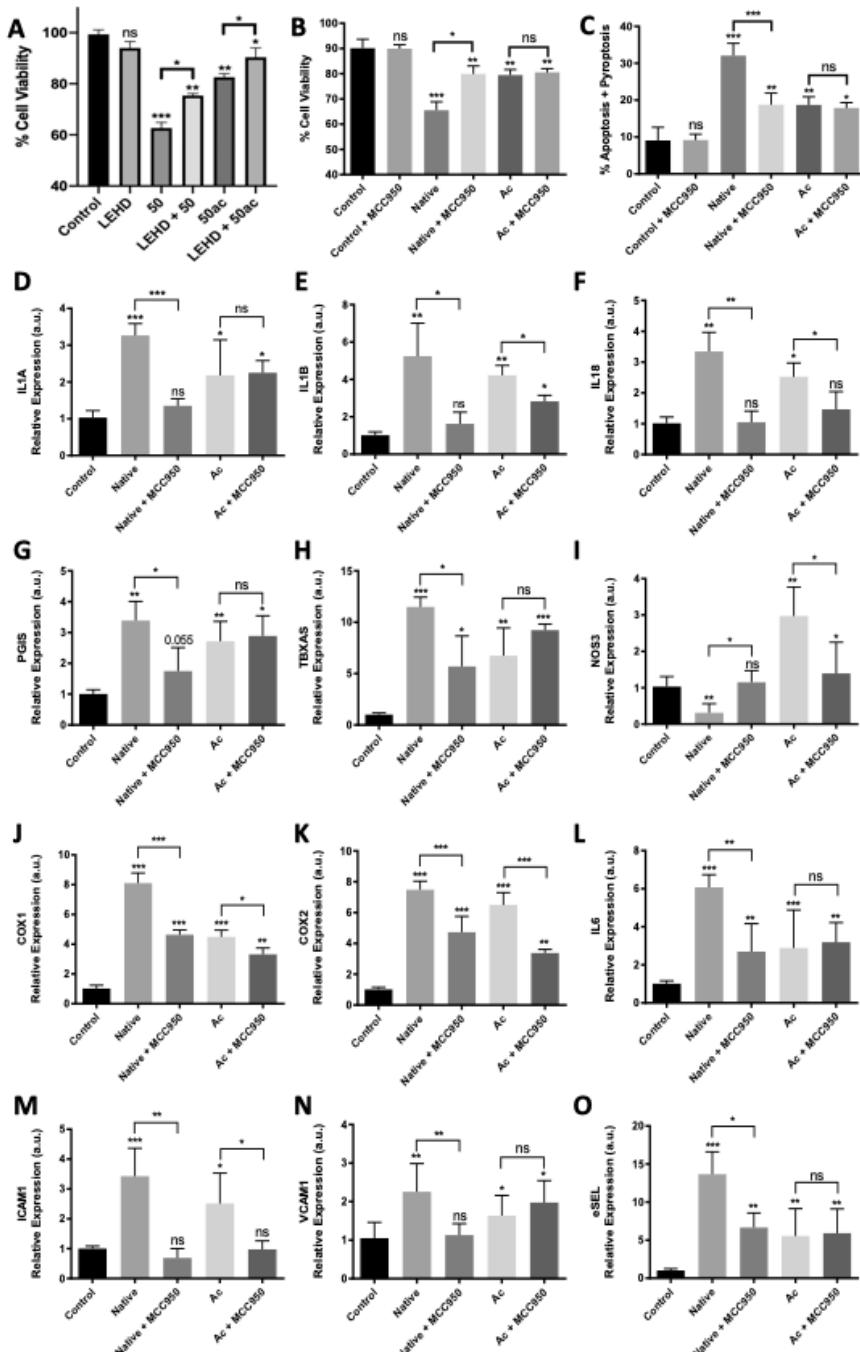


Figura 16. La inhibición del inflamasoma previene los efectos posteriores causados por histonas extracelulares en HUVEC: (A) viabilidad de las células HUVEC tratadas con inhibidor de LEHD; (B) Viabilidad de las células HUVEC tratadas con inhibidor de MCC950 (C) Apoptosis + piroptosis de HUVEC (medida como células positivas anexina V / PI) después de la exposición con histonas extracelulares durante 4h y MCC950 durante 6h (2 h antes de la exposición con 50 μ g/mL de histonas extracelulares); (D) expresión del gen IL1A; (e) expresión del gen IL1B; (F) IL18; (G) expresión del gen PGIS; (H) expresión del gen TBXAS; (I) expresión del gen NOS3; (J) expresión del gen COX1; (K) expresión del gen COX2; (L) expresión del gen IL6; (M) expresión del gen ICAM1; (N) expresión del gen VCAM1; (O) Expresión del gen ESEL medida por RT-qPCR. Los datos se expresan como media \pm SEM de tres experimentos independientes. ns = p-valor no significativo; * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001 en comparación con histonas 0 μ g/mL. Las líneas en la parte superior de las columnas indican diferencias entre las condiciones comparadas.

5.9 La piroptosis está activada en pacientes con shock séptico.

Entre los pacientes incluidos en el estudio, se analizaron treinta y nueve muestras, incluidos 9 voluntarios sanos, 6 pacientes críticos de UCI con eventos cerebrovasculares, 10 pacientes con sepsis y 15 pacientes con SS. La edad media de los sujetos sanos era de 47 ± 14 años, y los hombres representaban el 55,6% (ver la Tabla 5). La edad media de los controles en la UCI fue de 68 (68 ± 8), y los hombres representaron el 50%; la edad media de los pacientes sépticos fue de 68 (68 ± 11) y los hombres representaron el 55,6%; La edad media de los pacientes con SS era de 65 años (65 ± 15) y los hombres representaban el 73,3%. La Tabla 5 proporciona los datos clínicos detallados de los controles de la UCI, sepsis y pacientes con SS. La puntuación APACHE II no mostró diferencias entre los diferentes grupos de pacientes. El valor medio más alto de la puntuación SOFA lo presentaron los pacientes con SS (9 ± 3), siendo menor para los controles de la UCI (5 ± 3) y los pacientes con sepsis (6 ± 2). Los valores de marcadores más altos se encontraron para la PCR, la PCT y el lactato en SS en comparación con los otros grupos (ver Tabla 5).

Como proponemos las histonas como inductores de la piroptosis, en primer lugar medimos los niveles de las histonas circulantes en plasma mediante la técnica MRM-MS y el uso de péptidos marcados isotópicamente, como ya publicamos (105). Nuestros resultados demostraron que los pacientes con SS tenían los niveles más altos de histonas circulantes (Figura 17A). Específicamente, los pacientes controles mostraron unos niveles medios de histonas de $1,44 \pm 3,99\mu\text{g/mL}$, los pacientes de UCI mostraron unos niveles medios de histonas de $5,41 \pm 8,39\mu\text{g/mL}$, los pacientes sépticos de $40,24 \pm 72,57\mu\text{g/mL}$ y los pacientes de SS de $1381,95 \pm 2297,15\mu\text{g/mL}$. Respecto a la IL-1 β , se observó que tendía a aumentar con la gravedad de la enfermedad, aunque no observamos niveles estadísticamente significativos. (Figura 17C). Sin embargo, la CSP-1 circulante (Figura 17B) y la citoquina IL-18 liberada por piroptosis (Figura 17D) e IL-1 α (Figura 17E) fueron más altas en pacientes con SS en comparación con sépticos y pacientes de UCI. Los resultados demostraron que ambos tipos de piroptosis ocurren simultáneamente en la sepsis: piroptosis canónica a través de IL-18 y piroptosis no canónica a través de IL-1 α .

Tabla 5. Datos clínicos de los pacientes de UCI, con sepsis y con SS.

Características de los participantes	Pacientes UCI (n=6)	Sepsis (n=10)	Shock séptico (n=15)	P valor
Edad (años) (media±SD)	68±8	68±11	65±15	n.s
APACHE II (media±SD)	15±4	18±7	23±7	n.s
SOFA 1 ^{er} día (media±SD)	5±3	6±2	9±3	0,004
CRP (mg/L) (media±SD)	8,2±8,7	225,3±153,7	277,1±130,5	0,003
Procalcitonina (ng/mL) (media±SD)	0,5±0,8	7,4±9,7	41,2±32,7	0,005
Lactato 1 ^{era} hora (mmol/L) (media±SD)	1,9±0,3	1,9±1,2	5,9±4,7	0,009

Además, analizamos las correlaciones entre los niveles de histonas circulantes, CSP-1, IL-18 e IL-1 α y observamos una correlación positiva estadísticamente significativa entre ellos y los niveles de histonas circulantes (Tabla 6). Los niveles de histonas circulantes mostraron una correlación positiva estadísticamente significativa con los niveles de SOFA y lactato, lo que sugiere el papel de las histonas circulantes con la gravedad de la SS y un mal pronóstico. La CSP-1 e IL-18 circulantes, marcadores de piroptosis, mostraron una correlación estadísticamente positiva significativa con las puntuaciones SOFA y los niveles de lactato (Tabla 6).

Al analizar los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias relevantes en la sepsis, como IL-6 (Figura 17F), TNF α (Figura 17G) e IL-8 (Figura 17H), observamos que los pacientes con SS tenían los niveles más elevados. Así mismo, también medimos los niveles de los factores de adhesión endotelial en plasma, como sl-ICAM-1 (Figura 17I) y e-SEL (Figura 17J) y encontramos que los pacientes con SS tenían los valores más altos para ambos mediadores de la función endotelial.

Finalmente, analizamos las correlaciones entre los niveles de histonas circulantes, las citoquinas proinflamatorias y los factores de adhesión molecular. Nuestros resultados revelaron una correlación entre las histonas circulantes e IL-6, ICAM-1 y e-SEL (Tabla 6). También observamos una positiva correlación estadísticamente significativa entre las interleuquinas

piroptóticas IL-1 α e IL-18 con la IL-6 proinflamatoria y los factores de adhesión endotelial (Tabla 6).

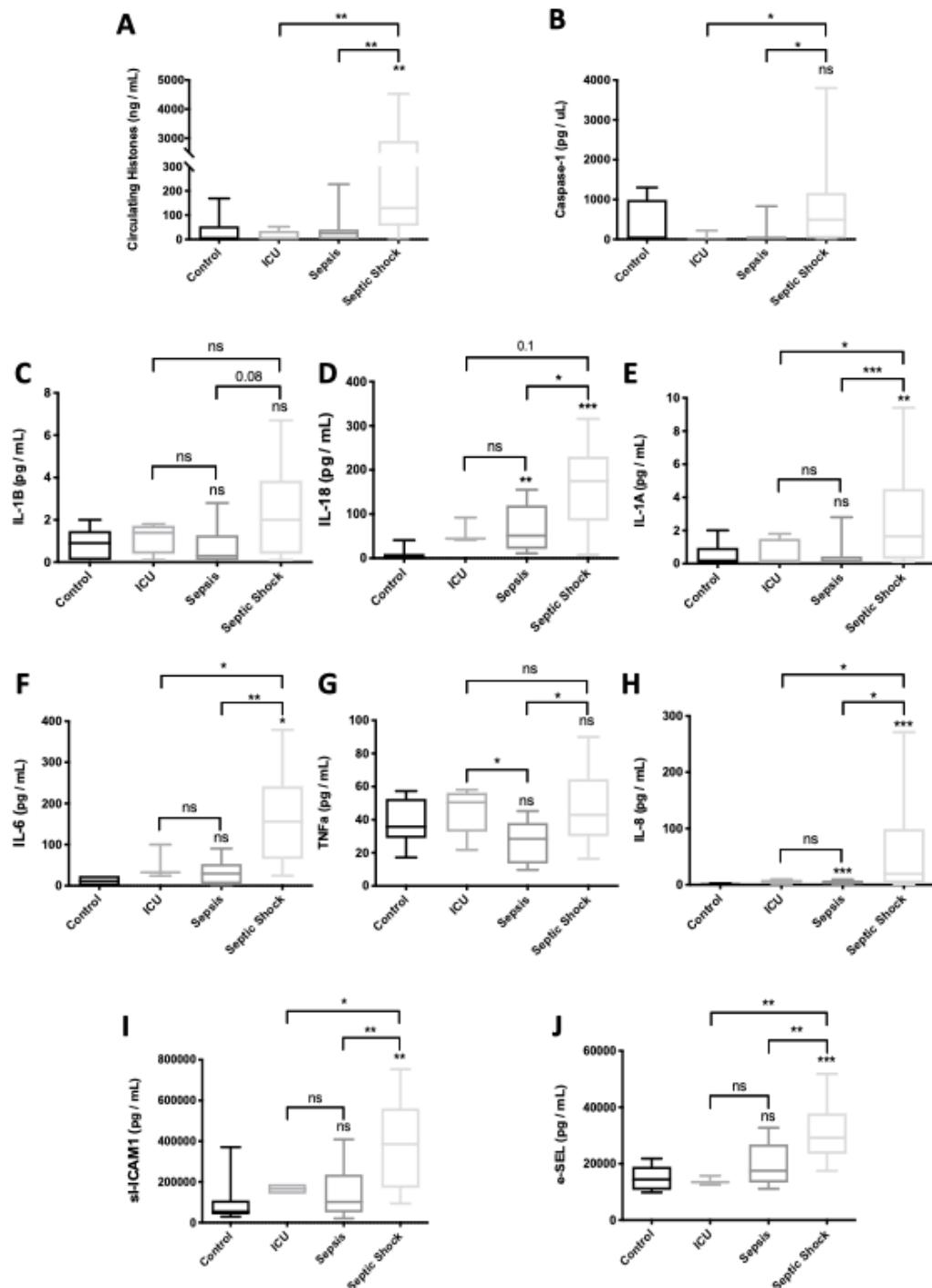


Figura 17. Niveles de marcadores circulantes en plasma de pacientes ingresados en UCI. (A) Niveles de histonas circulantes determinados por la suma de las concentraciones de H2B, H3 y H4 en plasma determinados por MRM-MS; (B) niveles de caspasa-1; (C) niveles de IL-1 β ; (D) niveles de IL-18; (E) niveles de IL-1 α ; (F) niveles de IL-6; (G) TNF α ; (H) IL-8; (I) niveles de sICAM-1; (J) niveles de e-SEL. Los datos se expresan como media \pm SEM de dos análisis independientes. ns = p-valor no significativo; * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001. Las líneas en la parte superior de las columnas indican diferencias entre las condiciones comparadas.

Tabla 6. Tabla de correlaciones entre histonas circulantes y los parámetros clínicos analizados.

		age	PCR	APACHE	SOFA	Lactate	Circulating Histones	PCA	e-SEL	ICAM-1	IL-1a	IL-1b	IL6	Caspase-1	IL18
age	correlation coefficient	-	-0.321	0.2	0.036	-0.277	neg 0,27	0.135	-0.349	-0.340	-0.108	0.128	-0.348	-0.021	0.279
	significance	-	0.096	0.299	0.854	0.154	0.886	0.469	0.087	0.097	0.608	0.543	0.088	0.920	0.159
PCR	correlation coefficient	-0.321	-	-0.076	0.126	0.154	0.288	-0.377	0.361	-0.132	0.367	0.01	0.373	-0.057	0.213
	significance	0.096	-	0.696	0.516	0.163	0.129	0.044*	0.076	0.530	0.071	0.962	0.066	0.788	0.306
APACHE	correlation coefficient	0.2	-0.076	-	0.723	0.388	0.411	-0.315	0.165	0.289	0.493	0.358	0.330	0.249	0.412
	significance	0.299	0.696	-	0.000**	0.038*	0.024*	0.09	0.430	0.161	0.012	0.079	0.107	0.229	0.036*
SOFA	correlation coefficient	0.036	0.126	0.723	-	0.457	0.4	-0.499	0.451	0.524	0.524	0.306	0.353	0.505	0.417
	significance	0.854	0.516	0.000**	-	0.013*	0.028*	0.005**	0.024*	0.007**	0.007**	0.137	0.083	0.01*	0.034*
Lactate	correlation coefficient	-0.277	0.163	0.5	0.457	-	0.588	0.05	0.495	0.409	0.393	-0.027	0.356	0.517	0.486
	significance	0.154	0.398	0.011*	0.013*	-	0.001**	0.981	0.012*	0.043*	0.052	0.898	0.081	0.008**	0.014*
Circulating Histones	correlation coefficient	-0.27	0.288	0.411	0.4	0.588	-	-0.299	0.510	0.557	0.586	0.096	0.545	0.469	0.633
	significance	0.886	0.129	0.024*	0.028*	0.001**	-	0.069	0.003**	0.001**	0.001**	0.608	0.002**	0.009**	0.000**
PCA	correlation coefficient	0.135	-0.377	-0.315	-0.499	0.05	-0.299	-	-0.406	-0.375	-0.368	-0.304	-0.588	-0.036	-0.299
	significance	0.469	0.044*	0.09	0.005**	0.981	0.069	-	0.023*	0.038*	0.042*	0.096	0.001*	0.852	0.086
e-SEL	correlation coefficient	-0.349	0.361	0.165	0.451	0.495	0.510	-0.406	-	0.550	0.480	0.144	0.501	0.332	0.427
	significance	0.087	0.076	0.430	0.024*	0.012*	0.003**	0.023*	-	0.001**	0.006**	0.439	0.004**	0.079	0.026*
ICAM-1	correlation coefficient	-0.340	-0.132	0.289	0.524	0.409	0.557	-0.375	0.550	-	0.372	0.196	0.405	0.189	0.412
	significance	0.097	0.530	0.161	0.007**	0.043*	0.001**	0.038*	0.001**	-	0.039*	0.291	0.024*	0.327	0.033*
IL-1a	correlation coefficient	-0.108	0.367	0.493	0.524	0.393	0.586	-0.368	0.480	0.372	-	0.449	0.699	0.361	0.539
	significance	0.608	0.071	0.012	0.007**	0.052	0.001**	0.042*	0.006**	0.039*	-	0.011*	0.000**	0.055	0.004**
IL-1b	correlation coefficient	0.128	0.01	0.358	0.306	-0.027	0.096	-0.304	0.144	0.196	0.449	-	0.561	0.134	0.214
	significance	0.543	0.962	0.079	0.137	0.898	0.608	0.096	0.439	0.291	0.011*	-	0.001**	0.489	0.283
IL6	correlation coefficient	-0.348	0.373	0.330	0.353	0.356	0.545	-0.588	0.501	0.405	0.699	0.561	-	0.070	0.570
	significance	0.088	0.066	0.107	0.083	0.081	0.002**	0.001*	0.004**	0.024*	0.000**	0.001**	-	0.719	0.002**
Caspase-1	correlation coefficient	-0.021	-0.057	0.249	0.505	0.517	0.469	-0.036	0.332	0.189	0.361	0.134	0.070	-	0.094
	significance	0.920	0.788	0.229	0.01*	0.008**	0.009**	0.852	0.079	0.327	0.055	0.489	0.719	-	0.640
IL18	correlation coefficient	0.279	0.213	0.412	0.417	0.486	0.633	-0.299	0.427	0.412	0.539	0.214	0.570	0.094	-
	significance	0.159	0.306	0.036*	0.034*	0.014*	0.000**	0.086	0.026*	0.033*	0.004**	0.283	0.002**	0.640	-

5.10 Las proporciones de células inmunes son diferentes entre pacientes críticamente enfermos, pacientes con sepsis y shock séptico

Las proporciones de células inmunes estimadas a partir de los datos de metilación del ADN mostraron diferencias entre los grupos. La aproximación utilizada ha sido a través de un proceso de deconvolución de los datos de metilación de los arrays EPIC850K, como se ha descrito en la parte de materiales y métodos. Los pacientes con shock séptico mostraron niveles aumentados de neutrófilos y poblaciones bajas de linfocitos en comparación con los pacientes sépticos y controles de UCI (Figura 18). También realizamos un análisis del NLR, dado que ha demostrado ser útil como marcador diagnóstico y pronóstico en pacientes con sepsis (186). Nuestros resultados mostraron una relación NLR alta en pacientes con SS en comparación con los otros grupos de pacientes (Figura 18).

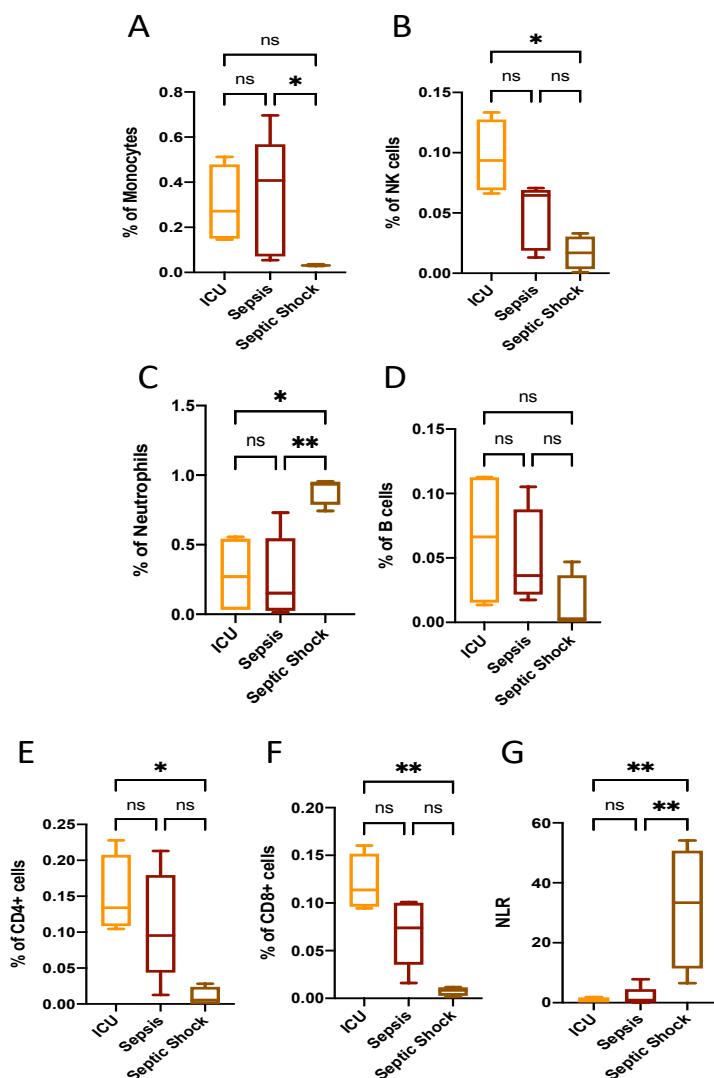


Figura 18. Estimación de la subpoblación inmune en el grupo control, UCI, pacientes con sepsis y shock séptico; Clasificación de subpoblaciones inmunes utilizando los datos clínicos registrados de cada paciente analizado: (A) Monocitos, (B) Células NK; (C) Neutrófilos, (D) Linfocitos B; (E-F) Clasificación de subpoblaciones inmunes utilizando las regiones metiladas diferencialmente: CD4+, CD8+, respectivamente; (G) Coeficiente de neutrófilos/linfocitos (NLR) en pacientes de UCI, con sepsis y con shock séptico.

5.11 Aumento de las interleuquinas piroptóticas en pacientes con sepsis y shock séptico.

Por el tipo de mecanismo que regula la piroptosis, se ha postulado que este tipo de muerte celular puede ser uno de los eventos iniciales que ocurren después de la infección en pacientes sépticos (180). Como se ha comentado, la piroptosis induce fenotipos hiperinflamatorios en las primeras etapas de la enfermedad, al producir citoquinas proinflamatorias como IL-1 α , IL-1 β and IL-18. Las interleuquinas IL-1 α e IL-1 β liberadas piroptóticamente están involucradas en la inflamación y vasodilatación, pero la IL-18 también juega un papel importante en la regulación inmunológica al promover la activación de las células Th1 y mejorar la actividad citotóxica de las células T CD8 + y las células de la inmunidad innata “Natural Killer” (NK) (187). Además, IL-1 β e IL-18 también participan en la defensa contra los patógenos bacterianos debido a su capacidad para matarlos (es decir, a través de trampas intracelulares inducidas por poros, entre otras) (76,188,189).

Los resultados obtenidos en la Figura 19 demostraron que los pacientes con shock séptico tienen niveles circulantes significativamente elevados de IL-1 α e IL-18, en comparación con los pacientes sépticos y el grupo de control. Asimismo, los pacientes con shock séptico mostraron niveles más altos de IL-1 α que el grupo de UCI. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles circulantes de IL-1 β entre los diferentes grupos.

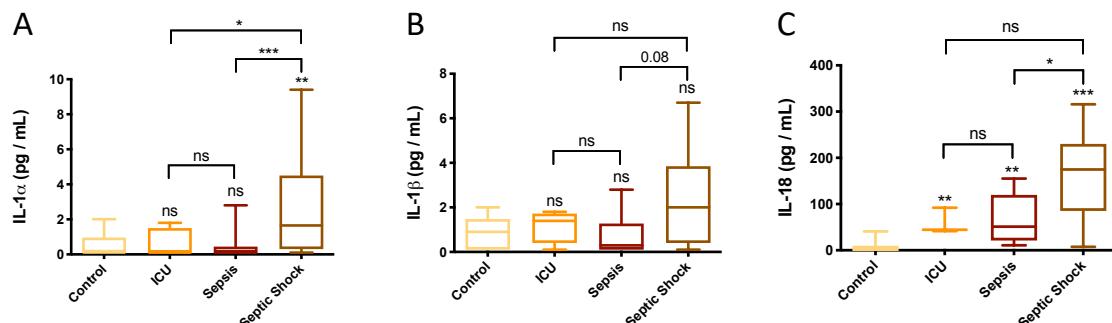


Figura 19. Niveles circulantes de citoquinas piroptóticas en los cuatro grupos analizados (a) Niveles circulantes de IL-1 α ; (b) Niveles circulantes de IL-1 β ; (c) Niveles circulantes de IL-18. Los datos se expresan como media \pm SEM de dos análisis independientes. ns = no significativo. valor de p; * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001. Las líneas en la parte superior de los diagramas de caja indican diferencias entre las condiciones comparadas.

5.12 La inmunidad innata está sobreactivada en pacientes con shock séptico en las primeras etapas del episodio séptico

Como se describió anteriormente, IL-18 puede potenciar la actividad de NK. Las células NK reconocen a las células infectadas y responden matándolas y secretando IFN- γ , una citoquina que activa a los macrófagos. Asimismo, los macrófagos fagocitan microbios y producen IL-12, que activa a los linfocitos NK para que secreten más IFN- γ , potenciando así su actividad de manera recíproca. Además, otras moléculas como los interferones de tipo 1 (por ejemplo, IFN- α) mejoran la actividad y la eficacia de las células NK al aumentar su capacidad microbicida (190) (ver Figura 5).

Los resultados de la Figura 3 indican que los pacientes con shock séptico tenían niveles circulantes elevados de las citoquinas proinflamatorias IL-12p70, IFN- α e IFN- γ , en comparación con el grupo de control y el grupo de pacientes sépticos. Sin embargo, no mostraron diferencias con los pacientes pertenecientes al grupo de UCI.

La IL-6 es secretada por macrófagos en respuesta a moléculas microbianas específicas. Esta citoquina es responsable de estimular la síntesis de proteínas de fase aguda y la producción de neutrófilos en la médula ósea. Además, la IL-6 promueve la proliferación de células B y aumenta las respuestas mediadas por las células T auxiliares 17 proinflamatorias (Th17) y suprime la función de las células T reguladoras antiinflamatorias (Tregs) (191) (ver figura 5).

La IL-8 es una quimioquina proinflamatoria producida principalmente por los macrófagos, pero también expresada por otras células con receptores tipo Toll que participan en la respuesta inmune innata. La IL-8 tiene dos funciones principales que consisten en la inducción de la migración de los neutrófilos al sitio de infección y la estimulación de la fagocitosis una vez que llegan al sitio de la infección (ver figura 5).

La IL-10 es una citoquina antiinflamatoria producida principalmente por monocitos. Regula negativamente la expresión de las citoquinas Th1, los antígenos MHC de clase II y las moléculas coestimuladoras en los macrófagos. También mejora la supervivencia y la proliferación de las células B y la producción de anticuerpos. Además, la IL-10 inhibe predominantemente las respuestas proinflamatorias (por ejemplo, TNF α e IL-1 β) inducidas por LPS y otros productos bacterianos (192) (ver figura 5).

El TNF- α es una citoquina proinflamatoria involucrada en el reclutamiento y estimulación de los neutrófilos y los monocitos. Cuando los macrófagos detectan patógenos, liberan TNF- α para alertar a otras células del sistema inmunológico y de otros tejidos, lo que provoca inflamación. El TNF- α participa en la inflamación sistémica y es una de las citoquinas que inician la reacción

de fase aguda. El TNF- α es producido principalmente por macrófagos activados, aunque puede ser producido por muchos otros tipos de células, como células T auxiliares, células NK, neutrófilos y mastocitos (ver figura 5).

Los resultados mostrados en la Figura 20 indican que los pacientes con shock séptico tienen niveles más altos de IL-6 proinflamatoria, IL-8 e IL-10 antiinflamatoria que el grupo de control, el grupo de pacientes de UCI no sépticos y los pacientes sépticos. Sin embargo, los pacientes con shock séptico no sobreexpresaron TNF- α en comparación con ambos grupos de control, aunque los niveles fueron más altos en el shock séptico en comparación con la sepsis. Además, los pacientes sépticos también mostraron niveles elevados de IL-8 e IL-10, en comparación con el grupo de control, y niveles más bajos de TNF- α en comparación con el grupo de UCI no séptico. Estos resultados, junto con los subconjuntos de células inmunes, sugieren que la principal fuente de TNF- α pueden ser los neutrófilos en el shock séptico.

Curiosamente, encontramos que las moléculas que activan los macrófagos y las células NK se sobreexpresan en pacientes con shock séptico y los reactivos producidos por monocitos y neutrófilos se activaron fuertemente en pacientes con shock séptico. Sin embargo, el sistema de fagocitos en el sistema innato parece estar disminuido en contraste con los neutrófilos, como se deduce del análisis de subconjuntos de células inmunes.

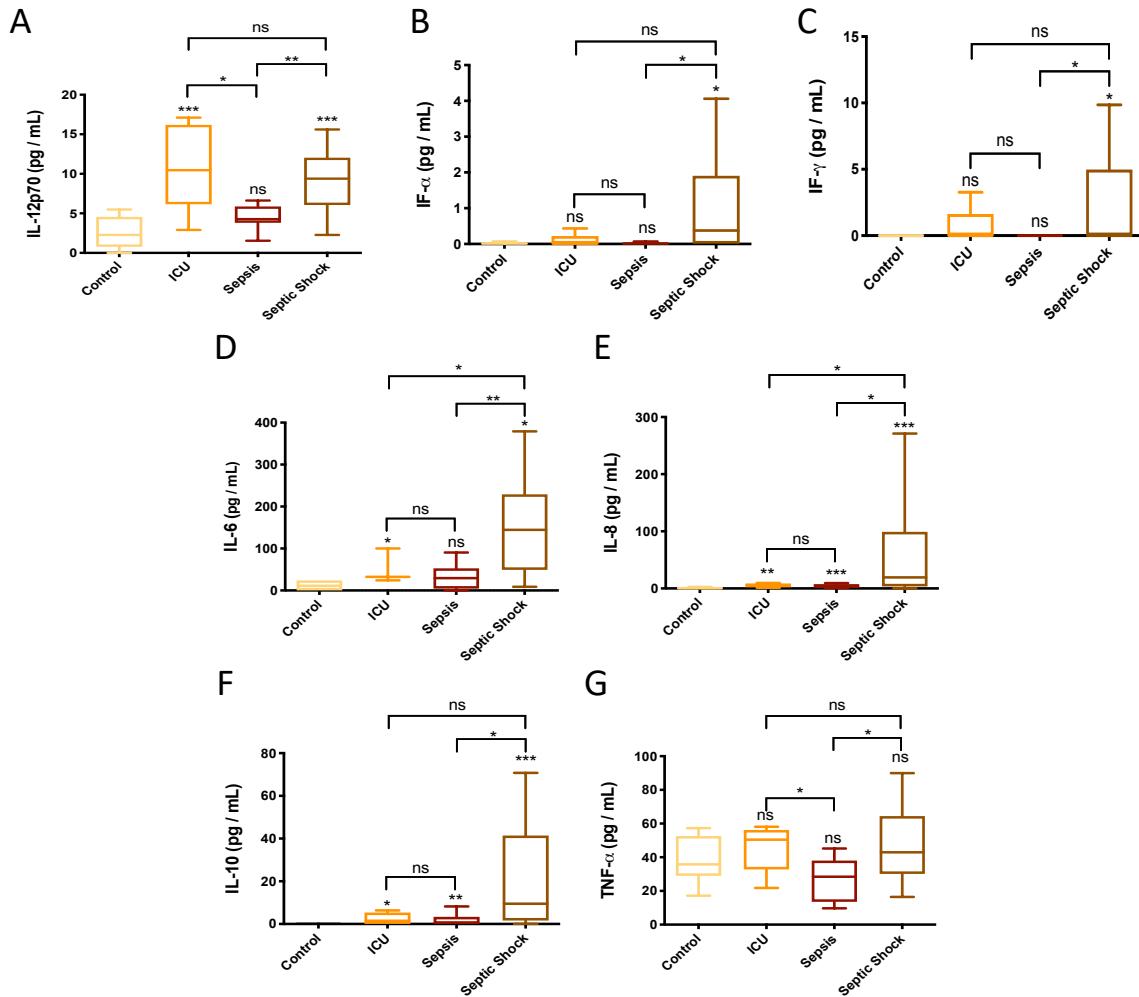


Figura 20. Niveles circulantes de citoquinas que activan macrófagos y las células NK. (A) Niveles circulantes de IL-12p70; (B) Niveles circulantes de IFN- α ; (C) Niveles circulantes de IFN- γ ; (D) Niveles circulantes de IL-6; (E) Niveles circulantes de IL-8; (F) Niveles circulantes de IL-10; (G) Niveles circulantes de TNF- α . Los datos se expresan como media \pm SEM de dos análisis independientes. ns = p-valor no significativo; * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001. Las líneas en la parte superior de los diagramas de caja indican diferencias entre las condiciones comparadas.

5.13 Las citoquinas quimiotácticas se sobreexpresan en el plasma de pacientes con shock séptico, lo que altera la respuesta inmune mediada por endotelio.

Las citoquinas quimiotácticas controlan la migración y el posicionamiento de las células inmunes en los tejidos y son elementos clave en la función apropiada del sistema inmunológico innato (193). Entre las quimioquinas, la GM-CSF es una glicoproteína secretada por macrófagos, células T, mastocitos y células NK. Estimula a las células madre para que produzcan granulocitos (es decir, neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y monocitos. Además, la GM-CSF potencia la migración de neutrófilos y provoca una alteración de los receptores expresados en la superficie de las células. Por otro lado, las Proteínas Inflamatorias de

Macrófagos (MIP) son quimioquinas, cuyas formas más relevantes en humanos son MIP-1 α y MIP-1 β . Tanto la MIP-1 α como la MIP-1 β , son factores principalmente producidos por macrófagos y monocitos tras ser estimulados con endotoxina bacteriana (194) o citoquinas proinflamatorias como IL-1 α e IL-1 β (195). El papel principal de estas quimioquinas se produce en la quimiotaxis y la migración transendotelial. Estas quimioquinas afectan a los monocitos, linfocitos T, células dendríticas, células NK y plaquetas (195). Los MIP también activan granulocitos humanos que pueden provocar inflamación neutrofílica aguda e inducir la síntesis y liberación de otras citoquinas proinflamatorias como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, y TNF- α de fibroblastos y macrófagos. Además, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1/CCL2) es una quimioquina que regula la migración e infiltración de monocitos/macrófagos (196).

Los resultados mostrados en la Figura 21 indican que los pacientes con shock séptico tienen los niveles más altos de citoquinas quimiotácticas (GM-CSF, MIP-1 α y MIP-1 β y MCP-1) en comparación con el grupo control, UCI y sepsis.

Los neutrófilos y los monocitos migran a áreas extravasculares de infección gracias a su unión a moléculas de adhesión endotelial y en respuesta a mediadores quimiotácticos, como se describió anteriormente. Entre la amplia variedad de citoquinas, dos de ellas, la IL-1 y el TNF- α , son de especial importancia para la activación endotelial. Ambas activan el endotelio e inician la migración de leucocitos, incluidos los neutrófilos, hacia los tejidos (197). En respuesta a IL-1 y TNF- α , las células endoteliales expresan e-SEL, que permite el rodamiento de leucocitos. A su vez, otros estímulos, como la trombina, producen una rápida translocación de p-SEL a la superficie endotelial y plaquetas. Los neutrófilos y los monocitos están anclados al endotelio a través de la unión a las selectinas, lo que les permite rodar sobre el endotelio (198,199). Asimismo, la activación del endotelio por IL-1 y TNF- α también induce la expresión de moléculas de fuerte adhesión como I-CAM1, que detiene el rodamiento de los leucocitos una vez que llegan al sitio de infección (199).

Los resultados presentados en la Figura 21 indican que el grupo SS mostró los niveles plasmáticos más altos de E-selectina e I-CAM1 en comparación con los grupos de control, UCI y sepsis. En combinación con las proporciones de subconjuntos de células inmunes, estos resultados sugieren que la respuesta más estimulada en pacientes con SS está mediada por neutrófilos, lo que promueve la inflamación neutrofílica en el endotelio, ya que tanto las citoquinas quimiotácticas como las moléculas de adhesión endotelial aumentaron en estos pacientes.

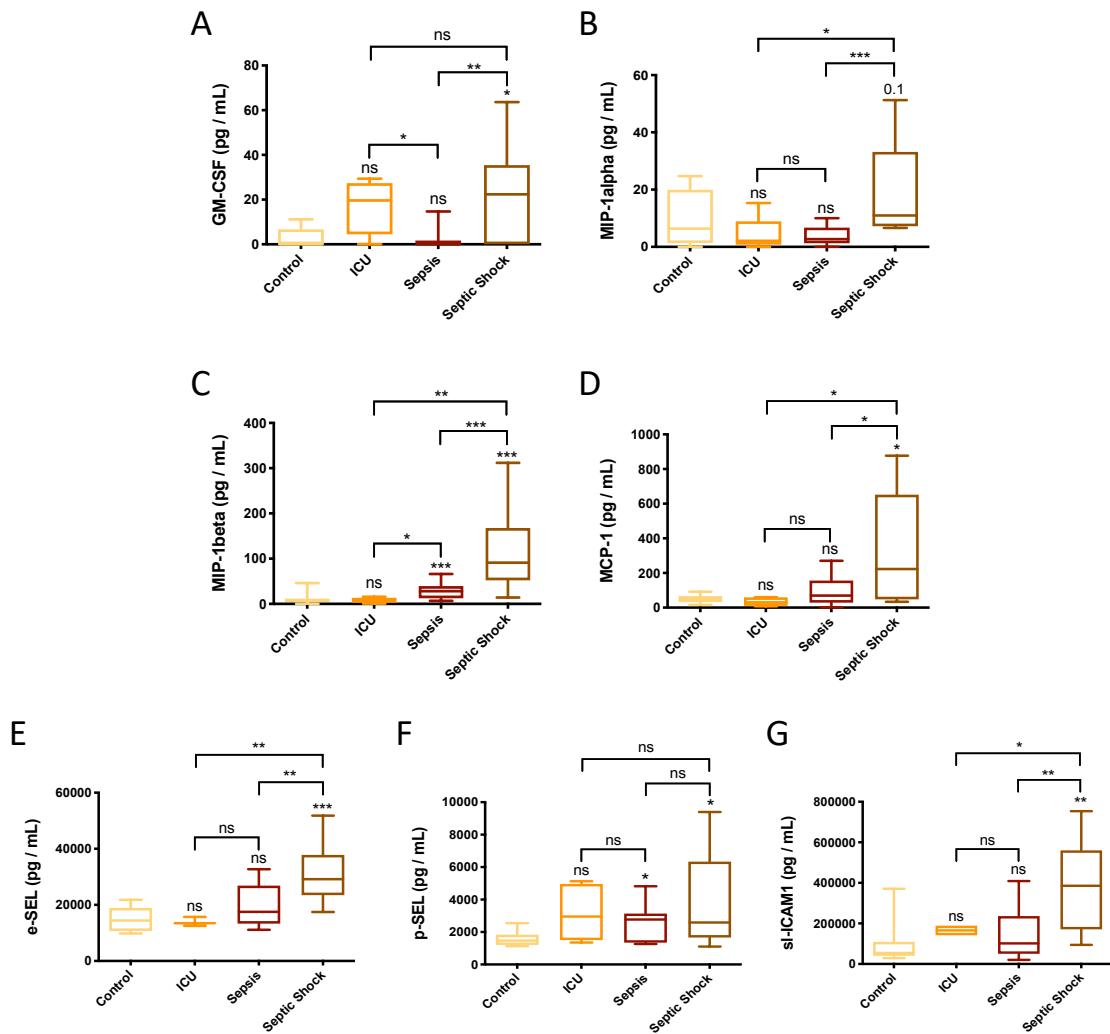


Figura 21. Niveles circulantes de mediadores de monocitos y neutrófilos en el grupo control y pacientes de UCI, sepsis y shock séptico. (a) Niveles circulantes de GM-CSF; (b) Niveles circulantes de MIP-1 α ; (c) Niveles circulantes de MIP-1 β ; (d) Niveles circulantes de MCP1; (e) Niveles circulantes de e-SEL; (f) Niveles circulantes de p-SEL; (g) Niveles circulantes de sICAM1. Los datos se expresan como media \pm SEM de dos análisis independientes. ns = p-valor no significativo; * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001. Las líneas en la parte superior de los diagramas de caja indican diferencias entre las condiciones comparadas.

5.14 La respuesta inmune adaptativa no es completamente funcional en las primeras horas del desarrollo del shock séptico.

IL-4 es una citoquina producida por células T-tipo 2 (Th2) activadas, basófilos, mastocitos y eosinófilos. Actúa como citoquina antiinflamatoria, al bloquear la síntesis de IL-1, TNF- α , IL-6 y MIP-1. Además, la IL-4 promueve la diferenciación de linfocitos Th2, y la proliferación y diferenciación de linfocitos B (200,201).

La IL-13 es una citoquina, producida principalmente por las células Th2, que juega un papel fundamental en la regulación de la función de los monocitos y células B. La IL-13 es producida por los linfocitos T, modula la producción de las proteínas IL-1, TNF, IL-8 y MIP-1, estimula el crecimiento y la diferenciación de las células B e inhibe las células Th1 (202).

IP-10, también conocido como ligando 10 de quimiocina del motivo C-X-C (CXCL10) es secretado por varios tipos de células en respuesta al IFN- γ por los monocitos. El IP-10 participa en la respuesta inmune innata y adaptativa porque contribuye a la quimioatracción de monocitos / macrófagos, células T, células NK y células dendríticas y promueve la adhesión de las células T a las células endoteliales (193,203).

La IL-27 tiene un efecto proinflamatorio y antiinflamatorio pronunciado y es producida por células presentadoras de antígenos. La IL-27 juega un papel importante regulando positivamente la actividad de los linfocitos T y B, y también las células inmunes innatas, que están reguladas negativamente por la IL-27. La IL-27 se sinergiza con la IL-12 para promover la producción de IFN- γ por las células T CD4, CD8 y las células NK (204–206). La IL-27 también se identificó como un iniciador temprano de la diferenciación Th1 e inhibe la diferenciación de las células Th17 (207–209).

Los resultados presentados en la Figura 22 no muestran diferencias en los niveles de IL-4 e IL-13 en pacientes con SS en comparación con los grupos de control, UCI y sepsis. Con respecto a IL-27, el grupo SS mostró niveles más bajos de IL-27 circulante que los grupos de UCI y sepsis. El grupo SS tuvo los niveles plasmáticos más altos de IP-10 entre todos los grupos estudiados. Curiosamente, los pacientes de UCI no sépticos mostraron niveles plasmáticos más altos de IL-13 e IL-27 que los grupos de sepsis y SS. Estos resultados sugieren que la IL-27 juega un papel central en la modulación de la respuesta inmune al promover la diferenciación de las células T y la función de los neutrófilos, lo que puede contribuir a la inmunosupresión en pacientes con SS.

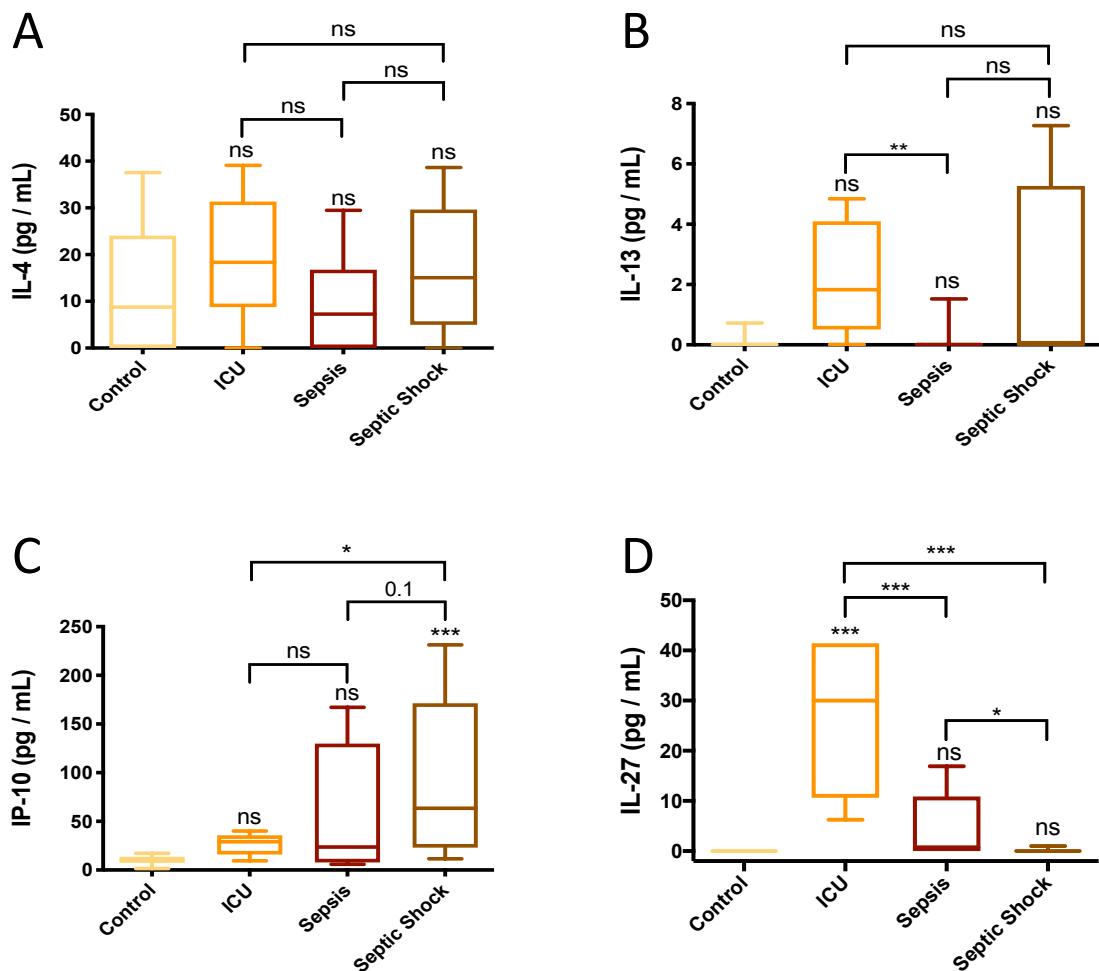


Figura 22. Niveles circulantes en plasma de mediadores inmunes adaptativos. (a) Niveles circulantes de IL-4; (b) Niveles circulantes de IL-13; (c) Niveles circulantes de IP-10; (d) Niveles circulantes de IL-27. Los datos se expresan como media \pm SEM de dos análisis independientes. ns = p-valor no significativo; * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001. Las líneas en la parte superior de los diagramas de caja indican diferencias entre las condiciones comparadas.

5.15 Los inmunomoduladores están fuertemente sobreexpresados en pacientes con shock séptico.

La IL-17 es una citocina proinflamatoria producida por las células T auxiliares 17. IL-17 induce la producción de muchas otras citoquinas (como IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , TGF- β , TNF- α) y quimioquinas (incluidas IL-8, GRO- α y MCP-1) (210) con el objetivo final de aumentar la inflamación, la generación de granulocitos por la médula ósea y atraer leucocitos al sitio de infección (210–212).

S100A8 y S100A9 son proteínas heterodiméricas de unión a calcio y zinc que desempeñan un papel destacado en la regulación de los procesos inflamatorios y la respuesta inmunitaria

(213,214), capaces de inducir quimiotaxis y adhesión de neutrófilos. Sus funciones extracelulares incluyen actividades proinflamatorias, antimicrobianas, de eliminación de oxidantes e inductoras de apoptosis. Su actividad proinflamatoria incluye el reclutamiento de leucocitos, la promoción de la producción de citoquinas y quimioquinas y la regulación de la adhesión y migración de leucocitos.

Nuestros resultados mostraron los niveles más altos de IL-17A, S100A8 y S100A9 en el grupo de pacientes con SS en comparación con los sujetos de control sanos y los pacientes en UCI y los pacientes sépticos (Figura 23). La sobreexpresión de estos factores relacionada con el aumento de este subconjunto celular puede contribuir a la inflamación neutrofílica en pacientes con SS.

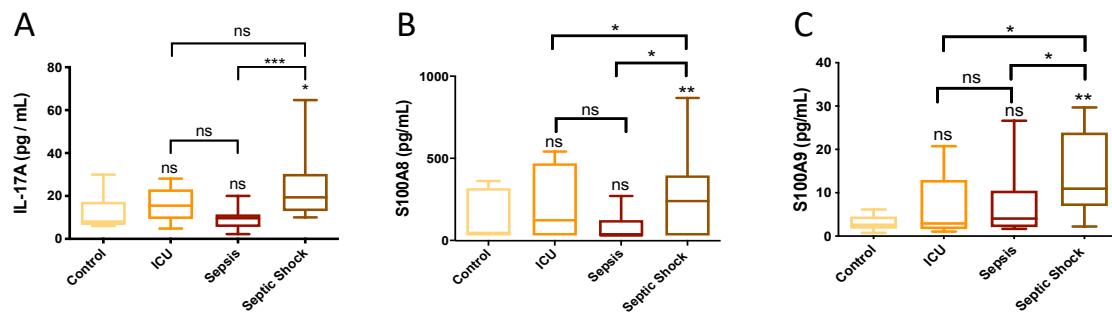


Figura 23. Niveles circulantes de diferentes inmunomoduladores en los cuatro grupos analizados. (a) Niveles circulantes de IL-17A; (b) Niveles circulantes de S100A8; (c) Niveles circulantes de S100A9. Los datos se expresan como media ± SEM de dos análisis independientes. ns = valor de p no significativo; * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001. Las líneas en la parte superior de los diagramas de caja indican diferencias entre las condiciones comparadas.

5.16 Correlaciones entre diferentes citoquinas y mediadores inmunes.

Se estudiaron una serie de análisis de correlación entre los parámetros clínicos y las citoquinas y los mediadores inmunes antes mencionados que son relevantes para la sepsis y la respuesta inmune en el SS. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para las citoquinas, los mediadores inmunitarios y los parámetros clínicos en los casos (incluidos pacientes con sepsis y SS) y los controles (incluidos sujetos sanos y pacientes en UCI). Los valores estadísticos (p-valor y coeficiente de correlación) se muestran en la Tabla 7 y la Tabla 8, respectivamente. Se realizó una agrupación jerárquica utilizando el método de vinculación completa para agrupar las variables analizadas e identificar grupos de citoquinas, mediadores endoteliales y características clínicas con una fuerte correlación positiva (Figura 24).

Se encontraron varias correlaciones positivas entre las características clínicas de gravedad y los marcadores con las diferentes citoquinas y los mediadores inmunes. En este sentido, las puntuaciones APACHE y SOFA y los niveles de lactato mostraron una correlación positiva con la citoquina piroptótica IL-1 α (p-valor 0,0024, 0,0038 y 0,0230, respectivamente) y con la citoquina proinflamatoria IL-6 (p-valor 0,0026, 0,189 y 0,0085, respectivamente). Es importante destacar que la relación entre estas variables se identificó claramente en un grupo jerárquico en la Figura 24. Con respecto a las citoquinas piroptóticas, también se encontró que la IL-18 forma un grupo jerárquico con la molécula de adhesión endotelial I-CAM1 (p-valor 0,031) y la E-selectina (p-valor 0,021, coeficiente de correlación con ICAM-1), lo que sugiere una fuerte relación entre la piroptosis y la función endotelial, como también se demuestra por la correlación positiva entre IL-18 y el dímero D (DD) (p-valor 0,007). Por tanto, la disfunción endotelial puede contribuir a la coagulación y a la formación de trombos, en los que el DD y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) son marcadores importantes de la coagulación. En el mismo grupo, también encontramos una fuerte correlación positiva con las citoquinas antiinflamatorias IL-10 y DD (p-valor 0,001), lo que sugiere que la inflamación piroptótica y la liberación de citoquinas antiinflamatorias pueden ocurrir simultáneamente y estar relacionadas con un fenotipo pro-coagulación.

También encontramos un grupo formado por lactato, P-selectina y S100A8. La P-selectina mostró una correlación importante con S100A8 (p-valor $6.07 \cdot 10^{-5}$) y los niveles de lactato (p-valor 0,0022). Este grupo parece interesante porque, como se describió anteriormente, S100A8 puede promover la apoptosis y, por lo tanto, contribuir al aumento de los niveles de lactato. Además, el endotelio también puede liberar S100A8 que promueve la actividad proinflamatoria, un proceso que también es facilitado por la P-selectina en la superficie de las plaquetas y el endotelio, lo que puede contribuir aún más a la coagulación (215,216). Un pequeño grupo fue formado por IL-12, IL-27 y la prueba de tiempo de coagulación (Quick Index, también descrito como tiempo de tromboplastina). IL-27 e IL-12 mostraron una buena correlación (p-valor 0,0001), lo que puede explicarse por ambas interleuquinas proinflamatorias pertenecientes a la misma familia. La estrecha relación de IL-12, IL-27 y el índice rápido puede ser una consecuencia de la relación entre estas citoquinas y los niveles de trombina (217,218). Finalmente, la IL-4 mostró una buena correlación con IL-17A (p-

valor 0,0024), lo que sugiere que la IL-4 derivada de Th2 y la IL-17A derivada de Th17 proporcionan un medio inflamatorio crónico en pacientes críticamente enfermos. El GM-CSF se incluyó en el mismo grupo ya que ambas células T, Th2 y Th17, pueden liberar este factor que es responsable de estimular las células madre para producir granulocitos como neutrófilos y monocitos.

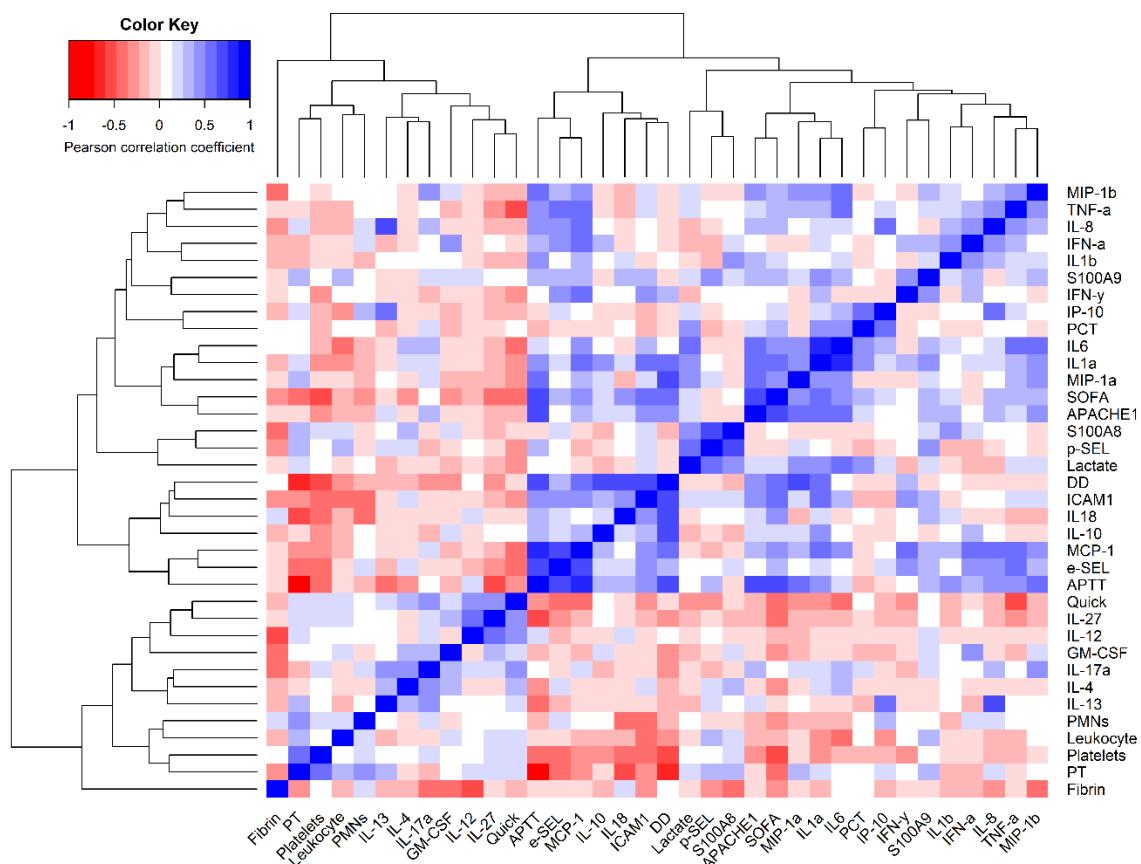


Figura 24. Mapa de calor (Heatmap) que representa los coeficientes de correlación de Pearson (-1 a +1) entre las variables clínicas y medidas analíticas. El color rojo indica una correlación negativa y el color azul una correlación positiva entre los parámetros comparados. Los dendrogramas se obtuvieron mediante un agrupamiento jerárquico utilizando el método de enlace completo. Los grupos de dendrogramas incluyen citoquinas, reactivos, mediadores endoteliales y características clínicas con una fuerte correlación positiva. APACHE II: Sistema de clasificación de fisiología aguda y enfermedades crónicas II; SOFA: Evaluación secuencial de insuficiencia orgánica (relacionada con sepsis); APTT: tiempo de tromboplastina parcial activado; DD: Dimero D; PT: tiempo de protrombina.

Tabla 7. Valor p obtenido mediante correlaciones de Pearson analizando diferentes citoquinas, mediadores inmunes y parámetros clínicos

	APACHE1	SOFA	Lactate	e-SEL	p-SEL	ICAM1	IL1α	IL1β	IL6	IL18	IL-12	IFN-α	IFN-γ	IL-8	IL-10	TNF-α	GM-CSF	MIP-1α	MIP-1β	MCP-1	IL-4	IL-13	IP-10	IL-27	IL-17a	S100A8	S100A9	Platelets	Quick	APTT	Fibrin	DD	PT				
APACHE1	1,689E-05	0,400	0,706	0,917	0,017	0,002	0,095	0,003	0,225	0,922	0,758	0,904	0,103	0,421	0,185	0,800	4,928E-04	0,014	0,083	0,975	0,458	0,775	0,341	0,090	0,624	0,078	0,037	0,251	0,002	0,626	0,037	0,933					
SOFA	1,689E-05		0,197	0,076	0,997	0,004	0,004	0,217	0,019	0,017	0,437	0,981	0,545	0,146	0,366	0,101	0,123	0,022	0,053	0,031	0,181	0,605	0,386	0,014	0,887	0,930	0,167	0,002	0,041	0,001	0,376	0,009	0,141				
Lactate	0,400	0,197		0,781	0,002	0,312	0,023	0,846	0,009	0,913	0,866	0,294	0,532	0,487	0,501	0,248	0,402	0,030	0,298	0,922	0,752	0,462	0,231	0,517	0,950	0,027	0,178	0,958	0,102	0,593	0,932	0,901	0,615				
e-SEL	0,706	0,076	0,781		0,644	0,021	0,166	0,500	0,649	0,384	0,381	0,023	0,015	0,005	0,203	0,002	0,987	0,920	0,108	0,245E-06	0,191	0,549	0,450	0,105	0,738	0,337	0,077	0,024	0,038	0,002	0,831	0,259	0,207				
p-SEL	0,917	0,997	0,002	0,644		0,267	0,709	0,393	0,661	0,753	0,740	0,473	0,643	0,774	0,600	0,504	0,588	0,283	0,629	0,545	0,302	0,161	0,638	0,809	0,533	6,078E-05	0,034	0,670	0,274	0,238	0,328	0,993	0,265				
ICAM1	0,017	0,004	0,312	0,021	0,267		0,002	0,940	0,056	0,031	0,776	0,548	0,017	0,671	0,085	0,232	0,799	0,163	0,371	0,014	0,176	0,830	0,269	0,490	0,583	0,445	0,074	0,166	0,137	0,053	0,450	0,014	0,345				
IL1α	0,002	0,004	0,023	0,166	0,709	0,002		0,614	1,416E-08	0,336	0,658	0,439	0,141	0,364	0,011	0,040	0,670	0,007	0,038	0,001	0,232	0,672	0,344	0,398	0,393	0,861	0,012	0,234	0,128	0,139	0,729	0,018	0,478				
IL1β	0,095	0,217	0,646	0,500	0,393	0,940	0,614		0,392	0,187	0,670	0,013	0,584	0,036	0,903	0,279	0,517	0,783	0,444	0,078	0,926	0,902	0,634	0,525	0,714	0,033	0,293	0,165	0,477	0,081	0,509	0,865	0,479				
IL6	0,003	0,019	0,009	0,649	0,661	0,056	1,416E-08	0,392		0,994	0,753	0,739	0,780	0,214	0,776	0,002	0,630	0,007	0,002	0,023	0,088	0,634	0,124	0,524	0,052	0,581	0,125	0,666	0,089	0,347	0,918	0,802	0,804				
IL18	0,225	0,017	0,913	0,384	0,753	0,031	0,336	0,187	0,994		0,333	0,958	0,476	0,790	0,226	0,495	0,844	0,554	0,457	0,550	0,983	0,652	0,646	0,735	0,776	0,463	0,108	0,052	0,782	0,290	0,635	0,007	0,038				
IL-12	0,922	0,437	0,866	0,381	0,740	0,776	0,658	0,670	0,753	0,333		0,636	0,802	0,705	0,737	0,605	0,634	0,478	0,631	0,574	0,925	0,687	0,585	3,773E-04	0,225	0,581	0,163	0,764	0,040	0,558	0,055	0,789	0,531				
IFN-α	0,758	0,981	0,294	0,023	0,473	0,548	0,438	0,013	0,739	0,958	0,636		0,099	0,003	0,029	0,080	0,017	0,881	0,588	2,753E-04	0,651	0,525	0,626	0,596	0,848	0,330	0,122	0,325	0,609	0,282	0,538	0,822	0,743				
IFN-γ	0,904	0,545	0,532	0,015	0,643	0,017	0,141	0,584	0,780	0,476	0,802	0,099		0,579	0,775	0,661	0,708	0,691	0,686	0,003	0,801	0,739	0,627	0,540	0,367	0,905	0,003	0,284	0,240	0,628	0,950	0,267	0,943				
IL-8	0,103	0,146	0,487	0,005	0,774	0,671	0,364	0,036	0,214	0,790	0,705	0,003	0,579		0,827	0,017	0,625	0,530	0,032	2,541E-04	0,792	3,719E-06	1,924E-04	0,409	0,026	0,874	0,947	0,350	0,389	0,081	0,209	0,922	0,527				
IL-10	0,421	0,366	0,501	0,203	0,600	0,085	0,011	0,903	0,776	0,226	0,737	0,029	0,775	0,827		0,894	0,180	0,244	0,948	0,029	0,697	0,858	0,671	0,759	0,493	0,476	0,996	0,129	0,881	0,213	0,624	0,001	0,930				
TNF-α	0,185	0,101	0,248	0,002	0,504	0,232	0,040	0,279	0,002	0,495	0,605	0,080	0,661	0,017	0,894		0,262	0,060	0,008	6,213E-05	0,768	0,787	0,336	0,159	0,518	0,522	0,275	0,378	0,004	0,068	0,758	0,857	0,736				
GM-CSF	0,800	0,123	0,402	0,987	0,588	0,799	0,670	0,517	0,630	0,844	0,634	0,017	0,708	0,625	0,180	0,262		0,351	0,164	0,477	0,083	0,703	0,429	0,082	0,099	0,404	0,387	0,943	0,294	0,440	0,103	0,292	0,886				
MIP-1α	4,928E-04	0,022	0,030	0,920	0,283	0,163	0,007	0,783	0,007	0,554	0,478	0,881	0,691	0,530	0,244	0,060	0,351		0,007	0,068	0,770	0,819	0,977	0,215	0,206	0,934	0,221	0,676	0,168	0,007	0,721	0,002	0,362				
MIP-1β	0,014	0,053	0,298	0,108	0,629	0,371	0,038	0,444	0,002	0,457	0,631	0,588	0,696	0,032	0,948	0,008	0,164	0,007		0,023	0,969	0,712	0,487	0,204	0,004	0,626	0,040	0,870	0,464	0,021	0,154	0,988	0,908				
MCP-1	0,083	0,031	0,922	9,245E-06	0,545	0,014	0,001	0,078	0,023	0,550	0,574	2,753E-04	0,003	2,541E-04	0,029	6,213E-05	0,477	0,068	0,023		0,900	0,577	0,685	0,208	0,346	0,923	0,070	0,171	0,067	2,382E-04	0,768	0,014	0,293				
IL-4	0,975	0,181	0,752	0,191	0,302	0,176	0,232	0,926	0,088	0,983	0,925	0,651	0,801	0,792	0,697	0,768	0,083	0,770	0,969	0,900		0,025	0,915	0,744	0,002	0,032	0,983	0,614	0,111	0,309	0,461	0,607	0,957				
IL-13	0,458	0,605	0,462	0,549	0,161	0,830	0,672	0,902	0,634	0,652	0,687	0,525	0,739	3,719E-06	0,858	0,787	0,703	0,819	0,712	0,577	0,025		0,001	0,678	0,002	0,528	0,900	0,714	0,326	0,080	0,450	0,446	0,278				
IP-10	0,775	0,386	0,231	0,450	0,638	0,269	0,344	0,634	0,124	0,646	0,585	0,626	0,627	1,924E-04	0,671	0,336	0,429	0,977	0,487	0,685	0,915	0,001		0,380	0,979	0,601	0,796	0,401	0,462	0,708	0,617	0,711	0,432				
IL-27	0,341	0,014	0,517	0,105	0,809	0,490	0,398	0,525	0,524	0,735	3,773E-04	0,596	0,540	0,409	0,759	0,159	0,082	0,215	0,204	0,208	0,744	0,678	0,380		0,274	0,313	0,864	0,273	0,009	0,025	0,794	0,279	0,492				
IL-17a	0,090	0,887	0,950	0,738	0,533	0,583	0,393	0,714	0,052	0,776	0,225	0,848	0,367	0,026	0,493	0,518	0,099	0,206	0,004	0,346	0,002	0,002	0,979	0,274		0,934	0,339	0,314	0,028	0,904	0,204	0,315	0,522				
S100A8	0,824	0,930	0,027	0,337	6,078E-05	0,445	0,861	0,033	0,581	0,463	0,581	0,330	0,905	0,874	0,476	0,522	0,404	0,934	0,626	0,923	0,032	0,528	0,601	0,313	0,934		0,153	0,848	0,756	0,949	0,071	0,539	0,361				
S100A9	0,078	0,167	0,178	0,077	0,034	0,074	0,012	0,293	0,125	0,108	0,163	0,122	0,003	0,947	0,996	0,275	0,387	0,221	0,040	0,070	0,983	0,900	0,796	0,664	0,339	0,153	0,794	0,747	0,142	0,012	0,903	0,838	0,637	0,973		0,727	0,296
Platelets	0,037	0,002	0,958	0,024	0,670	0,166	0,234	0,165	0,666	0,052	0,764	0,325	0,284	0,350	0,129	0,378	0,943	0,676	0,870	0,171	0,614	0,714	0,401	0,273	0,314	0,848	0,794		0,227	0,012	0,838	0,054	0,027				
Quick	0,251	0,041	0,102	0,038	0,274	0,137	0,128	0,477	0,089	0,782	0,040	0,609	0,240	0,389	0,881	0,004	0,294	0,168	0,464	0,067	0,111	0,326	0,462	0,009	0,028	0,756	0,747	0,227		0,218	0,637	0,947	0,474				
APTT	0,002	0,001	0,593	0,002	0,238	0,053	0,139	0,081	0,347	0,290	0,558	0,282	0,628	0,081	0,213	0,068	0,440	0,007	0,021	2,382E-04	0,309	0,080	0,708	0,025	0,904	0,949	0,014	0,102	0,218	0,973	0,008	0,002					
Fibrin	0,826	0,376	0,932	0,831	0,328	0,450	0,729	0,509	0,918	0,635	0,055	0																									

Tabla 8. Coeficientes de correlación de Pearson obtenidos analizando diferentes citoquinas, mediadores inmunes y parámetros clínicos.

	APACHE1	SOFA	Lactate	e-SEL	p-SEL	ICAM1	IL1α	IL1β	IL6	IL18	IL-12	IFN-α	IFN-γ	IL-8	IL-10	TNF-α	GM-CSF	MIP-1α	MIP-1β	MCP-1	IL-4	IL-13	IP-10	IL-27	IL-17a	S100A8	S100A9	Platelets	Quick	APTT	Fibrin	DD	PT
APACHE1	1,000	0,700	0,162	0,080	-0,022	0,473	0,579	0,341	0,575	0,246	-0,020	0,062	0,024	0,303	0,155	0,253	-0,049	0,625	0,461	0,340	-0,008	0,143	0,055	-0,183	0,332	-0,044	0,339	-0,382	-0,220	0,662	-0,060	0,508	-0,025
SOFA	0,700	1,000	0,246	0,361	0,001	0,560	0,556	0,256	0,466	0,465	-0,159	-0,005	0,122	0,272	0,174	0,311	-0,293	0,438	0,370	0,416	-0,256	-0,100	0,167	-0,452	0,029	0,017	0,269	-0,537	-0,382	0,713	-0,237	0,611	-0,414
Lactate	0,162	0,246	1,000	0,059	0,582	0,211	0,453	-0,097	0,514	-0,023	-0,035	-0,210	-0,126	-0,134	-0,130	0,221	-0,162	0,419	0,204	-0,020	-0,081	-0,142	0,230	-0,125	-0,013	0,418	0,262	0,010	-0,315	0,131	-0,023	-0,033	0,147
e-SEL	0,080	0,361	0,059	1,000	0,086	0,414	0,255	0,126	0,085	0,175	-0,163	0,408	0,431	0,494	0,235	0,529	-0,003	0,019	0,305	0,714	0,241	-0,112	0,141	-0,297	-0,063	0,182	0,328	-0,449	-0,426	0,704	-0,069	0,323	-0,393
p-SEL	-0,022	0,001	0,582	0,086	1,000	0,206	0,070	-0,159	-0,082	0,064	0,062	-0,134	0,087	-0,054	-0,098	0,125	-0,101	0,202	-0,094	-0,115	0,191	0,258	-0,088	-0,045	-0,116	0,665	0,389	0,090	-0,233	0,313	-0,309	0,002	0,350
ICAM1	0,473	0,560	0,211	0,414	0,206	1,000	0,539	-0,014	0,346	0,416	-0,053	0,112	0,427	0,079	0,314	0,221	-0,048	0,261	0,172	0,442	0,249	-0,040	-0,205	-0,129	-0,103	0,145	0,331	-0,286	-0,312	0,491	-0,241	0,638	-0,299
IL1α	0,579	0,556	0,453	0,255	0,070	0,539	1,000	0,094	0,822	0,192	-0,083	0,144	0,270	0,169	0,451	0,371	-0,080	0,485	0,388	0,572	0,221	-0,079	0,176	-0,157	0,159	-0,033	0,451	-0,247	-0,320	0,386	-0,112	0,620	0,227
IL1β	0,341	0,256	-0,097	0,126	-0,159	-0,014	0,094	1,000	0,159	0,262	-0,080	0,439	-0,102	0,378	0,023	0,201	0,121	0,053	0,148	0,326	0,017	0,023	0,089	-0,119	0,069	0,390	0,198	-0,287	-0,153	0,450	-0,212	0,050	-0,227
IL6	0,575	0,466	0,514	0,085	-0,082	0,346	0,822	0,159	1,000	0,002	-0,059	0,062	-0,052	0,230	0,053	0,536	-0,090	0,484	0,559	0,414	0,312	-0,089	0,282	-0,119	0,352	-0,105	0,287	-0,091	-0,354	0,252	0,034	0,074	0,080
IL18	0,246	0,465	-0,023	0,175	0,064	0,416	0,192	0,262	0,002	1,000	0,190	0,010	0,138	-0,048	0,220	-0,123	-0,036	-0,112	-0,139	0,112	-0,004	-0,081	-0,083	-0,061	-0,053	0,137	0,290	-0,386	-0,058	0,282	0,145	0,687	-0,580
IL-12	-0,020	-0,159	-0,035	-0,163	0,062	-0,053	-0,083	-0,080	-0,059	0,190	1,000	-0,087	-0,046	-0,070	-0,062	-0,095	-0,087	-0,132	-0,091	-0,105	0,017	0,074	-0,100	0,590	0,220	-0,103	0,257	0,062	0,412	0,153	-0,544	0,075	0,201
IFN-α	0,062	-0,005	-0,210	0,408	-0,134	0,112	0,144	0,439	0,062	0,010	-0,087	1,000	0,292	0,504	0,381	0,309	0,411	-0,028	0,101	0,601	-0,082	-0,115	0,088	0,096	0,035	0,178	0,279	-0,197	-0,105	0,268	-0,180	-0,061	-0,106
IFN-γ	0,024	0,122	-0,126	0,431	0,087	0,427	0,270	-0,102	-0,052	0,138	-0,046	0,292	1,000	0,100	0,052	0,079	-0,068	-0,073	-0,076	0,511	-0,045	-0,060	-0,088	-0,111	-0,162	0,022	0,505	-0,214	-0,239	0,123	-0,019	0,295	0,023
IL-8	0,303	0,272	-0,134	0,494	-0,054	0,079	0,169	0,378	0,230	-0,048	-0,070	0,504	0,100	1,000	0,038	0,396	-0,084	0,111	0,369	0,588	-0,046	0,687	0,583	-0,142	0,381	0,028	0,012	-0,177	-0,166	0,410	-0,332	-0,026	0,185
IL-10	0,155	0,174	-0,130	0,235	-0,098	0,314	0,451	0,023	0,053	0,220	-0,062	0,381	0,052	0,038	1,000	-0,023	0,229	0,205	-0,012	0,374	-0,067	-0,031	-0,073	0,053	-0,122	-0,125	-0,001	-0,289	0,030	0,300	-0,133	0,716	-0,026
TNF-α	0,253	0,311	0,222	0,529	0,125	0,221	0,371	0,201	0,536	-0,123	-0,095	0,309	0,079	0,396	-0,023	1,000	-0,189	0,326	0,441	0,624	-0,050	0,046	0,163	-0,236	0,113	0,112	0,187	-0,170	-0,532	0,428	-0,084	-0,047	0,099
GM-CSF	-0,049	-0,293	-0,162	-0,003	-0,101	-0,048	-0,080	0,121	-0,090	-0,036	-0,087	0,411	-0,068	-0,084	0,229	-0,189	1,000	-0,165	0,241	-0,124	0,289	0,065	-0,134	0,290	0,283	0,146	0,149	0,014	0,205	-0,188	-0,422	-0,272	0,042
MIP-1α	0,625	0,438	0,419	0,019	0,202	0,261	0,485	0,053	0,484	-0,112	-0,132	-0,028	-0,073	0,111	0,205	0,326	-0,165	1,000	0,461	0,327	-0,052	0,041	-0,005	-0,218	0,226	0,015	0,219	-0,084	-0,279	0,612	-0,101	0,712	0,276
MIP-1β	0,461	0,370	0,204	0,305	-0,094	0,172	0,388	0,148	0,559	-0,139	-0,091	0,101	-0,076	0,369	-0,012	0,441	0,241	0,461	1,000	0,394	-0,007	0,065	0,121	-0,220	0,485	-0,088	0,353	-0,033	-0,147	0,523	-0,374	0,004	0,034
MCP-1	0,340	0,416	-0,020	0,714	-0,115	0,442	0,572	0,326	0,414	0,112	-0,105	0,601	0,511	0,588	0,374	0,624	-0,124	0,327	0,394	1,000	-0,022	-0,098	0,071	-0,218	0,167	-0,017	0,314	-0,271	-0,364	0,762	-0,083	0,599	-0,316
IL-4	-0,006	-0,256	-0,061	0,241	0,191	0,249	0,221	0,017	0,312	-0,004	0,017	-0,082	-0,045	-0,046	-0,067	-0,050	0,289	-0,052	-0,007	-0,022	1,000	0,367	-0,018	-0,056	0,496	0,363	-0,004	0,098	0,308	-0,247	-0,199	-0,134	-0,016
IL-13	0,143	-0,100	-0,142	-0,112	0,258	-0,040	-0,079	0,023	-0,089	-0,081	0,074	-0,115	-0,060	0,687	-0,031	0,046	0,065	0,041	0,065	-0,098	0,367	1,000	0,515	0,071	0,508	0,110	-0,022	0,071	0,193	-0,411	-0,203	-0,198	0,312
IP-10	0,055	0,167	0,230	0,141	-0,088	-0,205	0,176	0,089	0,282	-0,083	-0,100	0,088	-0,088	0,583	-0,073	0,163	-0,134	-0,005	0,121	0,071	-0,018	0,515	1,000	-0,149	-0,005	0,091	-0,045	-0,162	-0,145	-0,092	-0,135	-0,097	0,228
IL-27	-0,183	-0,452	-0,125	-0,297	-0,045	-0,129	-0,157	-0,119	-0,119	-0,061	0,590	0,096	-0,111	-0,142	0,053	-0,236	0,290	-0,218	-0,220	-0,218	-0,056	0,071	-0,149	1,000	0,190	-0,175	0,075	0,211	0,486	-0,512	-0,071	-0,279	0,201
IL-17a	0,332	0,029	-0,013	-0,063	-0,116	-0,103	0,159	0,069	0,352	-0,053	0,220	0,035	-0,162	0,381	-0,122	0,113	0,283	0,226	0,485	0,167	0,496	0,508	-0,005	0,190	1,000	0,015	0,169	0,201	0,432	0,031	-0,361	-0,268	-0,205
S100A8	-0,044	0,017	0,418	0,182	0,665	0,145	-0,033	0,390	-0,105	0,137	-0,103	0,178	0,022	0,028	-0,125	0,112	0,146	0,015	-0,088	-0,017	0,363	0,110	0,091	-0,175	0,015	1,000	0,251	0,038	-0,063	0,016	-0,463	-0,160	0,264
S100A9	0,339	0,269	0,262	0,328	0,389	0,331	0,451	0,198	0,287	0,290	0,257	0,279	0,505	0,012	-0,001	0,187	0,149	0,219	0,353	0,314	-0,004	-0,022	-0,045	0,075	0,169	0,251	1,000	-0,052	0,065	0,360	-0,035	-0,029	0,346
Platelets	-0,382	-0,537	0,010	-0,449	0,090	-0,286	-0,247	-0,287	-0,091	-0,386	0,062	-0,197	-0,214	-0,177	-0,289	-0,170	0,014	-0,084	-0,033	-0,271	0,098	0,071	-0,162	0,211	0,201	0,038	-0,052	1,000	0,231	-0,566	0,055	-0,476	0,589
Quick	-0,220	-0,382	-0,315	-0,426	-0,233	-0,312	-0,320	-0,153	-0,354	-0,058	0,412	-0,105	-0,239	-0,166	0,030	-0,532	0,205	-0,279	-0,147	-0,364	0,308	0,193	-0,145	0,486	0,432	-0,063	0,065	0,231	1,000	-0,296	-0,128	-0,018	0,209
APTT	0,662	0,713	0,131	0,704	0,313	0,491	0,386	0,450	0,252	0,282	0,153	0,268	0,123	0,410	0,300	0,428	-0,188	0,612	0,523	0,762	-0,247	-0,411	-0,092	-0,512	0,031	0,016	0,360	-0,566</td					

5.17 Los leucocitos de los pacientes sépticos poseen perfiles de metilación del ADN alterados.

El análisis de la metilación del ADN se realizó con muestras obtenidas durante las primeras 6 h posteriores al ingreso en UCI. El análisis por Limma obtuvo 68.738 CpG metilados diferencialmente cuando se comparó el SS con los pacientes control de la UCI (38.276 CpG hipermetilados y 30.462 CpG hipometilados), 3 CpG cuando comparamos los pacientes con sepsis con los controles de la UCI y 6 CpG cuando comparamos el patrón de metilación de los pacientes con SS frente a los pacientes con sepsis. El análisis de componentes principales se generó a partir de la descripción general de las diferentes muestras y CpG metiladas diferencialmente, entre pacientes con sepsis, shock séptico y pacientes en estado crítico ingresados en la UCI (Figura 25A). La Figura 25A muestra diferencias globales en las CpG entre los tres grupos de pacientes, identificadas claramente por PCA. Los pacientes con SS se clasificaron como un grupo separado de los pacientes de UCI y los pacientes sépticos, con la excepción de la muestra 56A (Figura 25A). Los pacientes sépticos también se agruparon por separado a los sujetos utilizados como control de la UCI y de SS, aunque la muestra 73A estuvo cerca de los pacientes con shock séptico.

Así mismo, al utilizar el enfoque limma, creamos un histograma no supervisado de metilación del ADN para mostrar los 100 CpG (valores beta) metilados con metilación diferencial más significativa entre los pacientes, demostrando que los grupos mostraron una firma de metilación diferencial según el estado de su enfermedad (Figura 25B).

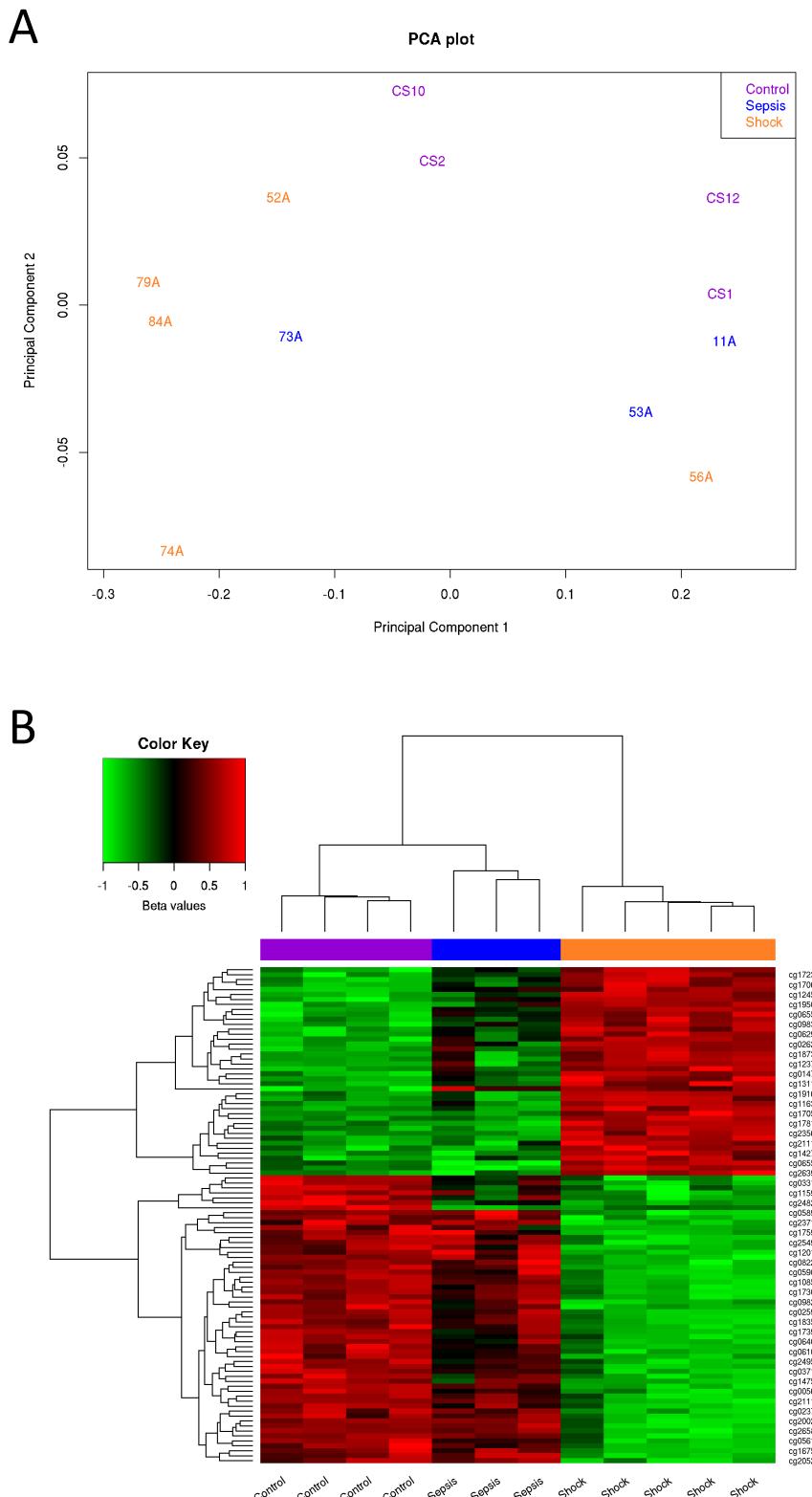


Figura 25. Exploración de datos. A) Análisis de Componentes Principales (PCA) de datos de metilación de pacientes control (UCI), sepsis y SS (en rojo, azul y verde, respectivamente). B) Mapa de calor de metilación del ADN que muestra las 100 principales CpG metiladas diferencialmente entre los controles y los pacientes con shock séptico, obtenido mediante el método limma. La métrica de metilación utilizada para obtener el mapa de calor son los valores

beta, escalados por la mediana, que se muestran en la escala de color superior izquierda, donde el rojo representa niveles de metilación más altos y el verde, niveles de metilación más bajos.

Además de evaluar los sitios CpG con metilación diferencial, también exploramos las regiones metiladas diferencialmente (DMR) (21) entre los diferentes grupos. Realizamos el análisis mCSEA para identificar DMRs en nuestra cohorte de pacientes (16). Los resultados mostraron hasta 1.619 DMR (801 promotores y 926 genes) en el SS en comparación con los pacientes no sépticos (controles de la UCI), 245 DMR en la sepsis en comparación con los pacientes no sépticos (control de UCI) (102 promotores y 148 genes), y finalmente 1.464 DMR en la sepsis en comparación con el SS (821 promotores y 732 genes). Estos resultados indicaron que la condición de SS produjo los cambios más altos en el perfil de metilación del ADN. Además, analizamos nuestros datos usando DMRcate. Este paquete extrae las regiones con metilación más diferencial (DMR) de las matrices EPIC850K BeadChip. DMR se refiere a una región genómica con múltiples sitios CpG adyacentes que exhiben diferentes estados de metilación entre múltiples muestras. Los DMRs, están adquiriendo relevancia como una de las variantes de metilación más importantes en el estudio epigenético en poblaciones, de hecho cambios en el perfil de metilación de las DMRs se han descrito en varios contextos, incluidas las funciones específicas de la impronta, específicas de tejido, específicas de reprogramación, específicas del cáncer y específicas del envejecimiento (219). Mediante el uso de la aproximación de análisis basada en la herramienta bioinformática DMRcate obtuvo 8.373 regiones que incluían genes y promotores para la comparación del SS con el control de UCI para las que la herramienta bioinformática limma produjo una gran cantidad de sitios CpG diferenciales. 4.378 de estas regiones estaban hipometiladas en muestras de SS, mientras que 3.995 DMR se encontraron hipermetiladas. Además, hasta 609 tenían una diferencia beta superior al 15%.

5.18 La disfunción orgánica y los niveles de lactato se asocian con cambios en la metilación del ADN

Posteriormente se analizaron los perfiles de metilación del ADN en relación con la escala SOFA, la puntuación principal utilizada para evaluar la disfunción orgánica. Los resultados mostraron que los cambios en la metilación del ADN se asociaron a cambios

en la puntuación SOFA, de hecho, los patrones de metilación del ADN de los 6.657 CpG se encontraron diferencialmente hipermetilados ($p > 0,01$) y pudieron clasificar los diferentes grupos de pacientes según la puntuación SOFA (Figura 26A).

Así mismo, también realizamos un análisis de la metilación del ADN en comparación con los niveles de lactato ya que los niveles de lactato superiores a 2mmol/L (>18 mg/dL) es un parámetro clave para clasificar a los pacientes con SS (22). Los resultados mostraron que los cambios de metilación del ADN se correlacionaron con los niveles de lactato. Además, los 6.657 CpG hipermetilados diferencialmente ($p > 0,01$) clasificaron a los pacientes de SS de acuerdo con los niveles de lactato. Sin embargo, los patrones de metilación del ADN no permitieron clasificar a los pacientes sépticos según los niveles de lactato, debido a que el estado de metilación en la sepsis y los pacientes de UCI mostraron un patrón similar. Este análisis sugirió que los cambios de metilación del ADN asociados con el daño orgánico implican cambios de metilación del ADN similares, siendo más prevalentes en los pacientes de SS, lo que está en consonancia con las guías de clasificación establecidas (22), ya que los pacientes sépticos no poseen niveles elevados de lactato, al contrario que los pacientes de SS (Figura 26).

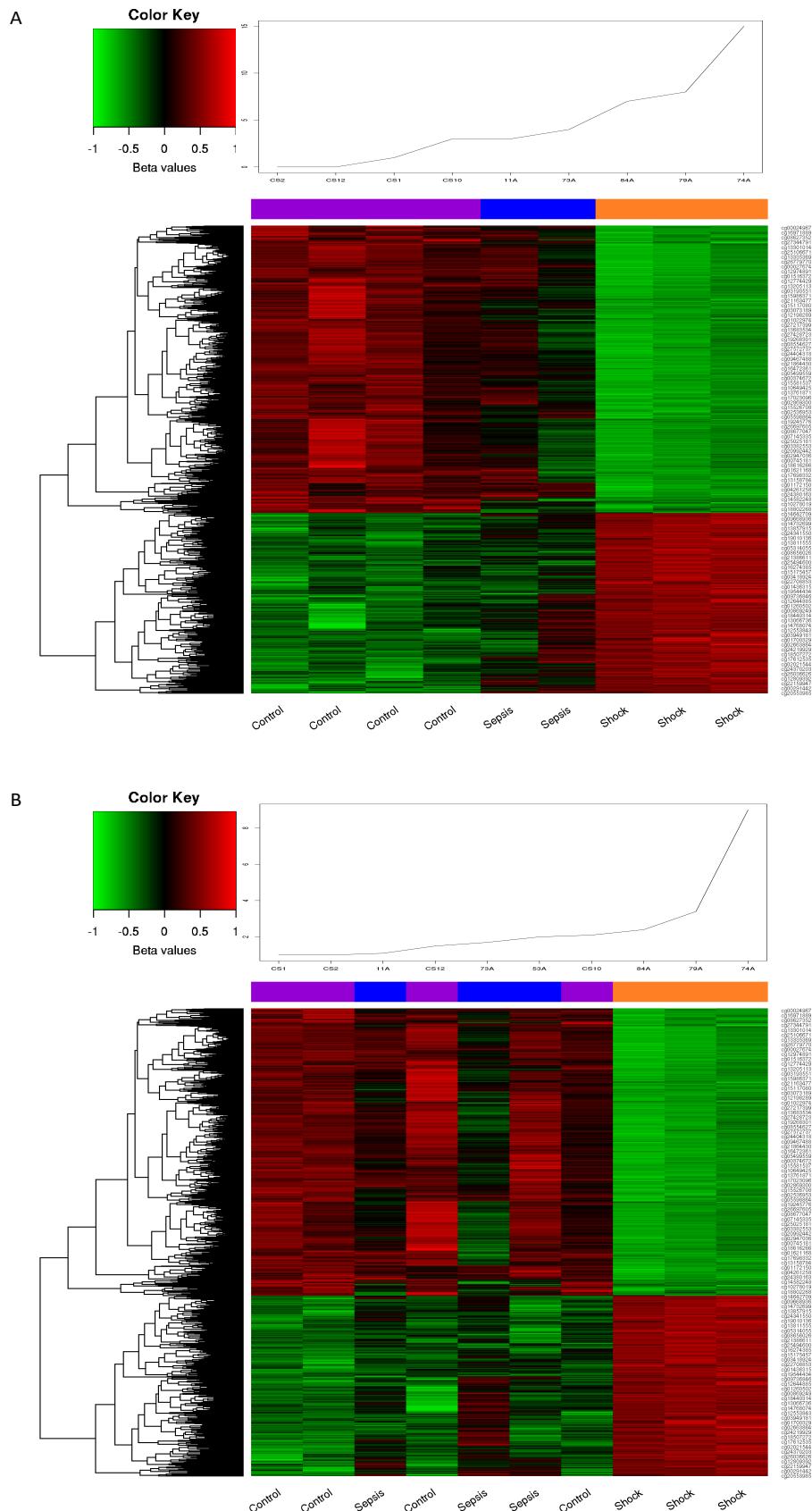


Figura 26. Mapas de calor de CpG en relación con parámetros clínicos. A) Mapa de calor de los 6657 CpG con metilación diferencial superior ($p > 0,01$) y 9 de las muestras ordenadas por su puntuación SOFA (Sequential Organ

Failure Assessment), que se representa en la parte superior del mapa de calor y muestra la puntuación SOFA de cada muestra. Se retiraron las muestras 52A, 56A (SS) y 53A (sepsis) para obtener el mapa de calor. Faltaban las puntuaciones SOFA para las muestras 52A y 56A; mientras que la puntuación SOFA de la muestra 53 es alta (9) y los grupos con muestras de SS en el mapa de calor, pero su perfil de metilación fue discordante con los 3 perfiles de metilación de SS. El mapa de calor que incluye la muestra 53A está disponible en los Materiales supplementarios. B) Mapa de calor de los 6657 CpG con metilación diferencial superior ($p > 0,01$) y 10 de las muestras clasificadas por sus niveles de lactato, que se representa en la parte superior del mapa de calor. Se retiraron del análisis las muestras 52A y 56A (SS) para obtener el mapa de calor, ya que no se disponía de sus niveles de lactato.

5.19 Implicaciones funcionales y biológicas de los cambios de metilación del ADN que ocurren en pacientes con sepsis y shock séptico

Con el fin de abordar las implicaciones funcionales de los DMR, utilizamos el enfoque de análisis usando la herramienta bioniformática mCSEA para identificar los procesos biológicos clave que subyacen a la sepsis y el shock séptico. El análisis de enriquecimiento de conjuntos de regiones mCSEA reveló procesos moleculares (Figura 27A) y biológicos de KEGG (Figura 27B) relacionados con la respuesta inflamatoria y el sistema inmune. Fueron de particular interés las vías KEGG relacionadas con la interacción citoquina-receptor de citoquina en el SS en comparación con los controles de UCI y la vía de señalización del receptor de células T y la diferenciación de las células Th17 en la sepsis en comparación con los controles de UCI (Figura 26A). Curiosamente, cuando exploramos los procesos biológicos de ontología genética (Figura 26B), encontramos una serie de vías moleculares con DMRs tanto en genes como en promotores, como la activación de células T, diferenciación de linfocitos, activación y desgranulación de los neutrófilos, regulación positiva en la producción de citoquinas y regulación de la respuesta inflamatoria, entre otros, en las comparaciones entre los tres grupos de sujetos estudiados.

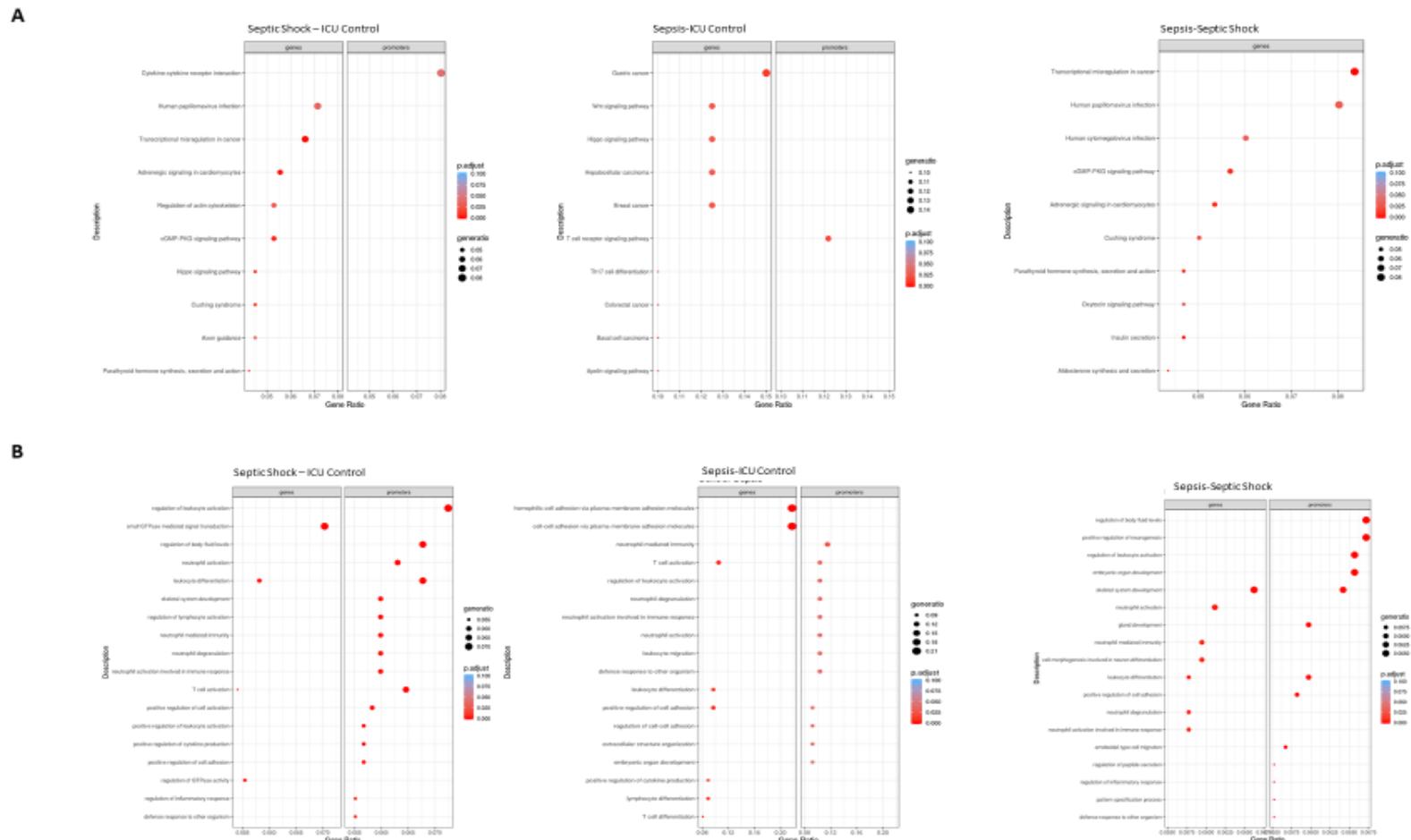
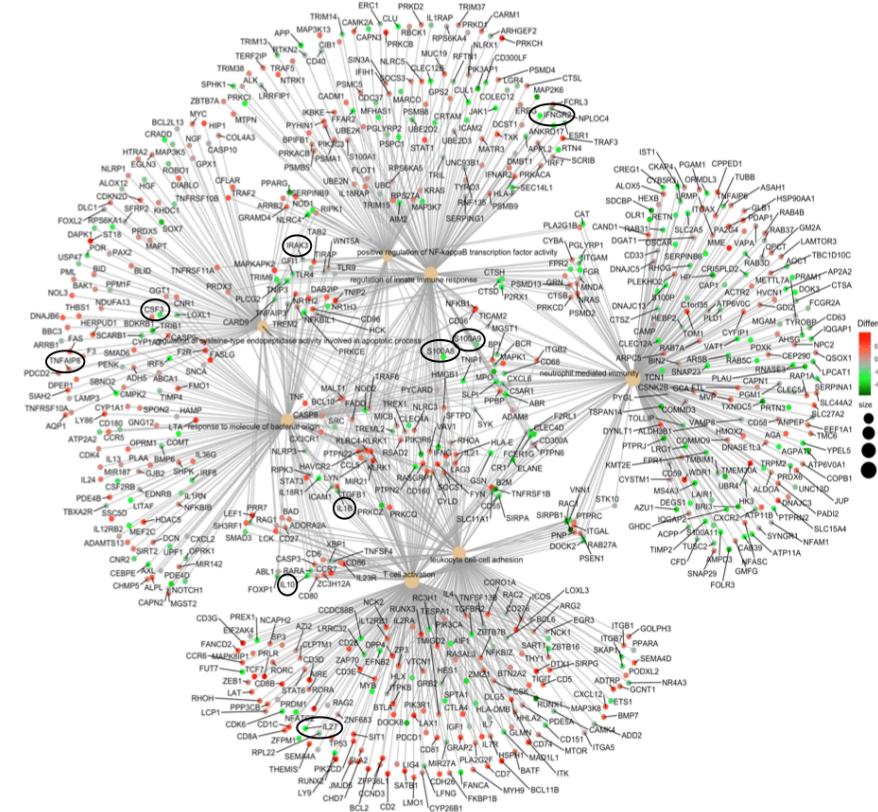


Figura 27. Análisis de la sobrerepresentación utilizando el enfoque mCSA. A) Gráficos de puntos de las vías de KEGG significativas obtenidas mediante el análisis de sobrerepresentación para los DMR, divididos entre genes y promotores para las tres comparaciones SS-control UCI, Sepsis-control UCI y SS-sepsis. El eje y representa los 10 mejores resultados de enriquecimiento, y la proporción de genes en el eje x representa la proporción de regiones involucradas en la vía metabólica sobre el número total de DMR. El tamaño de cada punto o grupo de genes depende del recuento de genes que contribuyen al enriquecimiento de esa vía. El valor p ajustado obtenido para los términos en la prueba exacta de Fisher del análisis de sobrerepresentación determina el color de los puntos. B) Gráficos de puntos de los 20 términos principales de GO-BP (proceso biológico) obtenidos para los DMR (genes y promotores) en las tres comparaciones.

El análisis de enriquecimiento también se realizó en el conjunto de DMR obtenidos de la comparación del grupo de SS con el grupo control de UCI mediante el uso de la herramienta de análisis bionformático DMRCate (Figura 28), y se encontraron las siguientes categorías significativas en la ontología de genes: inmunidad mediada por neutrófilos, activación de células T, adhesión leucocito célula-célula, respuesta a moléculas de origen bacteriano, regulación de la actividad endopeptidasa de tipo cisteína implicada en el proceso apoptótico, regulación de la respuesta inmune innata y la regulación positiva de la actividad del factor de transcripción NF-kappaB. En este sentido, las vías de KEGG que resultan del enriquecimiento de este conjunto de DMRs fueron: la vía de señalización del receptor de células T, expresión de PD-L1 y vía del punto de control de PD-1, vía de señalización del receptor de lectina tipo C, vía de señalización de TNF, aumento de la actividad de las células NK, vía de señalización NF-kappa B, diferenciación de células Th1 y Th2, diferenciación de células Th17, linaje celular hematopoyético e interacción citoquina-receptor de citoquina. Los genes asociados con los términos GO y las vías KEGG se muestran en las redes de conceptos genéticos (cnetplot) en la figura 28.

A)



B)

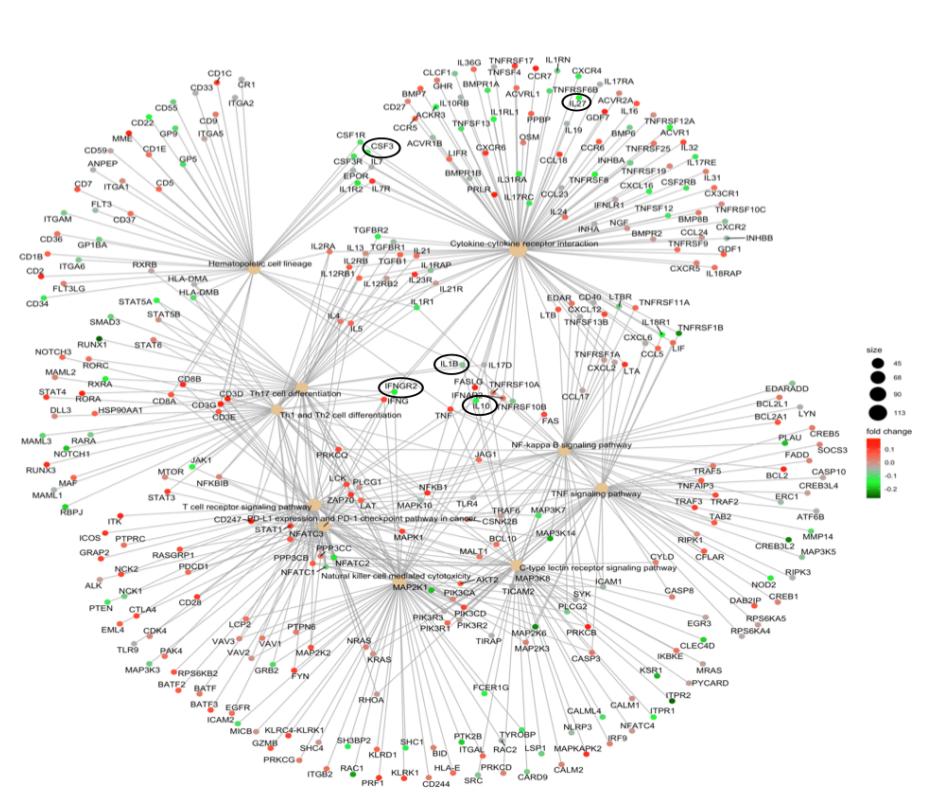
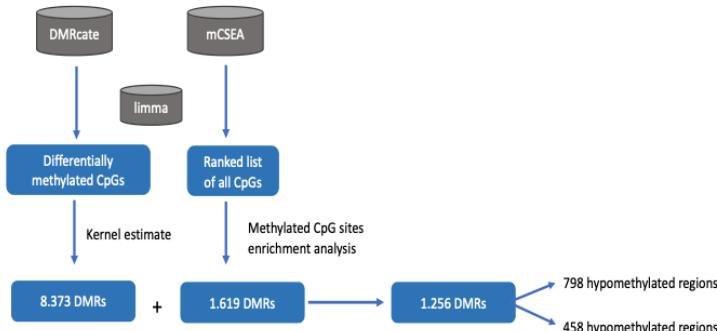
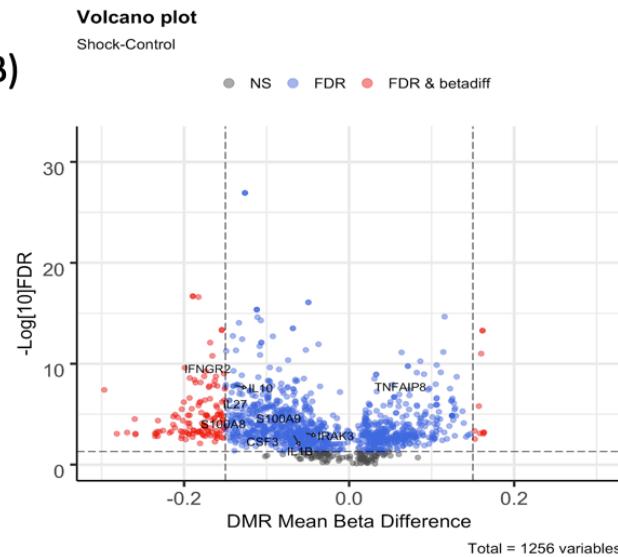
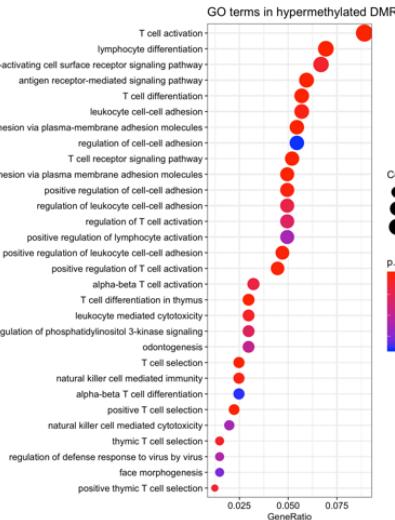
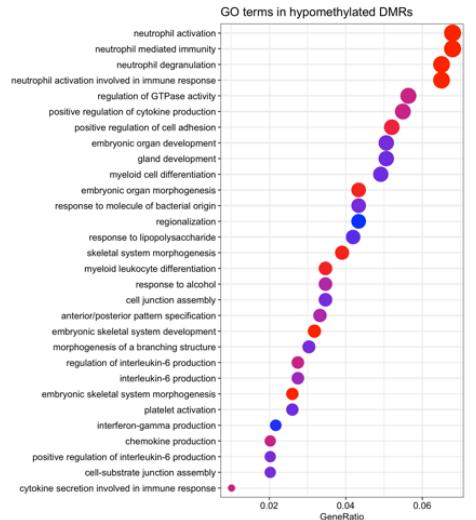


Figura 28. Redes de conceptos genéticos (cnetplot) de DMR obtenidos por DMRCate. A) Cnetplot de 7 términos del proceso biológico GO enriquecido (GO-BP) y B) Cnetplot de 10 vías KEGG enriquecidas relacionadas con la sepsis ligada a las características significativas -genes y promotores- involucrados en cada BP o KEGG en la comparación de SS vs control UCI, obtenida por DMRCate. Los gráficos de redes muestran el enlace de los genes involucrados en esos procesos, así como la relación entre los términos GO-BP o las vías KEGG, que están más cerca a medida que se comparten más genes entre los procesos. El tamaño del término GO o de los nódulos de la vía KEGG depende del recuento de genes implicados en la vía; mientras que los nodos de región o característica están coloreados por su nivel de metilación, ya sean hiper- o hipometilados, donde el color rojo representa regiones hipermetiladas en muestras de choque y el color verde muestra hipometilación.

5.20 La hipometilación y la hipermetilación se producen en DMR en el proceso de SS

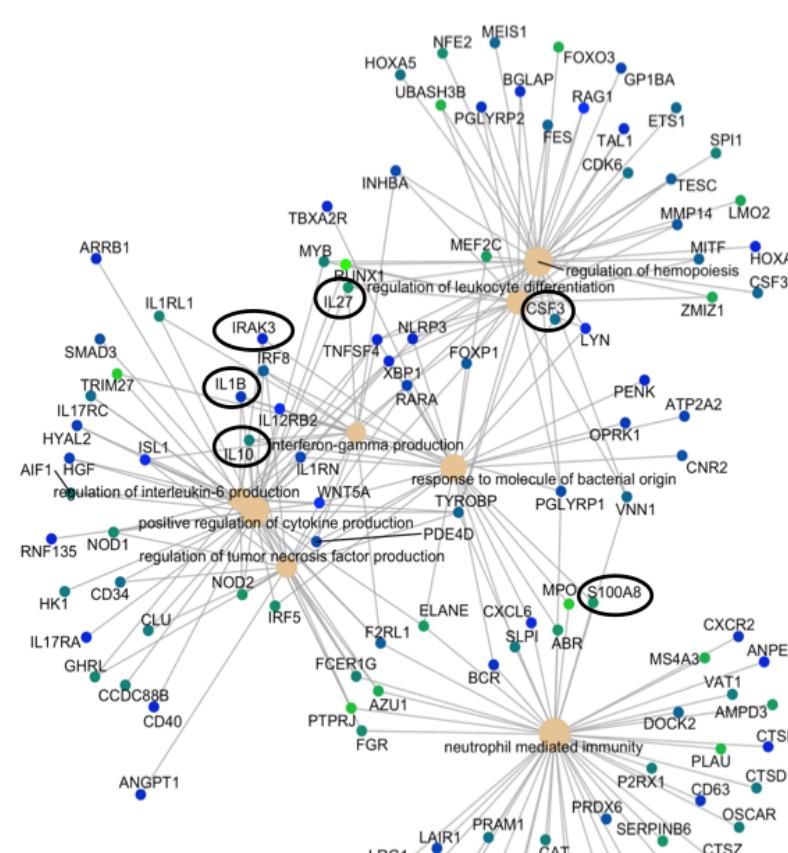
El número de regiones que coincidieron entre ambos conjuntos de DMR (generados usando mCSEA y DMRCate) fueron 1.256, de los cuales 798 fueron hipometilados y 458 hipermetilados (Figura 29A). Los 10 términos GO principales asociados con regiones hipometiladas de este conjunto de DMR fueron inmunidad mediada por neutrófilos, regulación positiva de la producción de citoquinas, regulación positiva de la adhesión celular, regulación de la producción de interleuquina-6, regulación de la producción de TNF, producción de interferón gamma, respuesta a la molécula de origen bacteriano y regulación de la hematopoyesis; mientras que los términos enriquecidos en las regiones hipermetiladas fueron activación de células T, diferenciación de linfocitos, vía de señalización del receptor de superficie celular que activa la respuesta inmune, adhesión célula-célula a través de moléculas de adhesión a la membrana plasmática (es decir, protocadherinas), vía de señalización mediada por receptor de antígeno y inmunidad mediada por células NK (Figura 29B).

Además, también representamos los resultados en redes génicas de conceptos que revelaron el vínculo de los términos GO con los cambios de metilación del ADN en genes específicos involucrados en el sistema inmunológico. En este sentido, al inspeccionar genes individuales con metilación diferencial significativa, encontramos que IL10, IL27, IL1B, IRAK3, CSF3, IFNGR2, S100A8 y S100A9 estaban hipometilados y TNFAIP8 hipermetilado. Estudios previos revelaron que estos genes estaban asociados con la sepsis, y se han relacionado en este estudio con procesos biológicos relevantes involucrados en la respuesta inmune durante la sepsis, lo que puede conducir a una respuesta inmune desregulada (Figura 29C).

A)**B)****C)**

D)

GO terms-hypomethylated regions



GO terms-hypermethylated regions

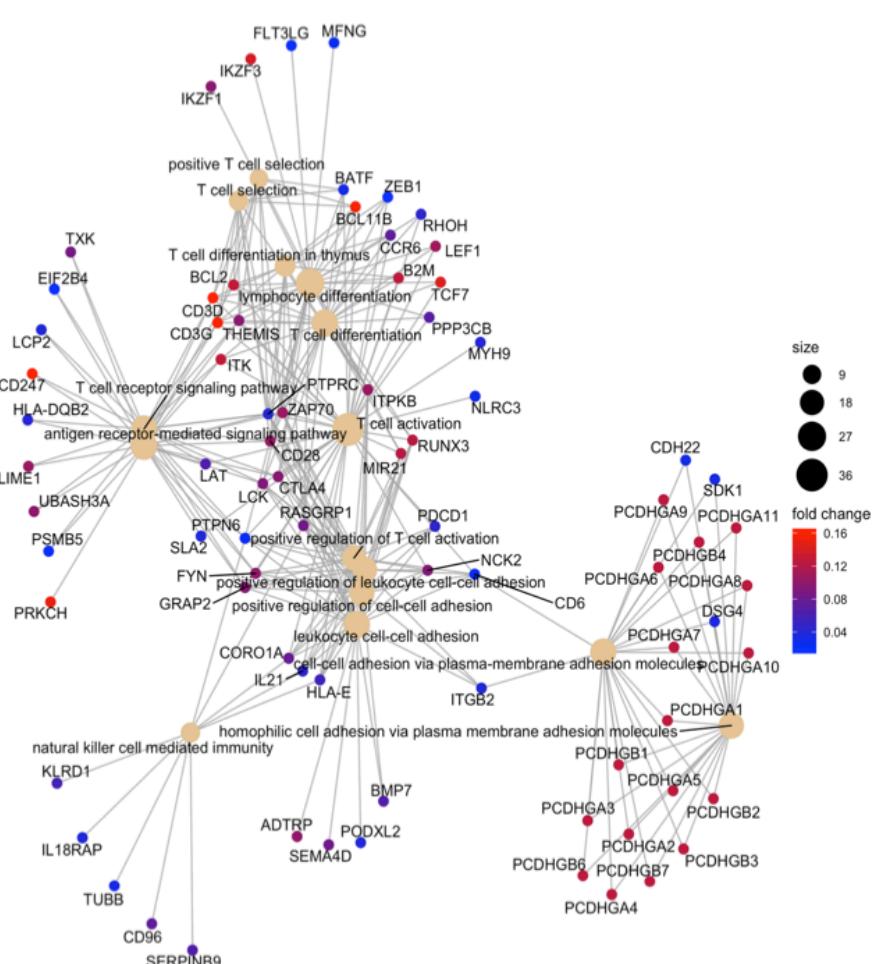


Figura 29. Resultados de DMRCate y mCSEA. A) Procedimiento para obtener los DMR por ambos métodos (DMRCate y mCSEA), e identificación de los DMR coincidentes utilizando sus respectivos paquetes. B) Gráfico de volcán de los 1256 DMR obtenidos por los enfoques DMRCate y mCSEA. Muestra la diferencia del valor beta en el eje x representado frente a -log10 FDR en el eje y. Los valores FDR y beta se recuperaron de la salida de DMRCate. Las regiones en negro corresponden a regiones no significativas del enfoque DMRCate (pero que contienen al menos un CpG diferencial significativo); las regiones en azul son regiones significativas en DMRCate, y las regiones en rojo son regiones significativas con una diferencia de valor beta medio superior a 0,15. C) Diagrama de puntos de los términos GO-BP significativos obtenidos por ORA para las regiones metiladas diferencialmente, separadas en hipometiladas e hipermetiladas entre pacientes con shock séptico e individuos de control en UCI. El eje y representa los 20 mejores resultados de enriquecimiento (términos GO-BP), y la proporción de genes en el eje x representa la proporción de genes involucrados en cada proceso biológico sobre el número total de DMR: hipermetilados y hipometilados respectivamente. El tamaño de cada punto o grupo de genes depende del recuento de genes que contribuye al enriquecimiento de ese término. El valor p ajustado obtenido para cada término en la prueba exacta de Fisher del análisis de enriquecimiento determina el color de los puntos. D) Cnetplots de términos GO-BP enriquecidos de DMR en la comparación de SS versus control, para regiones hipometiladas (izquierda), para las cuales se muestran 8 términos GO; y regiones hipermetiladas (derecha), para las que se muestran 15 términos GO. Cada BP está vinculado a las características significativas -genes y promotores- que participan en ese proceso. El tamaño de los nodos del término GO depende del recuento de genes involucrados en cada proceso biológico. El color de la región o de los nodos de características depende de su nivel de metilación, donde los colores verde y rojo muestran un mayor cambio en los niveles de metilación entre las muestras de control y de choque, en las redes hipometiladas e hipermetiladas, respectivamente; y el color azul muestra un cambio menor en los niveles de metilación en ambas redes.

Encontramos que varios genes que mostraban metilación diferencial están relacionados con respuestas inflamatorias e inmunes (Tabla 9) y algunos de estos genes se correlacionan con los previamente identificados por Severino P, *et al.*, y Lu X, *et al.*, (220,221). Posteriormente, buscamos DMRs en regiones que potencialmente puedieran regular la expresión de aquellos genes que se encuentran en los promotores o regiones reguladoras relevantes. Nuestros resultados demostraron regiones metiladas diferencialmente (DMRs) en los diferentes grupos de pacientes analizados en los promotores de citoquinas proinflamatorias (es decir, IL1 β , IL18, TNF α e IL17A), citoquinas pro y antiinflamatorias (es decir, IL10, IL21, IL25, IL27, IL31, IL-32, TGF- β e IFN- γ) y mediadores de inmunosupresión como el miembro de la superfamilia IL10, IL24, (222) S100A8 y S100A9. En la Figura 29D mostramos las diferencias de metilación en genes proinflamatorios y las diferencias en la metilación de promotores de mediadores antiinflamatorios e inmunosupresores en los tres grupos analizados. Los cambios en la metilación del ADN fueron consistentes en todos los sitios CpG del promotor en casi todos los genes analizados.

Entre las interleuquinas identificadas con metilación diferencial, la IL-27, que es producida por células presentadoras de antígeno (APC) activadas y mejora las respuestas proinflamatorias que pueden ocurrir durante las infecciones bacterianas al regular la expresión y función de TLR4 (223), mostró grandes diferencias de metilación entre grupos, estando hipometiladas en procesos sépticos y en los pacientes con SS. La IL-27 mostró una importancia especial debido a que esta interleuquina está implicada en la interconexión de la inmunidad innata y adaptativa al regular la diferenciación de las células Th vírgenes en células Th1 y en la activación de células monocíticas en términos de respuestas inflamatorias (206).

En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron a partir del análisis de enriquecimiento de genes asociados con los cambios en la metilación del ADN para anotaciones que implican procesos biológicos relevantes y rutas de KEGG para la validación de la metilación del ADN en una cohorte independiente de sujetos. De las diferentes comparaciones de DMRs, seleccionamos los genes candidatos funcionalmente relevantes para el estudio posterior en función de la significación estadística ($FDR < 0,05$). Los genes seleccionados estaban involucrados en la respuesta inflamatoria y los eventos de inmunosupresión y se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados del análisis de Sequenom Epityper: DMR significativos con una diferencia media superior a 0,05, al menos 1 CpG significativo y un umbral de valor p ajustado (FDR) de 0,05.

Grupo	Mediador Inmune	logFC	AveExpr	P-Valor	adj.P.Val	B
Sepsis vs Control	IL27	-0,6237859	-0,210237594	0,002765571	0,022124569	-1,698882327
SS vs Control	IL1_B	0,497147246	3,41515488	0,009762987	0,039051947	-3,2120491
	IL17	0,406553389	1,694089269	0,022413194	0,046599292	-3,957904277
	IL27	-1,007158785	-0,210237594	7,97289E-06	6,37831E-05	3,511773388
	IFN γ R	-1,160098752	-0,63788249	0,023299646	0,046599292	-3,992250719
	SS vs UCI	-0,732272874	-0,210237594	0,000770431	0,006163449	-0,62370901

Nota: logFC hace referencia al logaritmo del *False Change*, entendiéndose un valor negativo de este como una infraexpresión génica, mientras que su valor positivo se entiende como una sobreexpresión de los mismos; AveExpr hace referencia al valor medio de cada gen en todas las condiciones experimentales; adj.P.val hace referencia al p-valor ajustado para el control de la tasa de falsos positivos; B: representa la tasa de que el gen se exprese diferencialmente

5.21 Validación de los patrones de metilación del ADN por pirosecuenciación en pacientes críticos de UCI, sepsis, y SS.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos en los anteriores análisis obtenidos a partir del Methylation EPIC850K BeadChip, se procedió a su validación mediante la técnica de pirosecuenciación.

Para realizar la validación se escogieron las citoquinas y mediadores inmunes que mostraron mejores niveles de expresión, así como aquellas citoquinas y mediadores inmunes que mostraron patrones de metilación alterados en los pacientes sépticos, haciendo especial hincapié en aquellas moléculas que puedan estar jugando un papel importante en la inmunosupresión.

Los resultados obtenidos demostraron que la IL-10 se encontraba fuertemente hipometilado en los pacientes de SS, en comparación con los pacientes sépticos y los pacientes controles de UCI (Figura 30A). De hecho, aunque los pacientes de sepsis mostraron niveles de metilación en su región promotora inferiores a los controles incluidos como pacientes de UCI (25% y 35% respectivamente), no llegaron a encontrarse cambios estadísticamente significativos (p valor = 0,3). A su vez, los pacientes de SS mostraron niveles de metilación en la región promotora de la IL-10 del 15%, y tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los pacientes de shock séptico con los pacientes sépticos (p valor = 0,08). La hipometilación de IL-10, especialmente en los pacientes de SS, se correlacionó con los resultados obtenidos anteriormente, ya que los niveles de IL-10 en los pacientes de SS se encontraron elevados con relación a los otros grupos de estudio. Así mismo, los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias IL-17 y IL-18 no mostraron cambios en los niveles de metilación de su región promotora en ninguno de los tres grupos, a pesar de los cambios encontrados en los niveles de estas citoquinas circulantes en los pacientes de SS (Figura 30B y Figura 30C). Así mismo, la metilación de los DMRs identificados en el receptor para el IFN γ y el IFGR2, tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas en los ya que los tres grupos mostraron una fuerte hipometilación de esta región (Figura 30). Por último, en la región promotora de TREM2 sí se encontraron niveles reducidos en la metilación del ADN, demostrando una hipometilación en los pacientes de SS y de sepsis en comparación con los pacientes controles de UCI (Figura

30E). No obstante, no hubo diferencias en la metilación de la región estudiada en los pacientes de SS en comparación con los pacientes de sepsis.

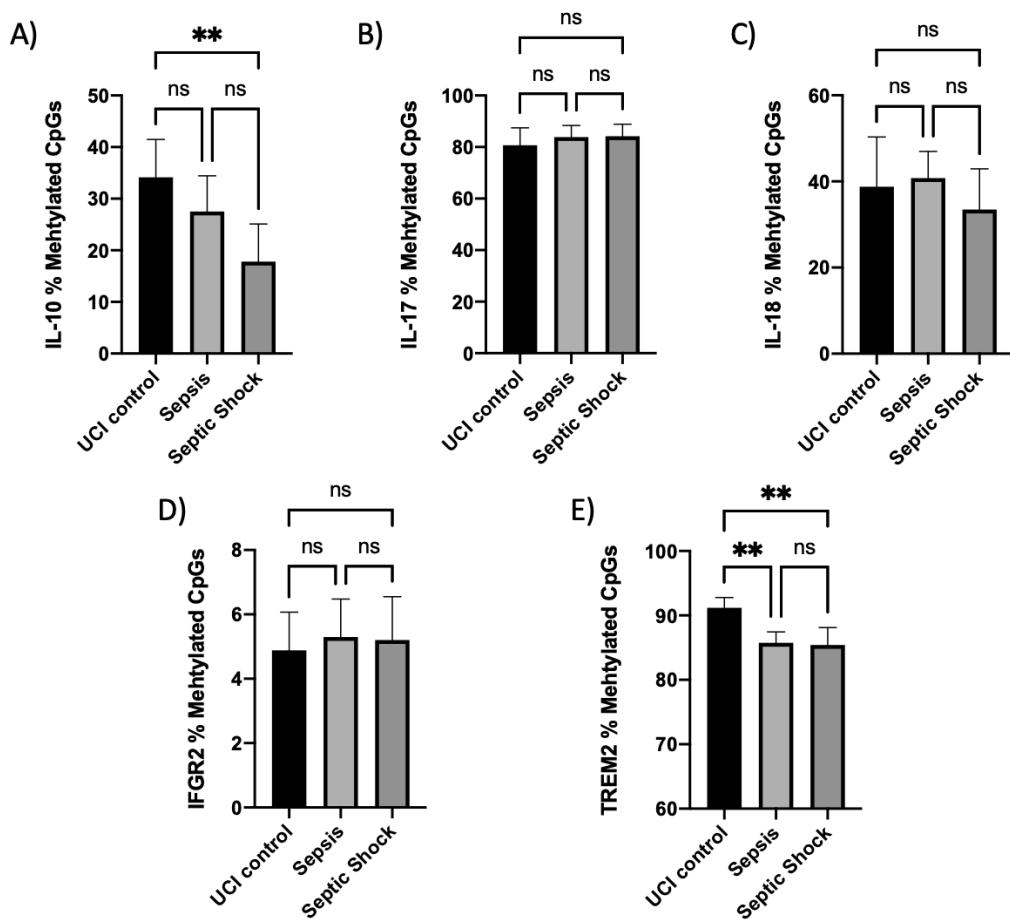


Figura 30. Análisis del estado de metilación de las regiones de interés mediante pirosecuenciación de los principales genes involucrados en la respuesta inmune temprana de la sepsis. A) Niveles de metilación de los promotores de la IL10; B) Niveles de metilación de los promotores de la IL17; C) Niveles de metilación de los promotores de la IL18; D) Niveles de metilación de los promotores del receptor IFGR2; E) Niveles de metilación de los promotores de TREM2.

6. DISCUSIÓN

6.1. Contexto actual de la sepsis. Histonas circulantes (y piroptosis) como mediadores clave de daño durante la sepsis

La sepsis es un síndrome altamente prevalente que se caracteriza por una respuesta inmune desregulada del huésped a la infección, mediada por una fase hiperinflamatoria inicial seguida de una respuesta antiinflamatoria, que a veces puede coexistir e inducir, en muchos casos, una inmunosupresión permanente. En particular, el SS es la peor condición clínica y se caracteriza por anormalidades circulatorias, celulares y metabólicas particularmente profundas, aumentando el riesgo de muerte.

Las histonas circulantes en sangre se reconocen como DAMPS en la sepsis, al inducir toxicidad celular a través de mecanismos dependientes e independientes de receptores de membrana (103,224). Algunos trabajos previos de nuestro grupo han demostrado como las histonas extracelulares son capaces de inducir mecanismos citotóxicos como la apoptosis (93), o regulatorios como la autofagia (96), de manera dosis-dependiente, influyendo sobre la homeostasis del endotelio. No obstante, se desconoce si es posible que ocurra la activación de inflamasomas endoteliales sin la intervención de células inmunes, ni siquiera se conoce si los inflamasomas endoteliales pueden ser activados por las histonas extracelulares, así como las consecuencias a nivel endotelial de esta activación, como pueden ser la disfunción o la lesión endotelial. Conocer el papel de las histonas extracelulares en la activación del inflamasoma y, posteriormente, la piroptosis y el daño endotelial, pueden desvelar los eventos complejos que ocurren en la sepsis (Figura 7). De hecho, la activación del inflamasoma NLRP3, el estrés oxidativo y la alteración de la homeostasis redox, así como la expresión de enzimas antioxidantes, la liberación de factores y mediadores implicados en la inflamación, la disfunción endotelial y la muerte celular son eventos estrechamente relacionados. De hecho, todas estas respuestas celulares contribuyen a la lesión vascular, la disfunción endotelial y la sobreexpresión de moléculas de adhesión, todos ellos relacionados con la sepsis (225,226).

Una investigación desarrollada por el grupo de Zhang, ha demostrado la activación de los inflamasomas endoteliales NLRP3 a través de un mecanismo dependiente de ROS en condiciones hiperglucémicas en un modelo endotelial vascular de ratón (227). Los autores han propuesto que este mecanismo de activación de la piroptosis puede iniciar la

disfunción endotelial (227). Así mismo, algunos autores demostraron que las histonas extracelulares inducen la activación de NLRP3 en células inmunes a través de mecanismos de estrés oxidativo (228) (Figura 7). De manera similar, nosotros sugerimos que el estrés oxidativo inducido de manera dosis-dependiente por las histonas extracelulares activa el inflamasoma endotelial, contribuyendo a la disfunción endotelial y la muerte celular.

El estrés oxidativo es uno de los principales impulsores de la inflamación y viceversa, y los últimos hallazgos sugieren un papel destacado del inflamasoma, contribuyendo a la función y la inmunidad mediada del endotelio, ya que el estrés oxidativo puede controlar la activación de NLRP3 (175,229–232). De hecho, se ha demostrado que el estrés oxidativo induce la activación de NLRP3 al desencadenar la desglutatónilación de la proteína ASC (por su nombre en inglés Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) para promover la piroptosis (233). Además, se ha descrito que la glutatónilación de NLRP3 ocurre en macrófagos (234), y su desglutatónilación se asoció con una mayor interacción de la proteína ASC glutatónilada y por lo tanto en estado inactivo, lo que a su vez produce la inhibición del inflamasoma NLRP3. Este hallazgo justifica la necesidad de nuevos estudios relacionados, ya que el GSH puede limitar por sí mismo la activación del inflamasoma. En este sentido, recientemente, Tang *et al.* demostraron que el GSH o GSSG exógenos inhibían fuertemente la activación del inflamasoma NLRP3 *in vitro* e *in vivo* (235). De manera similar, en este estudio se ha demostrado que el suministro de GSH mediante la pre-incubación de las células HUVEC con GSH-EE previno la muerte celular por piroptosis desencadenada por histonas extracelulares. Además, nuestros resultados mostraron que el estrés oxidativo mediado por las histonas es un actor clave en la activación de la piroptosis en las células HUVEC (Figura 7).

Una posible explicación del mecanismo de inducción del estrés oxidativo por histonas extracelulares se basa en el hecho de que las histonas extracelulares pueden introducirse en la membrana mitocondrial interna y externa de la célula, alterando el potencial de la membrana mitocondrial, lo que induce estrés oxidativo (236). Específicamente, esto puede deberse a la alteración de la permeabilidad celular como consecuencia de la exposición celular a histonas extracelulares, lo que a su vez altera el potencial de membrana de la mitocondria, provocando el desacoplamiento de la cadena de transporte

mitocondrial y en consecuencia el aumento de los niveles de ROS. En este sentido, nuestros resultados concuerdan con la idea de que el estrés oxidativo puede ser producido por la alteración del potencial de membrana. De hecho, la fuente de ROS puede ser una consecuencia directa de la desestabilización de las membranas externas e internas en las mitocondrias producidas por las histonas extracelulares (236). En nuestro modelo, el estrés oxidativo debería ser producido principalmente por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ya que el H_2O_2 ha demostrado su capacidad para producir proteínas carboniladas (237) y generar la forma hiperoxidada de Prdx6 (238). Además, nuestros resultados sugieren que la defensa antioxidante no es suficiente para atenuar el estrés oxidativo mediado por histonas, ya que la exposición de las HUVEC a histonas extracelulares provocó una respuesta antioxidante, elevando los niveles génicos y proteicos de las principales enzimas antioxidantes (SOD-1, SOD-2, CAT y GPX-1), aunque no obstante, no son capaces de atenuar los niveles de estrés oxidativo ya que el análisis demostró altos niveles de proteínas carboniladas y una fuerte expresión de la peroxiredoxina oxidada.

Curiosamente, la piroptosis de los neutrófilos está adquiriendo relevancia en la sepsis (239). Sin embargo, la piroptosis en las células endoteliales aún no se ha comprendido de forma completa en la sepsis ni tampoco se ha evaluado en pacientes. Por lo tanto, aquí describimos una nueva vía en la que las histonas extracelulares regulan la activación del inflamasoma NLRP3 en las células endoteliales humanas. En este sentido, nuestros resultados demostraron que las histonas extracelulares nativas inducen principalmente piroptosis y, en menor medida, apoptosis. La activación del inflamasoma NLRP3 induce la producción de IL-1 β e IL-18, promoviendo muchos efectos metabólicos, fisiológicos, inflamatorios, hematológicos e inmunológicos (229) (Fig7). De hecho, se sabe que la IL-1 β aumenta la generación de prostanoïdes, y en modelos de ratones que carecen de COX-2, se ha visto que la producción de IL-18 es defectuosa (240). Estos escenarios sugieren una interconexión entre el inflamasoma y la vía de biosíntesis de los prostanoïdes. Además, la IL-1 α , un producto liberado en la piroptosis no canónica, induce la expresión de los genes COX (241), que vincula el papel de las citoquinas liberadas por la piroptosis con la homeostasis del endotelio. Nuestros resultados concuerdan con los descritos previamente al demostrar que las

histonas extracelulares por encima de 50 µg / mL median la sobreexpresión de los genes *IL1B*, *IL18* e *IL1A* y, a su vez, *COX1* y *COX2*.

6.2. Papel del endotelio en el contexto de la sepsis

La sepsis altera la vasoconstricción modulando los niveles de prostanoides (242). En este sentido, el inflamasoma NLRP3 activa la PGE2 a través de la señalización IL-1 β / IL-1R (243). La generación de prostanoides dependiente de COX-2 en las células endoteliales juega un papel importante en la función vascular, que están desreguladas durante la sepsis y el SS (244). Nuestros resultados refuerzan la idea de que las histonas extracelulares alteran la homeostasis vascular al modificar la relación PGIS / TXBAS y afectar la expresión de eNOS, que a su vez altera la producción de NO. Esta alteración en la homeostasis vascular tiene consecuencias directas en la dilatación de los vasos sanguíneos, ya que estos mediadores actúan sobre las células del músculo liso e inhibir la agregación plaquetaria y la adhesión de leucocitos (245).

En respuesta a IL-1 (IL-1 α and IL-1 β), las células endoteliales expresan eSEL (246). Los neutrófilos y los monocitos se anclan al endotelio a través de eSEL para contribuir a la respuesta inmune (migración de leucocitos). Además, la expresión de IL1 y a su vez IL6, estimula la expresión de los ligandos endoteliales de unión fuerte, ICAM-1 y VCAM-1, lo que contribuye a detener el movimiento rodante del leucocito en el endotelio, permitiéndole realizar su función en el sitio de la inflamación (247,248). La activación del inflamasoma NLRP3 media la regulación positiva de las moléculas de adhesión endotelial, que son inducidas por ROS y IL-1 β (249,250). Estos resultados concuerdan con procesos moleculares con características de disfunción endotelial bien reconocidas que contribuyen al fenotipo de la sepsis grave (251). Además, ICAM-1 y VCAM-1 son actores clave en la adhesión de los neutrófilos, la migración transcelular y el daño orgánico durante la sepsis y el SS, y su sobreexpresión es una característica común en la sepsis (185,252,253). Nuestros hallazgos concuerdan con estos resultados y demuestran que las histonas extracelulares aumentan la expresión de moléculas de adhesión en HUVEC, siendo su sobreexpresión menos pronunciada cuando las HUVEC fueron tratadas con histonas hiperacetiladas.

Además, la escisión mediada de IL-1 β por la activación de la caspasa-1 está relacionada con la activación plaquetaria, la agregación y la formación de trombos, lo que contribuye a anomalías hemostáticas en la sepsis y el SS (254). Para aclarar el papel de la activación del inflamasoma mediada por histonas extracelulares, inhibimos el inflamasoma NLRP3 en HUVEC mediante el uso del inhibidor específico MCC950. Nuestros resultados mostraron una mejor viabilidad celular y una mejora en la función endotelial, y restauraron los niveles de mediadores proinflamatorios y factores de adhesión endotelial. Perera et al., (255) han descrito cómo MCC950 disminuye la activación de caspasa-1 y reduce la liberación de IL-1 β , IL-18, IL-1 α y NO en explantes de cáncer de colon. Por lo tanto, proponemos que el inflamasoma NLRP3 también es un mediador clave en la activación endotelial por histonas extracelulares (Figura 7).

Para demostrar que la piroptosis ocurre en pacientes con SS cuando estaban presentes altos niveles de histonas circulantes en sangre, analizamos los niveles circulantes de caspasa-1 y citoquinas piroptóticas. Nuestros resultados confirmaron que la piroptosis ocurre en pacientes con SS, en los que se encontraron elevados niveles de IL-18 y IL-1 α . Observamos una correlación positiva entre caspasa-1, IL-1 α , IL-18 y los niveles de las histonas circulantes, que cayeron dentro del rango de los niveles previos publicados por nosotros y otros autores (94,105,256). Como se describió anteriormente, las citoquinas piroptóticas median la sobreexpresión y la liberación de moléculas de adhesión endotelial, como observamos en el plasma de pacientes con SS. Nuestros resultados indican el papel de las histonas circulantes al mediar la piroptosis y la disfunción endotelial, contribuyendo así a la gravedad de la sepsis ya que los niveles de histonas circulantes mostraron una correlación positiva con la severidad de los pacientes según la escala SOFA y los niveles de lactato, y con la expresión de otras citoquinas proinflamatorias como TNF- α y IL-8. Además, encontramos altos niveles plasmáticos de dos mediadores endoteliales clave, e-SEL y s1-ICAM1, que están relacionados con mediadores piroptóticos como IL-1 e IL-18 e histonas circulantes y mostraron niveles más altos en pacientes con SS. Por lo tanto, sugerimos que el bloqueo de la activación aguas arriba del inflamasoma NLRP3 mediada por las histonas circulantes puede sentar las bases para una terapia factible. De hecho, nuestros estudios *in vitro* demostraron que al bloquear el inflamasoma NLRP3 con MCC950, era posible modular la activación del endotelio mediada por histonas extracelulares.

6.3. Papel de la acetilación como modificación post-traduccional de histonas

Por otra parte, hasta donde sabemos, nadie ha analizado previamente el efecto de las modificaciones post-traduccionales de las histonas en la citotoxicidad celular. Además de analizar el papel de las histonas circulantes al mediar la disfunción de las células endoteliales y la piroptosis, se evaluó el efecto de las modificaciones post-traduccionales en las histonas post-traduccionales. Nuestros resultados demostraron que las histonas extracelulares hiperacetiladas resultaron ser menos citotóxicas debido a que no eran capaces de inducir piroptosis y, por lo tanto, inducían un menor daño endotelial que las histonas purificadas nativas. Por consiguiente, aunque las histonas extracelulares hiperacetiladas también pueden activar el inflamasoma NLRP3, su efecto sobre la liberación de las citoquinas piroptóticas fue menos pronunciado que el causado por las histonas nativas.

Algunos autores han especulado sobre la importancia de la carga positiva de las histonas para mediar todos estos eventos, considerando que los agentes con carga negativa pueden atenuar los efectos mediados por histonas al neutralizar la carga positiva de las colas de histonas (257). De hecho, recientes descubrimientos de Meara y sus colaboradores han demostrado como los polianiones son capaces de neutralizar los efectos patológicos de las histonas (258), demostrando el papel fundamental de la carga eléctrica en la mediación citotóxica de las histonas, y por ende, en los mecanismos moleculares que activan. Con respecto a este punto, proponemos que la hiperacetilación de las lisina de las histonas con carga positiva puede contribuir a la menor actividad citotóxica de las histonas extracelulares en las células endoteliales. En consecuencia, se deben implementar nuevas estrategias terapéuticas en la sepsis en vista de la situación actual. En este sentido, el bloqueo de los mecanismos estimulados por las histonas circulantes como la piroptosis o la eliminación de las histonas extracelulares, o incluso el uso de inhibidores de histona desacetilasas para reducir la citotoxicidad celular mediada por las histonas circulantes, son estrategias terapéuticas factibles para el tratamiento de la sepsis. De hecho, el bloqueo simultáneo de NLRP3 y el aumento de la hiperacetilación de histonas puede ser una estrategia prometedora. Esto es consistente con los resultados recientes que describen una nueva generación de HDACi que ha demostrado su potencial para inhibir el inflamasoma NLRP3 (259).

6.4. El sistema inmune durante la fisiopatología de la sepsis

No obstante, además del papel clave que juega el endotelio en el desarrollo de la sepsis, el sistema inmune es quizás incluso más importante, ya que en última instancia es el que genera la respuesta del paciente al patógeno invasor, y la desregulación del sistema inmune es uno de los principales efectores en el desarrollo de la sepsis, además de que la inmunosupresión es la morbilidad más común, ya que el 40% de los pacientes que sobreviven a la sepsis acaban desarrollando inmunosupresión, lo que incrementa el riesgo de muerte (121). En este sentido, la caracterización de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas mediadas en pacientes sépticos y con SS puede revelar los eventos complejos que ocurren en la sepsis y ayudará a desarrollar nuevas terapias para mejorar el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de la sepsis (50).

Como se ha comentado previamente, nuestros resultados indican que la piroptosis está activa en pacientes con SS, lo que demuestra una intensa respuesta del huésped a la infección en esta condición patológica. Particularmente, proponemos a los neutrófilos como la principal fuente de citoquinas piroptóticas en pacientes con SS, ya que los neutrófilos son el tipo celular inmunitario más abundante, apoyados por el resto de leucocitos, principalmente macrófagos, y en vista de los hallazgos mostrados en esta tesis, regulados por el endotelio. Estos hallazgos pueden reforzar la idea de que los neutrófilos pueden actuar como una espada de doble filo en la sepsis grave (239,260), particularmente en el SS, que se corresponde con los fenotipos más severos en los pacientes que desarrollan una sepsis.

Es de destacar que, al analizar las distintas correlaciones clínicas de las diferentes citoquinas y mediadores inmunes analizados, la citoquina piroptótica IL-1 α se correlacionó con las puntuaciones de las escalas APACHE y SOFA. Así mismo, los niveles de lactato, así como de IL-18, se correlacionaron positivamente con los niveles de IL-1 α , lo que indica que los pacientes con niveles elevados de estos mediadores presentan fenotipos clínicos graves y tienden a tener un mal pronóstico. De manera similar, la IL-18 se correlacionó positivamente con I-CAM1, lo que indica que la inducción de piroptosis activa el endotelio para facilitar la migración de leucocitos a través del endotelio. Curiosamente, encontramos varios grupos funcionales que denotan altos niveles de citoquinas piroptóticas y su correlación positiva con mediadores

endoteliales como I-CAM1 y E-selectina, lo que indica que las citoquinas piroptóticas contribuyen a un estado hiperinflamatorio sistémico y la activación del endotelio (Tabla 7 y Tabla 8). Asimismo, los niveles de IL-18 se correlacionaron con los niveles de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1, también llamada CCL2), así como también mostró una correlación positiva de IL-18 con la proteína inflamatoria de macrófagos-1 β (MIP-1b, también llamada CCL4), lo que indica que la piroptosis también juega un papel en la respuesta de los macrófagos, como propusieron previamente otros autores (261). Además, IL-18 también se incluyó en el mismo grupo y se correlacionó con DD, APTT y el índice Quick, lo que confirma que la piroptosis participa como mecanismo en el empeoramiento de los pacientes sépticos al contribuir a la coagulación y la formación de trombos, como se describió anteriormente (262,263).

Nuestros resultados indican que la piroptosis es un actor importante en la orquestación de la respuesta inmune innata al menos en las primeras etapas del episodio de sepsis, contribuyendo a algunos de los fenotipos adversos que ocurren durante la evolución de la sepsis (Figura 8). Así mismo, la IL-17A es producida por células Th17 e induce la liberación de muchas citoquinas y quimioquinas (264). Además, IL-17A también induce la expresión de TNF- α en los macrófagos (265). Nuestros resultados mostraron que la IL-17A se expresa en grandes cantidades durante las primeras etapas de la sepsis, específicamente en pacientes con SS, quienes mostraron los niveles circulantes más altos para esta citoquina. Además, la IL-17A mostró una fuerte correlación positiva con TNF- α e IFN- α , así como con los mediadores IL-12, GM-CSF y MIP-1A (Tabla 7 y Tabla 8). Estos resultados demuestran que la IL-17A juega un papel destacado en la activación y función de los macrófagos y la inmunidad mediada por neutrófilos al estimular la producción en neutrófilos de moléculas proinflamatorias, incluyendo TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IL-8 (266). Así mismo, uno de los inhibidores más importantes de la diferenciación y el desarrollo de las células Th17 es la IL-27, que mostró niveles reducidos en pacientes con SS. Es importante destacar que la IL-27 regula positivamente las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas y modula negativamente las respuestas inmunitarias que contribuyen a la inmunosupresión. Además, la IL-27 regula negativamente el reclutamiento de los neutrófilos en el sitio de la infección y se ha demostrado que su regulación a la baja aumenta los niveles de neutrófilos (267). Con respecto a la proteína IP-10, que se expresa en elevados niveles en los pacientes con SS,

se ha demostrado que esta quimioquina ayuda a reclutar las células T efectoras CD4 C / CD8 inmunosupresoras que expresan CXCR3 (el receptor afín) y células T reguladoras (Treg). Por lo tanto, CXCR3 puede inhibir las respuestas inmunitarias adaptativas (a través de las células T efectoras y las células NK) (268). Por ello, la regulación a la baja que encontramos de IL-27 y los altos niveles de IP-10 sugieren que los mecanismos inmunosupresores están activos en pacientes con SS.

En cuanto a IFN- γ e IL-12, ambas proteínas juegan un papel clave en la respuesta inmune innata mediante la activación de macrófagos y células NK como se ha descrito previamente. De hecho, el IFN- γ es liberado por las células NK activadas, que estimulan a los macrófagos (269). Como resultado, los macrófagos activados liberan IL-12, que, a su vez, mejora la respuesta de las células NK al secretar más IFN- γ , creando así una potente retroalimentación positiva en la respuesta inmune temprana (203). Nuestros resultados mostraron que la IL-12 proinflamatoria estaba sobreexpresada en pacientes con SS. Además, la IL-12 también mostró una correlación positiva con la IL-8 proinflamatoria y la IL-10 antiinflamatoria, lo que indica que el SIRS y el CARS están simultáneamente activos en pacientes sépticos, tal y como nuestro grupo de investigación y otros autores hemos propuesto previamente (50,270). Curiosamente, la IL-12 también mostró una correlación positiva con S100A9, una proteína que juega un papel destacado en la regulación de los procesos inflamatorios y la respuesta inmune (271) mediante la amplificación extracelular de respuestas mediadas por TLR. Asimismo, también encontramos una correlación positiva entre IFN- γ e IFN- α con las mencionadas proteínas relacionadas con macrófagos, así como con IL-8 e IL-10, apoyando la idea de que los macrófagos y linfocitos NK están fuertemente activos durante la sepsis.

En cuanto a la función inmune mediada por el endotelio, algunas proteínas están involucradas con los macrófagos y la migración transendotelial como GM-CSF, que se encarga de estimular las células madre para producir granulocitos como neutrófilos y monocitos, y las citoquinas quimiotácticas como MIP-1 α y MIP-1 β y MCP-1, implicados en la infiltración de monocitos / macrófagos a través del endotelio. Curiosamente, todas estas proteínas se expresaron en gran medida en pacientes con SS, lo que indica que la migración transendotelial de macrófagos y neutrófilos debe estar

ocurriendo en los pacientes más graves y podría explicar, al menos en parte, algunos de los fenotipos adversos asociados. Nuestros resultados que evaluaron el cociente neutrófilos/linfocitos (relación NLR) en los subconjuntos de células inmunes sugieren que la respuesta más estimulada en pacientes con SS, en las primeras etapas de la enfermedad, está mediada por los neutrófilos, lo que da como resultado la subpoblación más abundante y, por lo tanto, promueve la inflamación neutrofílica que, a su vez, puede estimular la producción de IL-1 α e IL-1 β piroptóticas y la IL-6 pro-inflamatoria en los pacientes con SS (239). Sin embargo, la migración transendotelial depende en última instancia de la unión de neutrófilos y monocitos al endotelio a través de la E-selectina e I-CAM (Figura 8). Una de las interrelaciones más significativas que encontramos fue la formada por factores relacionados con la coagulación, mediadores endoteliales, citoquinas piroptóticas como IL-18 y citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 (Figura 7). Curiosamente, mientras que la E-selectina permite una unión débil de los leucocitos al endotelio y, por lo tanto, su desplazamiento hacia el sitio de la infección, la I-CAM induce una unión fuerte, manteniendo los leucocitos en el sitio de la infección para lograr que éstos desempeñen su función (272,273). Asimismo, la P-selectina se expresa rápidamente en respuesta a la trombina y, por tanto, participa en la formación de trombos y la agregación plaquetaria (274). En este sentido, nuestros resultados demuestran que los pacientes sépticos tienen los niveles más altos de E-selectina, lo que respalda la idea de que el endotelio colabora con la respuesta inmune frente a la infección (Figura 8). Además, los niveles circulantes de E-selectina también se correlacionaron con los fenotipos más graves y la muerte de los pacientes sépticos, concluyendo que los altos niveles circulantes elevados de E-selectina se asocian con daño endotelial severo y, por lo tanto, los niveles de E-selectina pueden considerarse un biomarcador factible para el pronóstico de la sepsis. Es importante destacar que los pacientes con SS también mostraron niveles altos de I-CAM1, que también se correlacionaron con un mal pronóstico, confirmando así el daño endotelial y postulando I-CAM1, solo o en combinación con la E-selectina, como biomarcadores candidatos para el pronóstico de la sepsis. Específicamente, I-CAM1 se correlaciona positivamente con la puntuación obtenida en las escalas APACHE y SOFA. De manera similar, se ha propuesto la P-selectina como un mediador central de la agregación plaquetaria y la formación de trombos en la sepsis (275). Por otra parte, los resultados obtenidos demostraron que el lactato se correlacionaba fuertemente con el mediador inmune

S100A8. Esta correlación es interesante porque, como se describió anteriormente, S100A8 tiene actividades inductoras de apoptosis y, por lo tanto, aumenta los niveles de lactato. Además, el S100A8 producido por los neutrófilos también puede promover la coagulación a través de un mecanismo que involucra la activación de las plaquetas (276,277), un proceso que también se ve facilitado por la expresión de P-selectina en la superficie de las plaquetas. Nuestros resultados mostraron diferencias en los niveles de P-selectina al comparar sepsis y SS con el grupo de pacientes de la UCI, lo que indica que los pacientes sépticos y SS podrían presentar un aumento de la agregación plaquetaria. En concordancia con esto, los niveles de E-selectina se correlacionaron con APTT, como ocurrió para i-CAM1, DD y el índice Quick, concluyendo que el endotelio juega un papel importante en la coagulación en los pacientes con SS.

En cuanto a la respuesta inmune adaptativa, también se analizaron las interleuquinas IL-4 e IL-13. Estas citoquinas se encontraron en el mismo grupo junto con IL-17A y GM-CSF. La sobreexpresión de estas proteínas unidas a MIP-1 α (también llamado CCL3) e IFN- α sugiere la activación de los macrófagos. IL-4 es producida por células Th2 activadas y junto con IL-17A producida por las células Th17 proporciona un medio inflamatorio crónico en pacientes clínicamente enfermos. Curiosamente, la IL-4 puede actuar como una molécula antiinflamatoria al bloquear la síntesis de las proteínas IL-1, TNF- α , IL-6 y MIP-1 (278). De igual forma, la IL-13 es producida por los linfocitos T y juega un papel fundamental en la regulación de la función de los monocitos y las células B al modular la producción de IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-8 y MIP-1 (279). Además, la IL-4 estimula el crecimiento y la diferenciación de las células B e inhibe las células Th1 y la producción de citoquinas inflamatorias (280). Nuestros resultados mostraron que los pacientes con SS no mostraron diferencias en los niveles circulantes de las interleuquinas IL-4 e IL-13 en comparación con los otros grupos de pacientes, lo que sugiere que, por un lado, estas citoquinas no están inhibiendo la expresión de IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y MIP-1, mientras que, por otro lado, los linfocitos T pueden no estar completamente activados en este grupo de pacientes (Figura 8).

6.5. Metilación del ADN como modulador de la respuesta inmune y la inmunosupresión durante la sepsis

En cualquier caso, la comprensión de este complejo síndrome requiere un conocimiento profundo de fisiología, patología, metabolismo, bioquímica, inmunología y epigenética. En este sentido, con el fin de caracterizar los mecanismos moleculares que guían la respuesta inmune que observamos en los pacientes sépticos, se procedió a analizar los patrones de metilación del ADN ya que se ha demostrado ampliamente que la metilación del ADN es uno de los procesos epigenéticos más importantes en la remodelación de la expresión génica (281). En particular, explorar la metilación del ADN en las células inmunes puede ayudar a comprender la relación entre la epigenética y el inmunometabolismo, contribuyendo así a dilucidar los intrincados mecanismos implicados en la inmunosupresión y, a su vez, a predecir comorbilidades futuras (50,282).

La sepsis promueve inmunosupresión (45) y simultáneamente a la fase inicial de la respuesta hiperinflamatoria, se produce un síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria, conocida como CARS, que induce un fallo o agotamiento del sistema inmunológico innato y adaptativo, mediando así la inmunosupresión. Por tanto, la inmunosupresión sirve para compensar la producción excesiva de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas inmunomoduladoras en el huésped, pudiendo durar meses e incluso años (Figura 3).

Se han descrito varios mecanismos implicados en la inmunosupresión como cambios en el metabolismo glucolítico de los leucocitos (283), el aumento de la apoptosis de las células inmunes como macrófagos y linfocitos T (284), alteraciones en la diferenciación de células mieloides, aumento de células Treg (140,285) y proliferación de células supresoras derivadas de células mieloides (MDSC) (286). Sin embargo, aunque algunos mecanismos se relacionan con la inmunosupresión, se necesitan mucho más esfuerzos para caracterizar aún más los mecanismos de inmunosupresión y desarrollar herramientas de diagnóstico y terapias para la supervivencia a largo plazo de los pacientes inmunosuprimidos.

Por lo tanto, los mecanismos que pueden modificar los patrones de expresión génica son de particular interés tanto para la investigación como para la clínica, como posibles mediadores del fenotipo inmunosupresor después de la sepsis y el SS. En este sentido, la epigenética aparece como una herramienta potencial para identificar nuevos mecanismos y vías moleculares afectadas durante la sepsis y desarrollar nuevas herramientas de diagnóstico y pronóstico para identificar pacientes inmunosuprimidos y predecir morbilidades futuras.

Los resultados obtenidos demostraron cambios en la metilación del ADN en genes relacionados con la respuesta inmune y las vías de señalización inflamatorias. Estos son de especial importancia porque encontramos que estos genes estaban regulados positivamente en pacientes con SS, similar a los encontrados en sepsis severa, descritos previamente por Severino *et al.* (220) y más recientemente por Lu *et al.* (221) utilizando datos de expresión génica diferencial en pacientes con sepsis causada por bacterias gram-negativas e individuos sanos (tal y como se puede ver en los datos asociados a los estudios de transcriptómica que se pueden consultar a través del GEO con el nº de acceso: GSE69528 (287) y el nº de acceso: GSE46955) (288)), descargados de la base de datos Gene Expression Omnibus. Por tanto, nuestros resultados concuerdan con los descritos previamente por Severino *et al.* y Lu *et al.* en los que genes como *S100A8* o *S100A9* estaban hipometilados en sepsis y shock séptico y por lo tanto se regulaban positivamente en estas condiciones (220,221). Relacionado con la puntuación SOFA, nuestros resultados están en consonancia con los resultados obtenidos por Lorente-Sorolla *et al.* (132) y muestran que el patrón de metilación se correlacionó con la puntuación de la escala SOFA en los pacientes en UCI, sepsis y SS. De la misma manera, el estado de metilación del ADN también se correlacionó con los niveles de lactato en pacientes con SS, demostrando que la metilación del ADN está jugando un papel clave en inmunometabolismo durante la fisiopatología de la sepsis. Durante las respuestas primarias a las bacterias gram-negativas, los macrófagos producen IL-1 β , IL-18 y TNF α proinflamatorios para la eliminación de microorganismos. Después de la inducción de tolerancia a LPS, se ha demostrado que la cromatina en los macrófagos está enriquecida en modificaciones post-traduccionales de histonas represivas (como por ejemplo H3K9me2) en las regiones promotoras de IL-1 β y TNF α (289,290). Nuestros resultados indican que durante las primeras etapas del shock séptico (primeras

24 h después de la admisión a la UCI) el promotor de IL-1 β está hipometilado en comparación con los pacientes críticamente enfermos con procesos sépticos activos no relacionados. En cuanto al promotor de IL-18 que media estados proinflamatorios, el patrón de metilación del ADN mostró un estado hipometilado que se corresponde con un incremento de expresión proteica en pacientes con shock séptico, como demuestran nuestros resultados. Sin embargo, los patrones de metilación que obtuvimos para TNF α (hipometilación en la región promotora) no se asociaron con los niveles de TNF α circulante. De hecho, solo obtuvimos diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes de shock séptico y los pacientes con sepsis. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Qiu *et al.* que postuló a TNF α como un mediador clave de la gravedad de la sepsis (291).

El aumento de citoquinas antiinflamatorias (como TGF- β e IL-10) y citoquinas TH2 opuestas a TH1 (como IL-13) durante el CARS es útil para contrarrestar las respuestas proinflamatorias del SIRS (292,293). Además, la citoquina antiinflamatoria IL-10 inhibe la expresión de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II (HLA-DR) en la superficie de los macrófagos y los monocitos que, además de TGF- β , suprime la proliferación de células T, contribuyendo a la inmunosupresión durante la sepsis (294,295). En este sentido, se ha demostrado que la expresión de HLA-DR se suprime en la mayoría de los pacientes con sepsis en etapas tempranas, pero su expresión se recupera en diez días en los supervivientes (48). Estos hallazgos están de acuerdo con nuestros resultados de metilación que mostraron un estado de hipermetilación en los promotores de HLA-DMB en pacientes con SS, lo que contribuye a una disminución en la expresión de proteínas de HLA-DMB. Además, se ha demostrado cómo los niveles de IL-10 se correlacionan positivamente con el porcentaje de células Treg en la población de células T CD4 + en pacientes con infecciones posoperatorias (296). En nuestros resultados, también encontramos que la hipometilación de IL10 se correlaciona con niveles elevados de IL-10 en el plasma de pacientes sépticos. Esto es relevante porque el papel antiinflamatorio de IL-10 al inhibir la expresión de mediadores proinflamatorios, como TNF α e IL-1 β , y al conferir resistencia disminuida a organismos patógenos durante la sepsis (297).

Por otra parte, otro factor clave que contribuye a la inmunosupresión es la proliferación de células supresoras derivadas de células mieloides (MDSC) que desempeñan potentes

funciones inmunosupresoras en cáncer (298) y las enfermedades inflamatorias (299). En este sentido, se ha descrito que los genes implicados en las funciones supresoras de las MDSC, que codifican para los factores solubles S100A12, S100A8, S100A9, MMP8, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), IL-6, IL-10, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), TFG-β y ARG1, tenían los niveles elevados en la sangre periférica de pacientes con sepsis (54). Nuestros resultados mostraron cómo los promotores de los genes *S100A8*, *S100A9* e *IL10* estaban hipometilados en las primeras etapas de la sepsis y el SS, lo que sugiere que los eventos de inmunosupresión están ocurriendo concomitantemente con la tormenta de citoquinas. Además, también observamos hipometilación de CSF3, el factor estimulante de colonias de granulocitos 3 o G-CSF, que es el principal regulador de la producción de neutrófilos en condiciones basales de hematopoyesis y también es esencial para la granulopoyesis en respuesta a las infecciones bacterianas para mejorar las funciones de los neutrófilos, así como prevenir la acción sobreestimulada de los neutrófilos durante la infección (300). Las células T inducen la producción de G-CSF a través de la liberación de IL-17, por lo que existe una correlación positiva entre los niveles de expresión de G-CSF e IL-17 y la hipometilación detectada en ambos genes *CSF3* e *IL17* como también observamos en nuestros resultados. Los resultados de metilación del ADN obtenidos concuerdan con los resultados descritos anteriormente, confirmando la coexistencia de respuestas proinflamatorias y antiinflamatorias en las fases tempranas de la sepsis y el SS. Tanto la respuesta proinflamatoria como la antiinflamatoria promueven la inmunosupresión del paciente, por lo que son más susceptibles a infecciones secundarias y comorbilidades a largo plazo. Es importante destacar que la inmunosupresión post-sepsis no solo se limita a las respuestas antiinflamatorias durante el CARS, ya que los pacientes sépticos pueden sufrir una supresión no solo en las funciones proinflamatorias en las células inmunes innatas, sino también en las células inmunes adaptativas (17,37,301,302).

Otro gen relevante evaluado en nuestro análisis fue *IRAK3*, la quinasa M asociada al receptor de IL-1, una proteína asociada al sistema inmunológico que regula negativamente la señalización de receptores tipo Toll (TLRs) y media aspectos críticos de la inmunidad innata que resultan en un estado inmunodeprimido durante la sepsis (303). Es importante destacar que la expresión de *IRAK3* está elevada en los monocitos sanguíneos de pacientes con sepsis (221,304), y aún más en SS (305). Nuestros

resultados mostraron que el promotor del gen *IRAK3* se encuentra hipometilado en sepsis y SS, lo que contribuye al aumento de IRAK3 circulante en pacientes con sepsis y SS. Por último, en el análisis de la metilación del gen *TREM2* encontramos niveles hipometilados en su región promotora, lo que a su vez se traduce en un aumento de la expresión de este gen. Esto es especialmente relevante ya que la proteína TREM2 funciona como regulador inmune, y se ha relacionado con la inflamación crónica al desencadenar la producción de citoquinas inflamatorias de forma constitutiva (306). Especialmente, TREM2 desencadena la activación de las respuestas inmunes en los macrófagos y las células dendríticas en respuesta a la señalización mediada por los TLRs (307). Así mismo, TREM-2 suprime la señalización de PI3K y NF-kappaB en respuesta al lipopolisacárido, promoviendo así la fagocitosis, suprimiendo la producción de citoquinas proinflamatorias y el óxido nítrico, inhibiendo la apoptosis y aumentando la expresión de IL10 y TGFB. Además, durante el estrés oxidativo, promueve la señalización anti-apoptótica de NF-kappa-B y la señalización ERK (por similitud) (308). No obstante, TREM-2 no solo funciona como regulador de la respuesta inflamatoria, sino que también sirve como receptor fagocítico para las bacterias. Específicamente en la sepsis, se han encontrado niveles elevados de TREM-2 en los pacientes sépticos (309), y se le ha relacionado con la supervivencia de estos pacientes (310), ya que la deficiencia de TREM-2 restringe la respuesta inflamatoria, disminuyendo así el daño orgánico y la mortalidad. No obstante, niveles elevados de TREM-2 también se relacionan con fenotipos inmunosupresores (311), ya que induce la expresión de citoquinas inmunosupresoras como la IL-10 o TGF-β, promoviendo así una respuesta antiinflamatoria sostenida en el tiempo (312). Los niveles hipometilados encontrados en las regiones promotoras del gen *TREM2* sugieren que TREM-2 puede estar jugando un papel antiinflamatorio compensatorio durante los primeros estadios de la sepsis, posiblemente contribuyendo al CARS. No obstante, también puede estar jugando un fuerte papel inmunosupresor en los pacientes de SS.

En resumen, nuestros estudios proporcionan más información sobre los mecanismos moleculares que contribuyen a la gravedad de la sepsis estimulada por las histonas circulantes y su papel como inductor de la piroptosis en las células endoteliales, contribuyendo así a la inflamación, el estrés oxidativo, la respuesta antioxidante enzimática alterada y la disfunción endotelial (Figura 31). Además, nuestros resultados

indican que en las primeras etapas de la sepsis el sistema inmune innato intenta contrarrestar la infección, principalmente a través de los neutrófilos (Figura 18). Por el contrario, el sistema inmune adaptativo aún no está completamente activado, ni en pacientes sépticos ni en SS en las primeras horas del ingreso de los pacientes en la UCI. Así mismo, las respuestas inmunosupresoras y las señales de pro-coagulación están activas en los pacientes con SS, demostrando el estado dual pro-inflamatorio-inmunosupresor (PICS-CARS) de los pacientes sépticos (Figura 3). No obstante, pesar de los últimos avances y hallazgos, aún existe un escaso conocimiento clínico y científico sobre el tiempo de aparición y la evolución de los eventos inmunosupresores, y su capacidad para predecir el desenlace fatal o mortalidad tardía de los pacientes que han desarrollado una sepsis. Así mismo, también hay poca información sobre cómo la epigenética puede modular los fenómenos de inmunosupresión y por lo tanto afectar la supervivencia de los pacientes. Incrementar nuestro conocimiento actual sobre el mecanismo subyacente de la inmunosupresión puede ayudarnos a respaldar nuevas terapias inmunomoduladoras basadas en el control de los mecanismos epigenéticos.

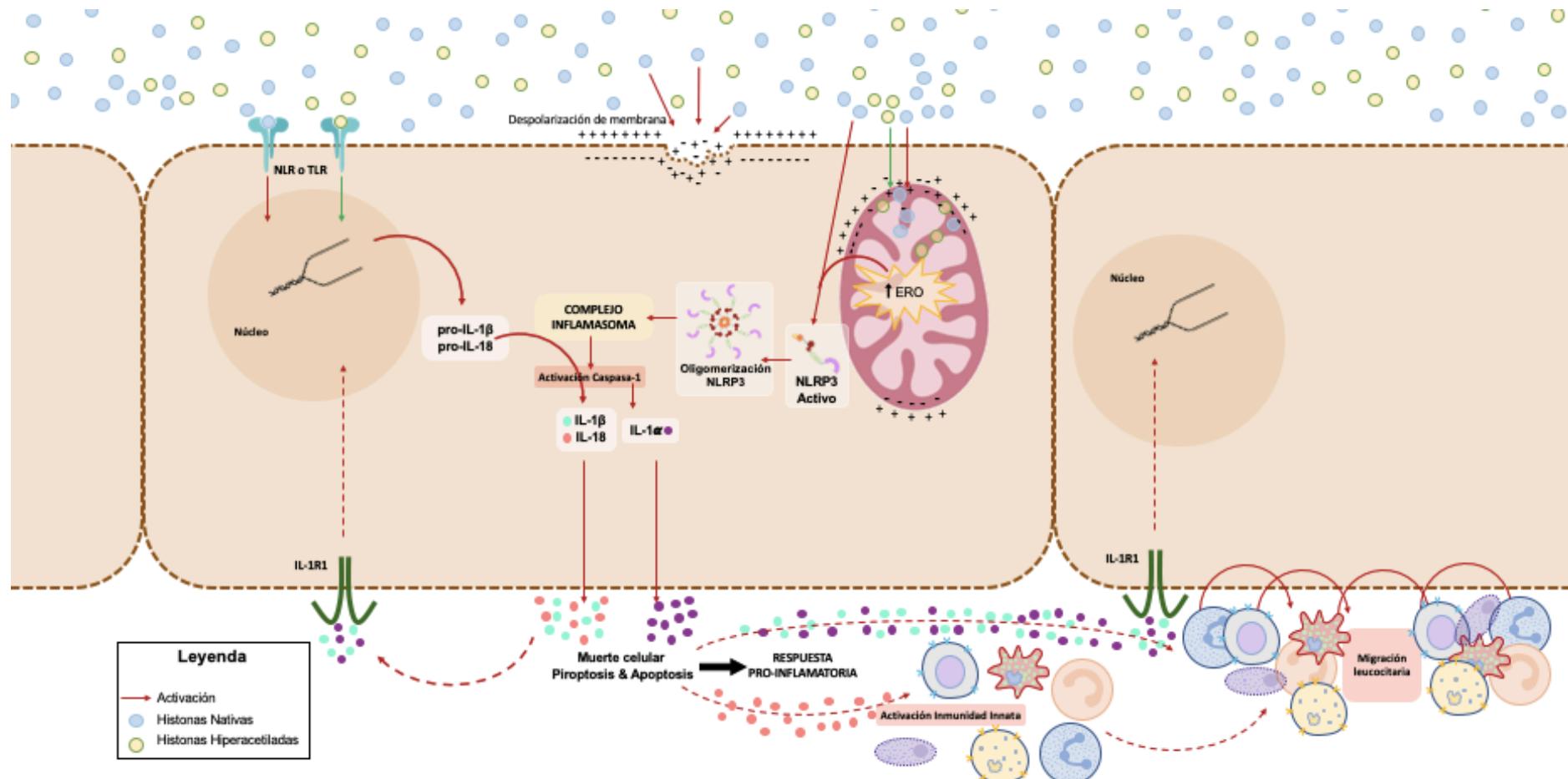


Figura 31. Esquema de las cascadas piroptóticas que pueden estar activadas por las histonas circulantes

7. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

7.1. CONCLUSIONES

1. Las histonas extracelulares son capaces de activar la piroptosis endotelial a través de la activación de NLRP3 en un mecanismo en el que participa el estrés oxidativo.
2. La inducción de la piroptosis endotelial produce muerte celular, inflamación y una fuerte desregulación endotelial, mecanismos que pueden ser evitados induciendo la hiperacetilación de las histonas, utilizando moléculas antioxidantes como el GSH-EE o bloqueadores específicos de NLRP3 (MCC950).
3. Las histonas circulantes se encuentran en niveles elevados en los pacientes sépticos con fenotipos clínicos severos (SS) en el momento del ingreso en UCI.
4. Las histonas se correlacionan con marcadores de severidad (SOFA, APACHE y niveles de lactato), marcadores de daño endotelial (i-CAM1 y E-SEL), marcadores inflamatorios (IL1- α , IL-6, IL-8, IL-10) y mediadores inmunes (CCL2, CCL3, CCL4, S100A9), indicando el papel principal de las histonas durante los primeros estadios de la enfermedad.
5. En los primeros estadios de la enfermedad, los pacientes sépticos tienen una fuerte activación de la inmunidad innata, demostrando que la piroptosis está activa en los primeros estadios de la enfermedad, intentando contrarrestar la infección. Sin embargo, la respuesta inmune adaptativa no está activa, lo que dificulta la respuesta inmune y permite el desarrollo simultáneo del SIRS y el CARS, contribuyendo en última instancia a la inmunosupresión.
6. Los pacientes de shock séptico presentan alteración en el patrón de metilación del ADN en las células inmunes, lo que demuestra el papel central que juega la epigenética, y más concretamente la metilación del ADN, en la respuesta inmune del paciente frente la infección y en la inmunosupresión posterior sufrida por una gran parte de estos pacientes.

7.2. CONCLUSIONS

1. Extracellular histones can activate endothelial pyroptosis through the activation of NLRP3 in a mechanism involving oxidative stress.
2. The induction of endothelial pyroptosis produces cell death, inflammation and strong endothelial dysregulation, mechanisms that can be avoided by inducing histone hyperacetylation, using antioxidant molecules such as GSH-EE or specific NLRP3 blockers (MCC950).
3. Circulating histones are found at elevated levels in septic patients with severe clinical phenotypes (SS) at the time of admission in the ICU.
4. Circulating histones correlated with severity markers (SOFA, APACHE and lactate levels), endothelial damage markers (i-CAM1 and E-SEL), inflammatory markers (IL1- α , IL-6, IL-8, IL -10) and immune mediators (CCL2, CCL3, CCL4, S100A9), indicating the main role of histones during the first stages of disease.
5. In the early stages of sepsis, septic patients have a strong activation of innate immunity, showing that pyroptosis is active in the early stages of disease, trying to counteract the infection. However, the adaptive immune response is not active, hampering the immune response and allowing the simultaneous development of SIRS and CARS, ultimately contributing to immunosuppression.
6. Septic shock patients present an alteration in the DNA methylation pattern in immune cells, which demonstrates the central role played by epigenetics, and more specifically DNA methylation, in the patient's immune response to infection and in the subsequent immunosuppression suffered by a large part of these patients.

8. SUMMARY

8.1. INTRODUCTION

8.1.1 Sepsis and septic shock

In the third and final international consensus on sepsis and septic shock (Sepsis-3), sepsis was defined as "a life-threatening condition that arises when the body's response to infection damages the host's own tissues." Furthermore, septic shock (SS) is "a subset of sepsis in which particularly profound circulatory, cellular, and metabolic abnormalities are associated with a higher risk of mortality than sepsis" (1).

Current guidelines for the management of sepsis indicate the use of antibiotics as soon as possible, accompanied by fluid resuscitation, use of vasoressors and, if necessary, supportive therapy for organ failure, which depends on the stage of the disease (2). Currently, the sequential organ failure assessment score (SOFA) is a clinical tool that allows evaluating the degree of organ involvement in critically ill patients with suspected infection (2). However, identification tools such as SOFA seem to have different indications depending on the country where the patient is assigned. Regarding that, the quick SOFA (qSOFA) has been validated to identify adult patients with a probability of having a poor prognosis, especially in the setting of the hospital Intensive Care Unit (ICU) (1,3,4). The qSOFA differs mainly from SOFA in the speed with which it can identify serious patients with high risk to more severe physiopathological status or progress to fatal outcome, which is very useful in conditions such as sepsis. However, although the qSOFA is highly specific for selecting critically ill patients, it is not a tool for diagnosing of sepsis, since the SOFA must be calculated to confirm organ dysfunction. Likewise, the discrimination by hospital mortality is higher the higher the SOFA score (1, 5). However, the SOFA score by itself is not a tool for the early diagnosis of sepsis, and even less for identifying patients with SS or for predicting the clinical evolution of critically ill patients. The emergence of new methods that improve the early identification of sepsis may provide opportunities to reduce, not only the progression to more serious states of the disease and deaths in the early hyperinflammatory stage or in the medium-term follow-up (generally secondary to nosocomial infections), but also to avoid future morbidities in survivors, or at least contribute to improving their clinical follow-up in the months or years following the septic episode (6–8).

Despite advances in vaccines, antibiotics, and improvements in ICU care and treatments, sepsis has a worldwide incidence of 48 million cases per year and continues to be the leading cause of death from infection, estimated at more than 11 million deaths annually worldwide, of which almost 3 million are newborns (9,10). Furthermore, sepsis is the most common cause of death in most ICUs (11). In fact, sepsis kills more individuals annually than prostate cancer, breast cancer, and HIV combined, representing one of the world's leading causes of death (12). However, the most worrying thing is that the number of new cases continues to increase every year due to the longer life expectancy, the inappropriate or excessive use of antibiotics (the appearance of super-resistant bacteria) and the current lifestyle, among other factors. (13).

In economic terms, sepsis costs more than 24 billion dollars in the United States alone (14,15) and in Europe the cost of sepsis is around 7.600 million euros (6). In addition to the high associated economic cost, sepsis compromises the quality of life of surviving patients as they are left with post-sepsis sequelae, including immunosuppression, cognitive impairment, depression, and post-traumatic stress disorder (16,17). In this sense, survivors of an episode of sepsis may suffer short-term immunosuppression with a greater risk of succumbing to infections perpetrated by opportunistic pathogens, which in a normal state would be adequately controlled by an adequate immune system (18). In fact, about 40% of patients are re-hospitalized within 90 days of the sepsis episode. Furthermore, compared to patients hospitalized for other diagnoses, those who survive sepsis have a higher risk of recurrent infection, acute renal failure, and new cardiovascular events compared to patients with other pathologies (19). In addition, long-term immunosuppression may also occur in the septic patient, manifesting in patients as a significant reduction in survival between 5 and 8 years for patients who have suffered sepsis compared to the unaffected population of the sepsis with the same age (20,21).

Early recognition of sepsis, prompt administration of appropriate antibiotics, and urgent treatment according to locally developed guidelines can significantly reduce deaths from sepsis (22). However, the diagnosis of sepsis is not easy, since it produces in the patient a wide variety of pathophysiological alterations, sometimes simultaneous, which lead to a variety of functional physiological defects, cellular dysfunction, and

deficiencies in function of normal organs and tissues. Some of these complications can range from a failure of endothelium, which causes alterations in the microcirculation and complications such as the appearance of thrombi (23), to kidney problems (24) or liver (25). One of the main problems for the diagnosis of sepsis is the time (between 6 and 48 hours) that a conventional culture takes to differentiate the organism causing the infection (bacteria, viruses, or fungi), as well as in 30% of most cases, these tests result in a false negative, which may be caused by the administration of antibiotics to the patient before the test (26). Because molecular techniques such as PCR can detect bacterial DNA, even when the bacterium has been killed (27), and the time it takes to detect the microorganism is reduced, diagnostic methods such as SeptiFastTM are gaining relevance. The chances that at least one microorganism will be isolated in less than 6 hours increases up to 13 times compared to traditional culture methods (13.5; 95% CI, 5.05–36.06) (28). In addition, its sensitivity ranges vary from 42% to 73%, and its sensitivity is between 50 to 97% (29), which implies that although the identification time of the microorganism causing the infection has been reduced, the sensitivity remains limiting. It should be noted that the need to identify the microorganism causing the infection is crucial in the shortest possible time, in order to apply the best possible antimicrobial treatment. Likewise, there are other molecular parameters that are considered when identifying a septic episode, such as lactate, C-reactive protein (CRP) or procalcitonin (PCT), among others (30,31). The biggest problem with these types of markers is that they are nonspecific, and there are several factors that can increase them, being able to give false positives in the absence of infection, and false negatives in cases of viral or fungal infection, since, for example, PCT does not rise in viral infections (31). This makes it difficult to diagnose sepsis, especially in the early stages. Similarly, when pathophysiological events in the body become evident, it is much more difficult to return to cellular and organic homeostasis in the patient, being impossible in some cases.

8.1.2 The immune system in the context of sepsis

As sepsis progresses, it becomes more difficult to keep the patient's homeostatic mechanisms. Although the pathogens are completely eliminated from the body, there is

a progressive loss of patient's immune capacity, therefore, the study of the deterioration of the immune response must be approached by analyzing both innate and adaptive immunity. In general, the host's immune response is, in turn, associated with the timing of immune cell activity (hours for the innate immune response and days for the adaptive immune response), although it provides long-lasting protection. Consequently, dysregulation of innate and adaptive responses is associated with detrimental effects that, combined with organ failure, increase short-term and long-term mortality in patients who have suffered sepsis (33–37).

The function of the immune system depends on a well-regulated and orchestrated process of differentiation of hematopoietic cells into differentiated immune cells. This differentiation process is based on a specific and well-coordinated epigenetic control (38), which is altered both during infectious processes (39–41) and during sepsis (17,42,43). The most widely accepted model of the septic process proposes that, after exposure to pathogens, there is an overregulation of the inflammatory response (hyperinflammation), also known as a "cytokine storm." During the hyperinflammatory response, components of the adaptive immune response are recruited to stimulate a strong immune response against infection. However, simultaneously with the hyperinflammation phase, a compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) occurs (34,44). This phenomenon induces the failure or exhaustion of the immune system, which ultimately mediates immunosuppression (45). In fact, it has been proposed that this process is one of the elements that contribute to death of the patient in the short and long term due to the depleted immune response and the presence of new opportunistic infections (34,36,37).

Immunosuppressed patients with sepsis are at increased risk of secondary infection acquired in the ICU, and approximately 13% of sepsis survivors die because of such secondary infection in hospital (46). Immunosuppression can last for months and even years and can cause severe comorbidities in many sepsis survivors (45), or even increase mortality. Therefore, immunosuppression should be considered an additional example of long-term organ failure in sepsis (45).

There is a specific subset of patients, who are generally over 65 years of age, who suffer from what is known as chronic critical illness (CCI) because the patients suffer from

comorbidities, and who are generally dependent on mechanical ventilation. Many do not survive after months of unsuccessful treatment (51). Patients with CCI often suffer from a syndrome known as PICS (persistent inflammation, catabolic activation, and immunosuppression syndrome), considered PICS as a new phenotype of multi-organ dysfunction syndrome (MODS) caused by sepsis (52), which leads to increased frailty, poor wound healing, increased susceptibility to new infections, and persistent immunosuppression. However, there are currently no biomarkers available capable of predicting immunosuppression phenomena in sepsis beyond alterations in myeloid cell-derived suppressor cells (MDSC), the expression of HLA-DR monocytes, and the increased concentration of IL-6 (45), as well as an increase in IL-10 (34). MDSCs can be roughly divided into two subtypes, granulocytic and monocytic MDSCs, which inhibit B cell and T cell function (54). Therefore, in addition to depleting the cells responsible for the host's immune capacity, there is an increase in a subset of cells with immunosuppressive characteristics, such as regulatory T cells (Tregs) (55,56) and an increase in MDSCs (45, 52) in patients with PICS. Therefore, MDSCs can participate in immunosuppression and particularly in PICS (57). In any event, there is an obvious need to consider the potential to predict immunosuppression and PICS and resulting comorbidities in sepsis survivors (58).

8.1.3 Inflammasome and sepsis

In 1992, a new mechanism of programmed cell death mediating inflammation was discovered in the cells of the immune system (59). However, it was not until 2001 when the term "pyroptosis" was coined to this mechanism of cell death, postulating it as a mechanism of programmed necrosis that mediates inflammation (60). In this regard, Boise and Collins observed that this cell death was mediated by the activation of a specific protein, specifically caspase-1, and that it was capable of inducing inflammation, unlike what happened in other cell death processes such as apoptosis (61). In recent years it has been observed that this type of cell death occurs in other cells than immune cells. Specifically, caspase-1-dependent cell death has been observed in cells of the immune system (61), the central nervous system (62) and the cardiovascular system (63), indicating that this mechanism could be playing a significant role in large

number of biological systems and various pathologies. This mechanism received the name of piroptosis from the Greek origin of the word, since “pyro” refers to fever, and “ptosis” denotes the fall, thus, the term pyroptosis describes a pro-inflammatory programmed cell death (60).

Pyroptosis is triggered by various pathological stimuli, such as changes in membrane potential, oxidative stress, hyperglycemia, and even inflammation itself, and plays a key role in the control of microbial infections. At present, pyroptosis can be observed in monocytes, macrophages, dendritic cells, and other cell types (64), all of them capable of inducing mechanisms of inflammation.

Pyroptosis is different from other forms of regulated cell death, such as apoptosis, both in cell morphology and mechanism. The main difference between apoptosis and piroptosis lies in the inflammatory process generated with piroptosis, which does not occur in the case of apoptosis. Likewise, the caspases involved are also different. Apoptotic caspases mainly include caspases - 2, 8, 9, 10 (initiation of apoptosis) and caspases - 3, 6, 7 (execution of apoptosis) (65). Instead, pyroptosis runs through Caspase-1 (canonical pyroptosis) or through caspase 4 and 5 (non-canonical pyroptosis) (66). Furthermore, in apoptosis, cell membrane pores are not formed, such as those mediated by Gasdermina D-N (GSDMD-N) in pyroptosis, nor does it release inflammatory factors of its own. In this sense, pyroptosis is characterized by a rapid breakdown of the plasma membrane (being positive in Annexin V and Propidium Iodide), followed by the release of cellular contents and pro-inflammatory mediators, including IL-1 β , IL-18 and IL -1 α (67). As for other types of cell death such as necrosis, the main difference is that this type of cell death is an unprogrammed cellular process, unlike pyroptosis or apoptosis, and that therefore they generate a non-specific and unregulated molecular response.

Unlike most cytokines, IL-1 β , IL-18, and IL-1 α are not secreted by the endoplasmic reticulum but are produced as biologically inactive precursor proteins that are cleaved prior to secretion as bioactive cytokines (68). Mature IL-1 β is a pro-inflammatory mediator that recruits innate immune cells to infection sites and modulates adaptive immune cells (T helper 1 (Th1) and Th17). Similarly, mature IL-18 is important for the production of interferon γ (IFN- γ) and the enhancement of the cytolytic activity of

natural killer (NK) lymphocytes and Th1 and Th17 cells and can polarize T cells towards Th1 or Th2 profiles in combination with other cytokines (69). In fact, the interleukin-1 (IL-1) family of cytokines and receptors is unique in immunology because the IL-1 family and Toll-like receptor (TLR) families share very similar functions, more than any other family of cytokines, so the IL-1 family is primarily associated with innate immunity. In fact, the IL-1 family member IL-1 α also functions as DAMP, amplifying other types of stimuli different from IL-1 β or IL-18 (70) (Table 1). What characterizes innate immunity is a lack of specificity, and indeed the many biological properties of IL-1 α are nonspecific. More than any other family of cytokines, members of the IL-1 family are closely associated with damaging inflammation; however, the same members also function to increase nonspecific resistance to infection and the development of immune responses to foreign antigens (70) (Table 1). Therefore, fundamental inflammatory responses such as type 2 cyclooxygenase induction, production of multiple cytokines and chemokines, increased expression of adhesion molecules, or nitric oxide synthesis are indistinguishable responses for both IL-1 ligands as for TLRs (70).

Pyroptosis occurs in two phases, on the one hand, activated caspase-1 recognizes the inactive IL-1 β and IL-18 precursors and converts them into mature inflammatory cytokines. On the other hand, caspase-1 cleaves Gasdermina-D (GSDMD) (a member of the Gasdermina family of proteins) and oligomerizes the 31 kDa amino terminal products (GSDMD-N) that mediate membrane pore formation. The formation of these membrane pores promotes the release of inflammatory factors, mediating cellular inflammation and, finally, pyroptosis (71,72). Likewise, these pores have been directly related to the formation and release of NETs (73). For its part, IL-1 α is released through unconventional pyroptosis, so it can be activated by other products such as lipopolysaccharide (LPS), present in the membranes of Gram-negative bacteria and recognized as the most potent microbial mediator involved in the pathogenesis of sepsis and SS, through its ability to bind to Toll-Like Receptors (TLRs) of cell membranes (74). IL-1 α can be processed both Caspase-1 dependent and independently, although it follows the same release pattern as IL- β and IL-18, being released through the membrane pores formed by GSDMD and likewise producing positive feedback (72).

Piroptosis has been described as a key mediator of a wide range of diseases, including sepsis (75). This is because pyroptosis plays a fundamental role in regulating the body's immune response against numerous infections, be they bacterial, viral, protozoan, or fungal (72). In this sense, pyroptosis occurs naturally since the different ILs (IL-1 α , IL1- β , IL18), Caspase-1 itself and especially GSDMD residues induce cell death to a multitude of invading pathogens, due to because they also cause pores in their membranes (pyroptosis) (72). Furthermore, pyroptosis has also been shown to act by a wide range of mechanisms, one of them very similar to NETosis (a process mediated by extracellular neutrophil traps), called "pore-induced intracellular traps (PITs)", capable of capture bacteria and kill them through efferocytosis (dead cell removal process) (76). Likewise, it has also been discovered that IL-1 α and Caspase-4 and 5 (non-canonical pyroptosis) can induce the activation of Caspase-1 thus activating the canonical pathway, proving to be a highly regulated process (77).

8.1.4 Role of the endothelium in sepsis

As sepsis is a systemic condition, it affects practically all organs and tissues, being the endothelium one of the first cell types to find and respond to aggression (78–80). During sepsis, the two most pronounced functions of endothelial cells are to amplify the immune response and activate the clotting system. Endothelial activation and / or dysfunction ultimately contributes to end-organ damage during sepsis. Furthermore, the endothelium provides a link between local and systemic immune responses, as it is simultaneously a target and a source of inflammation (81). Upon stimulation, endothelial cells express adhesion molecules and produce vasoactive compounds, inflammatory cytokines, and chemoattractants, thus changing from an anticoagulant state to a procoagulant state (82). While endothelial activation helps locally to combat the source of infection, systemic activation can result in microvascular thrombosis, capillary permeability, hypotension, tissue hypoxia, and ultimately tissue damage.

In response to inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 in particular), the expression of adhesion molecules [i.e. selectins, integrins, and members of a superfamily of immunoglobulins known as intercellular adhesion molecules (ICAM) and vascular cell

adhesion molecules-1 (VCAM-1)] increases dramatically on the surface of endothelial cells (83).

In the initial phase, the Sialyl-Lewis carbohydrate ligands found on leukocytes freely bind to E-selectin and P-selectin, allowing them to roll on the endothelium. In the second phase, the rolling leukocytes are activated by chemokines released locally by macrophages and endothelial cells to express integrins on their surface, which allows a firmer adhesion to ICAM-1 and VCAM-1 and initiates their transendothelial migration towards injured tissues. (84). Chemokines that bind to the endothelium through heparan sulfates form a chemotactic gradient that directs leukocyte migration (85). Additionally, the chemokine gradient (such as CXCL8, CXCL1, CXCL2, and CXCL5) produced by immune cells and endothelial cells promotes recruitment of neutrophils from bone marrow stores and improves neutrophil adhesion (85). P-selectin in endothelial cells not only captures leukocytes and promotes their rolling, but also activates integrins through P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) and induces greater activation of leukocytes. (86).

Meanwhile, as inflammatory responses progress, soluble isoforms of adhesion molecules from leukocyte recruitment are shed from cell surfaces and accumulate in circulating blood plasma to reduce leukocyte-endothelium interactions and protect the host from damage. excessive collaterals (87). Measurement of these soluble adhesion molecules has also been proposed as a diagnostic tool for early detection of sepsis, as well as for predicting the severity and outcome of sepsis. Serum concentrations of adhesion molecules such as E-selectin, P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1 increase during sepsis (88) and correlate with the severity of sepsis and mortality (89). E-selectin levels increase significantly with the onset of sepsis-related organ dysfunction and decrease after organ dysfunction has resolved (89). In fact, some studies have shown that compared to classic markers of bacterial infection such as procalcitonin, the measurement of circulating levels of E-selectin or P-selectin has greater sensitivity and specificity in predicting the future development of sepsis in ICU patients. (90). On the other hand, other studies have shown that while soluble ICAM-1 (sICAM-1) levels are significantly elevated in patients with sepsis, they also increase (although to a lesser degree) in patients with systemic inflammation without sepsis (91). However, sICAM-1 levels are directly correlated with the severity of sepsis and organ dysfunction (91).

Although it is quite sensitive to organ dysfunction and severity of sepsis, a moderate increase in the levels of circulating adhesion molecules is also observed in other conditions that are associated with vascular damage (such as trauma or cardiopulmonary bypass), thus its use as a biomarker must be taken with care.

While the expression of adhesion molecules is crucial for the recruitment of immune cells to fight infection, the selection of adhesion molecules in the treatment of sepsis remains controversial. Interestingly, one study demonstrated that in a mouse model of polymicrobial sepsis, the use of antibodies against ICAM resulted in increased recruitment of neutrophils at the site of infection with a simultaneous decrease in infiltration into other organs (such as the lung, thymus, and spleen) (92). However, despite the fact that the role of endothelial adhesion molecules in sepsis is undeniable, surprisingly few studies have focused on targeting them as candidates to develop future treatments for sepsis.

In short, the loss of endothelial function is a fundamental characteristic in sepsis, since it alters vascular homeostasis and activates processes such as thrombosis, inflammation, and vascular remodeling. In addition, endothelial damage plays a central role in the progression to organ failure during sepsis and is one of the major contributors to sepsis-mediated mortality (93–95). More importantly, preserving endothelial barrier function has been shown to improve the prognosis of septic patients (96–98). Damaged glycocalyx and endothelial cell death lead to increased vascular permeability, which favors the passage of proteins and fluids, causing interstitial leakage (99). Severe and / or persistent phenotypic endothelial changes contribute to impaired microcirculatory blood flow, tissue hypoperfusion, and cell death, which together lead to organ failure (100).

8.1.5 Extracellular histones and their post-translational modifications

Histones are the basic units for the assembly of nucleosomes, since they contribute to the conformation of chromatin and to the regulation of gene expression through post-translational modifications (PTMs), mainly in the histone tails. Histones have been widely described as antimicrobial agents (101,102) capable of inducing cytotoxicity in

invading pathogens. However, in recent years, the role of extracellular histones as cytotoxic mediators has gained relevance in the pathophysiology of sepsis and other disorders related to inflammation (103) and immunosuppression (17,104). Furthermore, it has been described how extracellular histones aggravate the clinical phenotypes of various diseases in which histones have been shown to be a relevant mediator (105,106).

Particularly in sepsis, extracellular histones are released from neutrophils through a process known as NETosis (73,107). NETosis is an active defense process that consists of the release of granular proteins and chromatin to form an extracellular fibril matrix known as NET (extracellular neutrophil trap) capable of binding to pathogens and contributing to their elimination (19). The formation of NETs is a very effective cellular strategy to eliminate pathogens, however, they also induce damage to host cells, in particular endothelial cells, thus causing damage to the endothelium, and contributing to the pathophysiology of sepsis. Likewise, endothelial damage contributes to endothelial dysfunction, organ failure, and death (23,107) because histones can act as damage-associated cytotoxic molecular patterns (DAMPs) (103), which in turn can mediate signaling through cell membranes.

Abrams' group has shown that circulating histones act as mediators of tissue damage in distant organs (i.e. lungs, heart, pancreas, etc.) (94). Corroborating these observations, histones released into the bloodstream have been found in patients with severe trauma, pancreatitis, sepsis (94,107) and septic shock (105,106), as well as in pathological complications such as disseminated intravascular coagulation (DIC) (95). This is because histones released into the bloodstream initiate thrombin activation, a process that contributes to microvascular thrombosis in sites of severe inflammation (108).

On the other hand, focusing on MPTs, it has been observed that histone acetylation in neutrophils has an immunostimulatory effect on NETs (21,109). Furthermore, the presence of citrullinated H3 (H3cit) in neutrophils is known to be crucial for the activation of NETosis (110). However, there is no evidence of a correlation between acetylation levels of circulating histones and H3cit levels in NETs, even though the use of histone deacetylase inhibitors (HDACis) has been observed to have positive immunomodulatory effects (110) and have beneficial effects in SS animal models,

limiting cytokine secretion (111). However, another study has shown that inhibition of HDAC1 / 2 stimulates the release of pro-inflammatory cytokines instead of inhibiting them (112), so there is some controversy. In this regard, a more recent study in a model of SS in C57BL / 6J mice showed that tubostatin A (an inhibitor of HDAC6) inhibited cytokine production and dramatically decreased liver damage and macrophage apoptosis, improving the survival of mice. However, MS-275 (an inhibitor of HDACs 1, 2, and 3) did not produce the same benefits (113). Likewise, treatment with HDACis significantly improves the phenotype in cells and tissues when treated with SAHA and TSA, as well as the clinical characteristics in animal models of sepsis (58,114,115). Although these examples highlight the role of histone modifications in sepsis, no information is available on the relationship of MPTs with the particular cytotoxic action of histones, nor on the clinical evolution of the patients. There is also no information available on chromatin remodeling processes that explain the phenomenon of immunosuppression suffered by one in three patients after an episode of sepsis (116).

On the other hand, in recent years, some studies have emphasized the role of histones in the stimulation of Toll-like receptors (TLR) and NOD-Like receptors (NLR) in sepsis, since these late receptors recognize the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and a wide variety of damage-associated molecular patterns (DAMPs) (97). Among the NLRs, protein 3 that contains nucleotide-binding domain leucine-rich repeats (NLRP3) plays a fundamental role in innate immunity and mediates the activation of the caspase-1 molecular complex and therefore pyroptosis, which promotes Pro-inflammatory IL-1 β and IL-18 production (98,117), as previously explained. The inflammasome plays a key role in sepsis-mediated cell death (118–121). However, despite the evidence that circulating histones can activate the inflammasome and therefore mediating pyroptosis in immune cells (122), it is unknown whether they are also capable of mediating pyroptosis in other cell types.

8.1.6 Epigenetics and sepsis. Role of DNA methylation in the context of sepsis

DNA methylation is an epigenetic process that is generally associated with gene repression. The addition of a methyl group usually occurs in the cytosines located in the

CpG islands by producing the simultaneous methylation of many of these cytosines, which contributes to gene silencing and long-term transmission processes of this epigenetic profile through different generations of cells. DNA methylation and histone PTMs can act in coordination to differentiate those cells that derive from myeloid and lymphoid lineages, thus regulating the immune response (123,124).

Therefore, during hematopoietic development, the methylation profile progressively changes with the development of T and B lymphocytes, while the overall levels of methylation steadily decrease. However, DNA methylation appears quite stable during differentiation and activation of both neutrophils and macrophages (125). Identifying changes in DNA methylation in particular promoters of key genes involved in inflammation, differentiation, and immune cell function may provide potential tools for not only understanding the pathophysiology of sepsis and the heterogeneity of the disease, but also to provide new biomarkers for the diagnosis and prognosis of the disease (126).

Focusing on sepsis, for example, Zemmour et al. studied changes in the methylation pattern of the *FAM101A* locus in 100 patients with sepsis or septic shock and found elevated levels of unmethylated copies in septic patients (127). In fact, they found that more than ten copies / mL of unmethylated *FAM101A* was a strong predictive biomarker of fatal outcome in septic patients.

Likewise, Dhaset et al. analyzed DNA methylation in blood samples taken from neonates with neonatal sepsis using Infinium HumanMethylation450 BeadChip kits (Illumina, Inc., CA, USA) and found up to 81 differentially methylated CpGs located in 64 genes. Of the genes identified, the authors found hypermethylation in the PCDHB genes, which code for cadherins involved in leukocyte cell adhesion and the Wnt signaling pathway (128). Specifically, they found that the genes *PCDHB11*, *PCDHB12*, *PCDHB16*, *PCDHB5*, *PCDHB6*, *PCDHB7*, and *PCDHB9* were hypermethylated in leukocytes from neonates suffering from neonatal sepsis (128). Likewise, in the work recently published by our group in a cohort of patients with neonatal sepsis, we found approximately 1050 DMRs, among which only 32 presented differences in beta-values of 10% (129). In this work, our research group identified hypomethylated genes *EGOT*, *IL10*, *CPT1B*, *PILRA*, *ELANE*, *TREM1*, *PRTN3*, *MIR145*, *S100A8*, *CSTA*, *MS4A3*,

ATP8B4, CPT1B, CMY45, LRG1, and CD300LB, whose function is mainly involved in defense against pathogens and inflammatory processes. In addition, other hypermethylated genes were found (*CD3G, CD3D, LTA, TXK, UBASH3A* and *SIT*), whose function is mainly related to adaptive immunity (LT activation) (129). On the other hand, Dhas *et al.* observed hypermethylation of the *CCS* gene and hypomethylation of the *DEGS2* gene. The particular role of these genes in sepsis is not yet known, but they are probably related to protective mechanisms against oxidative stress and sphingolipid metabolism, respectively (130,131).

More recently, Lorente-Sorolla et al. have observed changes in DNA methylation in monocytes of individuals who have suffered sepsis, specifically *IL1A, CCL22, CCR2* and *STAT3* in the set of hypermethylated genes and *HLA-A, SOCS1, IL1R2* and *CD46* in the group of hypomethylated genes. Furthermore, the authors identified a significant relationship between changes in DNA methylation and levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and the pro-inflammatory cytokine IL-6, which were significantly increased in patients with sepsis. Likewise, the most relevant changes were observed in genes with a key role for monocyte function, including the IFN- γ -mediated pathway and the MHC class II proteins (132).

Other studies such as that of Binnie et al. have recently found, using Infinium 450K (Illumina) methylation arrays, differentially methylated regions in DNA isolated from whole blood of critically ill sepsis and non-septic patients in the first 24 h after ICU admission (143). Specifically, Binnie et al. have found a series of genes with differential methylation associated with gene regions that play an important role in sepsis such as *C3, MPO, ANGPT2, LPO*, MHC class IA and C, MHC class II isotype DQ β -I and isotype DR β -I, *LIPA, PON1, FCG2A, IL23A, TIMP2*, among others. Importantly, Binnie et al. have found a correlation of DNA methylation with clinical phenotypes of greater severity and worse prognosis (143) and Lorente-Sorolla et al. found that DNA methylation was also correlated with organ dysfunction (SOFA score) in septic patients (132). All of these results suggest that specific changes in DNA methylation may provide potential biomarkers for sepsis. DNA methylation changes in these genes highlight the relationship between genes that undergo changes in DNA methylation and pathways related to the acquisition of tolerance to endotoxins, which may contribute to generating an immunosuppressive environment.

Recent advances in DNA methylation analysis carried out on samples taken from septic patients have allowed us to begin to understand the intricate mechanisms underlying the complex pathophysiology of the disease, including the dysregulation of the host immune and inflammatory response, and the reprogramming of immune cells and immunoparalysis. Likewise, previous studies have described how exposure to LPS alters DNA methylation in human cell models (144–146). These findings were recently confirmed by Lorente-Sorolla *et al.* who observed that human monocytes exposed to LPS undergo DNA methylation changes in parallel with the acquisition of tolerance to endotoxins (132). Furthermore, overall DNA methylation in the blood cells of neonates suffering from neonatal sepsis has been shown to increase during sepsis (129,147).

Many genes related to septic processes are regulated by the methylation of their promoters, as in *IL6* and other genes that encode *IL8*, *TNFA* and TLR (*TLR2* and *TLR4*). However, other studies such as the one carried out by Tendl *et al.* did not observe any methylation changes in the promoters of these genes, at least not in the DNA of blood samples from preterm infants with sepsis (137). What these authors showed was how methylation changes at eight CpG sites in the *CALCA* gene promoter, which can also be used as an epigenetic biomarker for bacterial sepsis in preterm infants (137). This is an interesting approach to diagnose sepsis, since this genomic region contains a specific response to microbial infection, such as elements that regulate PCT transcription during bacterial infection (Table 2) (148). The authors also showed modulation of the methylation status of the CpG -769 site, which was partially methylated in late-onset sepsis, but this methylation disappeared when the sepsis was in remission (137).

On the other hand, a general loss of 5mc has also been observed during ex vivo differentiation of monocytes to macrophages or dendritic cells (149,150). In fact, studies have shown that DNMT3b regulates macrophage-mediated polarization and inflammation. Thus, high levels of DNMT3b are associated with the expression of pro-inflammatory M1 macrophages, while the fall in levels of expression of DNMT3b promotes the differentiation of macrophages into anti-inflammatory M2 macrophages (151). DNMT1 has also been associated with the release of pro-inflammatory cytokines in macrophages by mediating *SOCS1* hypermethylation (152), which is known to impair the activation of STAT4 and IFN- γ production during NK cell activation.

Thus, DNA methylation in specific key genes may contribute to endotoxin tolerance (132) and contribute to triggering immunosuppression events after "cytokine storm" in septic patients (17,149). During the hyperinflammatory process in sepsis, the promoter region of the nt-227 / -8 NFKB1 gene undergoes hypomethylation in neutrophils compared to lymphocytes and monocytes (135). Furthermore, these authors also observed that exposure to LPS does not alter the methylation status of this gene and therefore suggests that DNA methylation is necessary for the rapid expression of this factor. Likewise, the hypomethylated state of the *NFKB1* promoter region in neutrophils depends on the polymorphism (-94ins / delATTG) (rs28362491) in the *NFKB1* gene, which is associated with an increase in mortality at 30 days in patients with severe sepsis. (Table 2) (134). Continuing with NF-κB, Rump et al. demonstrated that DNA methylation in the promoter of the *AQP5* gene encoding aquaporin 5 at the NF-κB binding site affects mortality in sepsis (153).

On the other hand, Baron et al. have found that the *FOXP3* promoter is hypomethylated in Tregs compared to naive CD4 + T cells (154). Therefore, the analysis of the methylation status of the *FOXP3* gene in Treg cells from septic patients can help to understand how this epigenetic regulation could participate in the decrease of T-cell proliferation (Table 2) (141). This is most important since an increase in Treg may play a key role in mediating post-septic immunosuppression by inhibiting the inflammatory response in subsequent infections (155). Therefore, this could imply the possibility that by assessing *FOXP3* methylation status, it would be possible to predict Tregs expansion and post-septic immunosuppression.

Notably, DNA methylation contributes to memory B cell differentiation. In fact, DNA methyltransferases (DNMT) are highly expressed in memory B cells, where immunity-related genes show distinctive DNA methylation patterns (156). Identifying specific patterns of DNA methylation in B cell dynamics, B regulatory (Breg) cell production, and their contribution to immune dysfunction could help clarify immunosuppression in sepsis. In this sense, recent studies have shown the reduced proliferation capacity of B cells, as well as a higher proportion of depleted B cells in patients with septic shock, accompanied by a higher number of Breg and Treg (157). Interestingly, HLA-DR expression decreases in B cells during immunosuppression in patients with septic shock (157) and, to date, it is known that MHC-II isotypes (HLA-DR, HLA-DP, and HLA-

DQ) are regulated by DNA methylation (158–160). Furthermore, it has recently been shown how MDSCs promote B cell-mediated immunosuppression through PD-L1, which confers on B cells the ability to suppress CD8 + T cell activation and the acquisition of an effector phenotype (161). Furthermore, MDSCs can inhibit T cell function by depriving L-arginine (essential for T cell functions) by expressing arginase-1 (159). Consistent with this, it has been shown how hypomethylation of the *ARG1* promoter can be decreased in MDSCs by using 9-tetrahydrocannabinol (160), an exogenous cannabinoid, which is a potent inducer of MDSC and its immunosuppressive function. As a result of these major methylation changes, most sepsis patients rapidly show signs of profound immunosuppression.

Ultimately, sepsis is one of the leading causes of death worldwide, in fact, it kills more people each year than prostate cancer, breast cancer and HIV / AIDS combined, and the number of cases is increasing every year. Today, 1 in 5 deaths worldwide are associated with sepsis. Likewise, septic shock represents a very worrisome syndrome in the Intensive Care Unit (ICU), and more efforts should be made to reduce the high mortality rates associated with this disease. Therefore, the identification of the molecular mechanisms underlying the pathophysiology of sepsis and septic shock is a current clinical need, especially in order to rapidly treat critically ill patients and decide which therapies should be applied. In this sense, the characterization of the molecular mechanisms guided by extracellular histones could shed light on the molecular bases of the disease, allowing the development of effective therapies against sepsis, in addition to providing diagnostic and prognostic biomarkers of the disease. Likewise, it is necessary to know the immune status of these patients, especially in the early stages of the disease, since from the first 4 hours after suffering sepsis, the prognosis of patients drastically worsens. Likewise, new data are needed on the role that DNA methylation plays in the progression and severity of sepsis disease, helping to characterize the molecular mechanisms that guide the clinical phenotypes of septic patients. In this sense, the discovery of new specific regions with differential methylation (DMR) could improve clinical management by introducing the possibility of using it as new biomarkers for the diagnosis and prognosis of sepsis and septic shock.

8.2. HYPOTHESIS

The release of histones into the bloodstream is one of the main phenomena that contribute to the poor prognosis of sepsis and septic shock. The hypothesis is that higher concentrations of circulating histones will cause greater cellular and tissue damage, increasing the severity of the disease, so that the circulating levels of histones could serve to define the severity, the extent of the organic damage, the speed of progression of the disease and prognosis of the patient. Likewise, it is postulated that different post-translational histone modifications, mainly acetylation, may be playing a key role in histone-mediated cytotoxicity, which is why they may be great candidates for therapy. In addition, specific DNA methylation patterns will serve to classify different clinical phenotypes and evolutionary prognosis in critical patients, thus establishing personalized intervention protocols focused on improving the survival of septic patients.

8.3. OBJECTIVES

The main objective is to develop diagnostic, prognostic and therapy tools that allow the classification of particular phenotypes of sepsis and septic shock, as well as possible personalized treatments to respond to the hypothesis raised.

To achieve this main objective, it is necessary to define the following specific objectives:

1. Characterize the molecular mechanisms that mediate extracellular histones when they interact with human cells, specifically with human endothelial cells, including the mechanisms of antioxidant response, endothelial function and cell death.
2. To analyze the effect of acetylation, as a post-translational modification of histones, on the molecular mechanisms that mediate extracellular histones on human endothelial cells.
3. Characterize the inflammatory and immune response that occurs in the early stages of sepsis, both in septic patients and in patients with septic shock.

4. Analyze the correlations of circulating histones with different disease severity and prognosis markers, as well as with different pro- and anti-inflammatory cytokines, immune mediators, and endothelial damage.
5. To evaluate the role of DNA methylation in sepsis, through the analysis of global and specific DNA methylation patterns in peripheral blood mononuclear cells from patients with sepsis and septic shock, as well as its correlation with clinical phenotypes.

8.4. MATERIALS AND METHODS

8.4.1. Cell culture

In this work, a HeLa tumor cell line was used to obtain purified extracts of histones and primary endothelial cells from human umbilical veins (HUVEC) obtained from human umbilical cord at the Hospital Clínico Universitario de Valencia, for the evaluation of cellular cytotoxicity, inflammation, endothelial dysfunction, and immune dysregulation mediated by extracellular histones. The HeLa lines come from the repository of the Cell Culture Unit of the Central Medicine Research Unit of the University of Valencia. The HUVEC lines were provided by the Endothelial Cell Research Group (LinCE) of the Department of Physiology of the Faculty of Medicine and Dentistry of the University of Valencia.

The study was approved by the local Medical Ethics Committee (CEIm of the Hospital Clínico Universitario de Valencia) on June 30, 2016. Written informed consent was obtained from all participants.

All cells were incubated at 37 ° C in the Thermo Scientific, Heracell 150i CO2 incubator (Thermo Scientific, New York, NY, USA) in a humidified atmosphere with 5% CO2. When the culture reached confluence, the cell passage and cell expansion necessary for each of the experiments that followed was performed.

8.4.2. Selection of patients and controls

8.4.2.1. Study design

Longitudinal prospective observational study carried out in the Intensive Care Unit of the Hospital Clínico Universitario de Valencia from December 2016 to January 2020, carried out in a cohort of patients admitted to the Intensive Care Unit of the Hospital Clínico Universitario de Valencia, diagnosed with sepsis and shock septic, and patients with cerebrovascular events.

8.4.2.2. Ethics committee

The study entitled "Epigenetics and immunosuppression. Use of circulating histones and their post-translational modifications as diagnostic and prognostic biomarkers in sepsis and septic shock "has been approved by the Internal Scientific Committee of the Research Foundation of the Hospital Clínico Universitario de Valencia - INCLIVA Health Research Institute in its meeting of September 22, 2016, finding it in accordance with the applicant's training requirements, the adaptation of the project to the existing means, the adequacy of the memory and the interest of the project results for the health area.

The study entitled "Epigenetics and immunosuppression. Use of circulating histones and their post-translational modifications as diagnostic and prognostic biomarkers in sepsis and septic shock "has been approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Clínico Universitario de Valencia in its meeting of June 30, 2016, agreeing that meets the appropriate characteristics regarding information to patients and compliance with the ethical criteria for medical and biomedical research established in the Declaration of Helsinki, and in the Universal Declaration on the Human Genome and the Rights of Man of UNESCO and the agreements of the Additional Protocol of the Council of Europe for the protection of the Rights of Man and the dignity of the human being against the applications of biology and medicine.

8.4.3. Preparation of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA).

Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA), also known as Vorinostat, was prepared in a 5 mM solution with dimethylsulfoxide (DMSO).

Different concentrations of SAHA (0-100 µM) were tested to identify the greatest hyperacetylation effect on histones and the least cytotoxicity. For the evaluation of the deacetylase activity, the degree of acetylation of the H2AK5ac, H3K9ac and H4K8ac residues was evaluated. Treatment was applied to HeLa cells for 24 h in each condition. Finally, 50 µM SAHA was selected as the working concentration to induce hyperacetylation of histones.

8.4.4. Purification of native and hyperacetylated histones from HeLa cells

To obtain histones from HeLa cells, a protocol developed by Shechter, Hake and Allis (162) was used, later adapted in our laboratory.

8.4.5. Quantification of protein extracts using the Bradford method

It is a colorimetric method that is based on the binding of the hydrophobic dye, Coomassie Blue G-250, to proteins with basic amino acids (especially arginine) and aromatic amino acids. Aqueous solutions of this dye in the presence of phosphoric acid have a brown color (465 nm), but when found in the hydrophobic environment of the interior of a protein, it produces a blue color that is measured at 595nm. It is relatively sensitive to the presence of contaminants such as traces of detergent, lipids, organic liquids such as methanol and basic solutions, but it does not present interference with reducing substances such as dithiothreitol (DTT) and β-mercaptoethanol, which do interfere with the Lowry and BCA trials (163). The Bradford method is simple, fast, inexpensive, and sensitive (Sensitivity range 1-15 µg) (163). First, prepare a 1: 5 dilutions of the Bradford reagent in milliQ water in a sufficient volume for all the samples to be tested (consider 200 µL per well and three replicates for each sample and concentration of the curve) and keep it at 4°C.

4.6. Analysis of protein expression levels by Western Blot

The specific detection of proteins and post-translational modifications thereof was carried out using the Western Blot (WB) technique. This technique allows the detection and semi-quantification of specific proteins thanks to the antigen-antibody reaction. For the detection of the proteins of interest, the separation of these according to their molecular weight is required by means of denaturing electrophoresis in 10% polyacrylamide gel with sodium docecylo-sulfate (SDS-PAGE).

To verify the degree of acetylation induced in histones *in vitro* by treatment with SAHA, the process consisted in the binding of the primary antibody anti-H2AK5ac (39107, Active Motif), anti-H2BK5ac (39123, Active Motif), anti-H3K9ac (39585, Active Motif) and anti-H4K8ac (61103, Active Motif) at a concentration of 1: 1,000 in PBS-Tween with 0.01 g / ml BSA, overnight at 4 ° C with gentle shaking. For the analysis of the protein expression of apoptotic proteins, antioxidants, endothelial regulation and immune function mediated by the endothelium, the following primary specific antibodies were used: PRX-SO3 (Abcam, ab16830), PRX6 (Abcam, ab59543), GPX1 (Abcam, ab22604), Catalase (Sigma-Aldrich, c0979), MnSOD (Abcam, ab13533), Cu / ZnSOD (Abcam, ab13498), eNOS (Santa Cruz Biotechnology, sc-653), COX-1 (Santa Cruz Biotechnology, sc -19998), COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-19999), PGIS (Santa Cruz Biotechnology, sc-20933), TBXAS (Santa Cruz Biotechnology, sc-79181), Caspase-3 (Cell Signaling, 9662), NLRP3 (Novus, NBP2-12446). Finally, β-actin (Sigma-Aldrich, a1978) (Sigma-Aldrich) as a loading control.

8.4.7. Evaluation of the cell viability of HUVEC cells after exposure to different concentrations of native histones and hyperacetylated histones

8.4.7.1. Bright field microscopy

Light microscopy images were acquired using a Leica TCS-SP2 confocal laser scanning unit equipped with argon and helium-neon lasers and attached to a Leica BM1RB inverted microscope (Leica Microsystems, Manheim, Germany). The HUVEC cells were maintained in a Lab-TeK II 2 cm² chambered glass cover (Nunc, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

8.4.7.2. Flow cytometry

For the quantitative determination of the cytotoxic effect in HUVEC cells caused by exposure to native and acetylated extracellular histones, the flow cytometry technique was used. This is an analytical method by means of which the emission of multiple fluorescences and the scatter of light (light scatter) of the microscopic cells or particles are measured, sequentially aligned by means of a laminar liquid stream when they are presented individually and at high speed (up to thousands of cells per second) in front of a laser light beam of suitable wavelength.

This technique makes it possible to differentiate cell populations within the analyzed sample, according to the relative size, the complexity of their membranes and / or their reactivity with various fluorochromes or antibodies with specificity against some cellular component. This is a fast-reading method that allows to analyze a high number of cells (in the case of this work, 10,000 cells for each technical replica) and provides quantitative data and the possibility of analyzing multiple parameters in cell populations, obtaining a computerized record of the outcome.

For the analysis of cell viability and death, the Annexin V-FITC apoptosis detection kit (Roche, Basel, Switzerland) was used, which performs a double staining with Annexin V and propidium iodide (IP), being able to differentiate between cells. viable, cells in early and late apoptosis, and necrotic cells. The protocol followed for the development of this technique was the one proposed by the commercial house.

For the analysis of the change in membrane potential, the reagent DiBAC (Bis- (1,3-Dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol) (Thermo Fisher, Massachusetts, United States) was used. On the other hand, the potential-sensitive probe (DiBAC) can enter depolarized cells where it binds to proteins or the intracellular membrane and exhibits enhanced fluorescence and red spectral shift. The purpose of using this technique is to analyze membrane polarization. Increased depolarization results in additional influx of anionic dye and increased fluorescence. In contrast, hyperpolarization is indicated by a decrease in fluorescence. This bis-oxonal has an excitation maximum of 490 nm and an emission maximum of 516 nm. The DiBAC probe is excluded from mitochondria due to

its negative charge, which makes it a more recommended probe than carbocyanins for measuring plasma membrane potentials (166).

8.4.8 Extraction and purification of RNA from cells in culture

In order to quantify the gene expression of the cells at a given moment, the extraction of the cellular RNA must first be carried out. With the obtaining of RNA, an rt-PCR (reverse transcription-PCR) was performed, and the expression levels were subsequently quantified by q-PCR (quantitative or real-time PCR). Laminar flow hoods were used to maintain sterility. RNA extraction was performed using the miRNeasy Mini Kit (50) (Qiagen). This kit allows the cellular RNA to be extracted while preserving the miRNAs, which, despite reducing the final yield, represents a great advantage, since it allows the same extraction to be used to perform subsequent miRNA expression analyzes using the same technique, RT q -PCR. HUVEC cells were seeded in 12-well plates and the cells were grown to approximately 80% confluence. HUVEC cells were subsequently treated with different histone concentrations (0, 2, 5, 10, 25, 50ng / µL), both hyperacetylated and under basal conditions.

The purified RNA was quantified with Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, New York, NY, USA). 1 µL of RNase-free water was used as a blank. The absorbance of 1.5 µL of samples at 260 nm was measured with which we obtained the RNA concentration. After measuring the concentrations of each sample, they were frozen at -80 ° C.

8.4.9. Extraction and purification of circulating RNA from human plasma

In order to quantify the levels of microRNAs present in the plasma of septic patients, the extraction of free circulating RNA was performed first. With the obtaining of the RNA, an rt-PCR (reverse transcription-PCR) was performed and later the levels of miRNAs were quantified by quantitative PCR. Laminar flow hoods were used to maintain sterility. RNA extraction was performed using the miRNeasy Serum / Plasma Advanced Kit (Qiagen).

8. 4.10. Analysis of gene expression by RT q-PCR

Quantification of gene expression was performed using RT-qPCR. First, a reverse transcription (RT-PCR) was performed that was prepared in a 96-well plate. In each well, 10 µL of the corresponding RNA sample (100 ng of sample, making up to 10 µL with RNase-free water) and 10 µL of PCR mix (10xRT buffer (2µL), 25x dNTP Mix 100mM (2µL), 10x Random primers (0.8µL), multiscribe reverse transcriptase (1µL) and nuclease-free water (4.2µL)) (High-Capacity cDNA Archive kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The reaction mixture was introduced into the QuantiStudio 5 (ThermoFisher Scientific) and left in a first incubation step at 25 ° C for 10 min, which allows the binding of the random hexamers, followed by a period of 120 min to 37 min. ° C which allows the synthesis of the copy DNA (cDNA), followed by a final phase of inactivation at 95 ° C for 5 min.

Once the cDNA was obtained, it was quantified by qPCR. In our experiments we used the predesigned Taqman Gene expression assays (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) that use fluorescent probes that have a fluorophore at one end and a “quencher” at the other end that prevents the emission of fluorescence by the fluorophore at the other end. However, when the probes are bound, the exonuclease activity of the Taq polymerase eliminates one of the ends, moving the quencher away from the fluorophore and allowing the emission of fluorescence. Fluorescence was detected after excitation with the corresponding laser.

To carry out this quantitative PCR, 1µL of each of the samples was placed in the corresponding wells of a 384-well plate and 3.5µL of RNase-free water, 1µL TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies) and 5 µL were added. TaqManH Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, P / N 4304437, Foster City, CA. USA) obtaining a total volume per well of 10 µL, formed by the mixture of the specific primers for SOD1 (Hs00533490_m1, Life Technologies) , SOD2 (Hs00167309_m1, Life Technologies), GPX-1 (Hs00829989_m1, Life Technologies), CAT (Hs 00156308, Life Technologies), NOS3 (Hs01574665_m1, Life Technologies), PGIS (Hs00919949_m1, Life Technologies), TB1, Life Technologies_m02706), V-CAM-1

(Hs01003372_m1, Life Technologies) I-CAM-1 (Hs00164932_m1, Life Technologies), SEL-E (Hs00174057_m1, Life Technologies), COX-1 (Hs00377726_m1, Life Technologies), COX-2 (Hs00153133_m1, Life Technologies), IL-1a (Hs00174092_m1, Applied Biosystems), IL-1 b (Hs01555410_m1, Applied Biosystems), IL-6 (Hs00174131_m1, Applied biosystems), IL-18 (Hs01038788_m1, Applied Biosystems) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Hs02758991 Applied_iosgios1758). The samples were placed in triplicate for each of the genes and quantified in the ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA. USA).

It was kept for 10 min at 95 ° C to activate the enzyme, followed by 45 cycles in which the temperature was kept at 95 ° C for 15 seconds to decrease it to 60 ° C for one minute.

8.4.11. DNA extraction from human PBMCs

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the whole blood of study participants collected in anticoagulant tubes (EDTA), using the Ficoll-Paque method. DNA was extracted using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Inc., USA). 1 μ g of bisulfite-converted genomic DNA was treated using the EZ-96 DNA methylation kit (Zymo Research, Irvine, CA) following the manufacturer's recommendations for Infinium assays.

8.4.12. Protein extraction

The protein extraction was carried out following the protein extraction protocol of our laboratory:

1. Put 150 μ L of lysis buffer (HEPES pH 7.4 20mM, NaCl 100mM, Triton X-100 1%, NaF 50mM, B-glycerophosphate 10 mM, PMSF 1 mM, PIC 2 μ L, orthovanadate 10 μ L and H₂O to make 10 mL of stock solution) and pipet several times.
2. Allow to incubate for 15 min on ice, shake occasionally and shake vigorously for 30 seconds.

3. Centrifuge at 13,000g for 10 min at 4°C and collect the supernatant and freeze it at -20°C.

8.4.13. Analysis of protein carbonylation levels by immunodetection

It is known that oxidative stress can produce oxidative damage in biomolecules that make up cellular components such as proteins, DNA, and lipids (167).

Proteins undergo various types of oxidations; one of them, the formation of carbonyl groups, which has been used methodologically to evaluate the degree of oxidative damage in different biological systems. Protein carbonylation is irreversible oxidative damage that occurs in proteins, often leading to a loss of protein function. Carbonylation consists of the oxidation of the side chains of protein amino acids, it occurs in amino acids such as lysine, arginine, proline, and threonine, among other amino acids, catalyzed by means of metals that form carbonyl groups in the side chains of proteins (168). The carbonylation products of these residues are glutamic semialdehyde (product of the oxidation of arginine and proline) and amino adipic semialdehyde (product of the oxidation of lysine). Carbonylation is considered a generalized indicator of severe oxidative damage.

8.4.14. Evaluation of the expression of the inflammasome by measuring the catalytic levels of Caspase-1

Caspase-1 is a member of the family of aspartic acid-specific cysteine proteases and an essential component of the inflammasome. Innate immune cells respond to pathogens and other danger signals with the formation of the inflammasome complex and the conversion of procaspase-1 zymogen to caspase-1, which is catalytically active. Activation of caspase-1 results in: 1) the processing and release of cytokines, IL-1 β and IL-18 and 2) pyroptosis, an immunogenic form of cell death like apoptosis, but more aggressive (50– 53).

The inflammasome is a multiproteic complex formed by caspase-1, PYCARD, also called ASC (speckled apoptosis-associated protein containing a CARD: C-terminal caspase recruitment domain), a NALP (NOD-like receptor type) and sometimes a caspase-5 or caspase-11.

The exact composition of the inflammasome depends on the activator that initiates the assembly of the inflammasome. However, all the proteins that assemble the inflammasome are capable of individually detecting microbial antigens and react accordingly, forming the inflammasome.

8.4.15. Evaluation of the effect of Inhibitor MCC950 on cell viability by MTT

The inhibitor MCC950 has been widely described due to its specific activity on the oligomerization of the NLRP3 structure, key in the assembly of the Inflamasome. Therefore, this inhibitor prevents the oligomerization of NLRP3 and, as a consequence, the assembly of the inflammasome.

To analyze the effect of this inhibitor on cell viability, HUVEC cells were treated as described above, with a range of 0-20 µM of inhibitor MCC950. After two hours of exposure, 50 µg / mL of histones were added and incubated for a further 4 hours. After treatment, viability was tested by MTT assay.

This test is based on the reduction of a yellow soluble tetrazolium salt (MTT) into an insoluble blue formazan. This reduction is carried out inside the cell by the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase. Metabolization of tetrazolium salt (MTT) to formazan causes a color change from yellow to purple. This color change is directly proportional to the number of living cells capable of metabolizing salt.

To carry out this test, MTT was prepared as a stock solution at a concentration of 5 mg / mL in PBS. After dissolving it, it is sterilized by filtration and stored in an opaque glass bottle at 4 ° C. This stock solution is diluted in the appropriate culture medium in the ratio: 1mL of MTT for each 10mL of medium (1:11 dilution) and is kept at 37 ° C, in the dark, for the reaction to take place. Pure dimethylsulfoxide (DMSO) is used to redissolve the water-insoluble formazan.

8.4.16. Measurement of circulating histone levels by mass spectrometry

8.4.16.1. Sample preparation

Plasma samples were centrifuged 15 min at 15,000 g for delipidation. 2 µL of each plasma sample was diluted in 8 µl H₂O. 2 µL of each 1/5 diluted plasma (25 µg) were mixed in 18 µL of 50 mM BA along with 25 fmol of Heavy Mix peptides in a final volume of 20 µL. Cysteine residues were reduced in 2 mM DTT (DL-Dithiothreitol) in 50 mM ABC at 300 W microwave for 3 min.

The sulphydryl groups were alkylated with 5 mM IAM (iodoacetamide) at 50 mM ABC in the dark at room temperature for 20 min. The reaction was stopped with TFA (trifluoroacetic acid) at a final concentration of 1%.

8.4.16.2. Analysis of circulating histones by mass spectrometry

The mass spectrometry experiments were carried out in a 5500QTRAP hybrid triple quadrupole / linear mass spectrometer with ion trap (ABSCIEX), equipped with a Micro M3 MicroLC chromatographic system in the Proteomics Unit of the Servei Central de Suport a la Investigació Experimental, SCSIE, from the University of Valencia.

Briefly, the protocol consisted of using 10 µL of tryptic digestion (approximately 9 g of protein and 25 fmol of each isotopically labeled peptide (Spike-In peptide)) which were injected into a Trap column (10X0.3mm Trap Cartridge Chromxp C18CL 5um, ABSCIEX) and then loaded and separated on an analytical column (ChromXP C18, 120A, 3 µm, 150x0.3 mm). Elution was performed with a linear gradient from 0 to 35% B in A over 30 minutes. (A: 0.1% FA; B: ACN, 0.1% FA) at a flow rate of 5µL / min.

The 5500 QTRAP operated in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode. MRM data was acquired in positive mode with 5500 V spray voltage, curtain gas: 25 psi, ion source gas: 25psi, input potential (EP): 10, and output potential (EXP): 16.

Collision energy (CE) and power reduction potential (DP) were previously optimized at each transition. A relative quantification of each histone and the area ratios (light / heavy) was performed for all transitions, which were calculated using the Skyline

4.2.1.19058 software (MacCoss laboratory) and the concentration of the protein of interest as fmol / uL of initial serum and converted to ng / mL of protein.

8.4.17. Analysis of the levels of circulating Caspase-1 present in the plasma of the patients

Circulating human Caspase-1 levels were measured using the Human Caspase-1 ELISA (RayBiotech, Parkway, Peachtree Corners, USA).

8.4.18. Analysis of the levels of circulating IL-18 present in the plasma of the patients

Human IL-18 levels were measured by the Human IL-18 ELISA Assay Kit (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA).

8.4.19. Analysis of the levels of different circulating cytokines present in the plasma of patients

Plasma levels of IL-1 α , IL-1 β , IL-12p70, interferon (IFN) - α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor (TNF- α , factor granulocyte macrophage colony stimulant (GM-CSF), macrophage inflammatory protein 1 (MIP-1 α , MIP-1 β , monocyte chemoattractant protein-1) (MCP-1), E-selectin, P-selectin, intercellular adhesion molecule 1 (sl-ICAM1), IL-4, IL-13, IL-17 and interferon- γ -inducible protein 10 (IP-10) in samples from healthy individuals ($n = 10$), critically ill patients Non-septic ($n = 6$) and patients with sepsis ($n = 10$) and SS ($n = 15$) were measured with the ProcartaPlex 20 plex panel of human inflammation (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA), from according to the manufacturer's instructions.

8.4.20. Analysis of circulating levels of IL-18, IL-27, S100A8 and S100A9 by ELISA

Human IL-18 levels were measured in triplicate using the human IL-18 ELISA (Thermo Fisher, Massachusetts, USA). IL-27 in plasma from patients with sepsis and septic shock was measured in triplicate using the human IL-27 ELISA kit (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA). Finally, S100A8 and S100A9 were measured in

triplicate with the Human S100A8 ELISA kit (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) and the Human S100A9 ELISA kit (MyBioSource, San Diego, California, USA).

8.4.21. Global analysis of DNA methylation using EPIC 850 K Arrays

8.2.21.1. Preparation of 850K arrays and reading on a HiScan SQ (Illumina) system

The global analysis of DNA methylation from PBMCs was performed with the Infinium Human DNA Methylation EPIC 850K BeadChip matrices (Illumina Inc, San Diego, California) used for the analysis of > 850,000 CpG sites, covering 99% of the CpG sites in genes described with regulation by DNA methylation and 95% of the CpG islands, including information from projects such as ENCODE and FANTOM5.

4 µL of bisulfite converted DNA was used following the Illumina Infinium HD methylation assay protocol. First, a first step of whole genome amplification was performed followed by enzymatic fragmentation, precipitation and resuspension. Subsequently, the processed samples were hybridized with human methylation BeadChips 850K EPIC at 48 ° C for 16 hours. DNA not specifically hybridized was washed away. Subsequently, a single nucleotide extension was performed using the hybridized bisulfite treated DNA as template and the incorporated nucleotides labeled with biotin (ddCTP and ddGTP) and 2,4-dinitrophenol (ddATP and ddTTP). After single base extension, repeated rounds of staining were performed with a combination of antibodies that differentiated DNP and biotin by binding to different fluorophores. Finally, the BeadChip was washed and subsequently scanned on an Illumina HiScan SQ scanner (Illumina Inc, San Diego, California).

8.4.21.2. Differential methylation analysis

The R code used for the methylation analysis has been extracted from “MethylationArrayAnalysis: A cross-package Bioconductor workflow for analyzing methylation array data” (169) and was also based on the final master's work entitled “Identification of biomarkers based on dna methylation for diagnosis and prognosis of neonatal sepsis” by Paula Navarrete López (Master Bioinformatics University of Valencia) whose work was published (129).

Briefly, the minfi package in R (170) was used to read the raw .idat files obtained from the Illumina EPIC matrix, evaluate their quality, and perform quantile normalization, as well as for the exclusion of probes that can interfere with the subsequent analysis (171). DNA methylation probes were filtered in order to eliminate probes with poor detection p-value (<0.01) in any of the samples, as well as probes that matched the described positions of the SNPs, the probes related to sex chromosomes (X and Y chromosomes) and those described as multiple reactive probes (172).

The statistical test to evaluate differentially methylated regions (DMRs) was performed using the mCSEA package (173), which is an R package based on the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) method to identify Illumina Infinium DMRs. 450K and EPIC matrix data and is especially useful for detecting subtle, but consistent, methylation differences in complex phenotypes between groups (non-septic ICU patients, patients with sepsis and septic shock). For each of the possible comparisons between groups, the differentially methylated regions located in genes and promoters were obtained, using an adjusted p value (FDR) cutoff of 0.05.

In addition, the DMRcate package was used to obtain differentially methylated CpG sites between the 3 groups (ICU, sepsis, and septic shock patients) considering an FDR threshold of 0.05. The shock control comparison, showing many differentially methylated CpGs, was then scored as DMR.

Finally, the functional analysis was performed using the clusterProfiler package (174) through an over-representation analysis (ORA), which was applied to the DMR sets obtained by both approaches (mCSEA and DMRcate). These DMRs were enriched in terms of GO, as well as KEGG pathways, resulting in overrepresented biological processes and metabolic pathways.

All the computational steps were carried out using R scripts of our own design optimized in the Bioinformatics and Computational Diagnosis Unit of EpiDisease S.L.

8.4.22. Validation of candidate gene methylation by pyrosequencing

Pyrosequencing is a technology that allows the order of a DNA sequence to be determined by luminescence. It is based on the principle of sequencing by synthesis in which the incorporation of nucleotides into DNA is detected by the action of DNA polymerase. The particularity of this method is that it detects the release of pyrophosphate when the nucleotides are incorporated. Light will be generated from pyrophosphate through various enzymatic chain reactions. In recent years, pyrosequencing has gained relevance in the analysis of DNA methylation. To do this, after PCR amplification, pyrosequencing is used to determine the nucleotides converted by the bisulfite. Bisulfite treatment of DNA converts cytosine residues to uracil but does not affect 5-methylcytosine residues. Therefore, bisulfite-treated DNA only maintains methylated cytosines, displaying information about the methylation status of a DNA segment at the nucleotide level.

To perform the analysis, DNA was obtained from PBMCs as previously described. Subsequently, this DNA underwent a conversion treatment with bisulfite, as explained in the previous step. Next, 5 µL of bisulfite-converted DNA was amplified by PCR, and then pyrosequencing analysis was performed to analyze the methylation levels of each cytosine in the promoters of the selected genes. For this, both PCR amplification primers and pyrosequencing primers were designed.

8.4.23. Statistical analysis

Statistics were calculated with SPSS v23 and Prism v9 software (Software Inc. CA, USA) was used for graphics. Values were expressed as mean \pm SEM. A one-way analysis of variance was used to determine the difference between groups in the in vitro experiments. When an interaction effect was found, multiple comparisons were made using the post hoc test of the Scheffé method. Significance was considered at * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$, as indicated in each case.

For the studies carried out on clinical samples from patients in the Intensive Care Unit, the normality of the samples was determined with the Kolmogorov-Smirnov normality test and the samples did not follow a Gaussian distribution. The nonparametric Mann-Whitney test was used to analyze the differences between two unpaired groups with a

significance level of 0.05. The Kruskal-Wallis test was used to analyze the differences between ICU controls, patients with sepsis, and SS, followed by a post hoc test with Bonferroni correction for α ($0.05 / 3$). Spearman's rho test was used for the correlation analysis between variables.

8.5. RESULTS

8.5.1. Induction of hyperacetylation in human histones

Hyperacetylation of human histones was carried out in HeLa cells using the SAHA reagent (Vorinostat) as indicated in the Materials and Methods section.

To analyze the best concentration for the treatment with SAHA, treatments were carried out 24 hours after cell seeding with different concentrations of this histone deacetylase inhibitor (HDACi).

Histone purification was performed as previously described (Materials and methods). The levels of hyperacetylated histones were determined by analyzing the levels of H2AK5ac, H3K9ac and H4K8ac by Western Blot (Figure 8A).

The results obtained showed higher levels of hyperacetylated histones H2A (Lys5), H3 (Lys9) and H4 (Lys8) for HeLa cells treated with 50 μ M and 100 μ M of SAHA (Figure 8B).

Based on these results, it was decided that 50 μ M SAHA would be used for the following experiments due to the high ratio of hyperacetylated histones that were obtained compared to the control and 25 μ M, and to avoid the high cellular toxicity obtained with 100 μ M SAHA (Figure 8C).

8.5.2. Human extracellular histones induce alterations in cell death, adhesion and aggregation patterns in HUVEC

The analysis on the cytotoxic effect of human extracellular histones in HUVEC, under native and hyperacetylated conditions, was evaluated using purified histone extracts at concentrations of 0, 2, 5, 10, 25 and 50 μ g / mL (Figure 9) defined in based on preliminary experiments carried out by our group and other authors (93,96,175).

The results obtained indicated a higher cytotoxicity in HUVEC when the cells were incubated with the native histones. The cytotoxic effect is visible from the first concentrations with which HUVEC were treated, and a higher mortality and cell aggregation was observed as the concentration of extracellular histones was increased. In contrast, bright-field microscopy images showed less cytotoxicity for HUVECs incubated with hyperacetylated histones, with which it was observed that acetylation, such as PTMs in histones, has a lesser cytotoxic effect than native histones in human endothelial cells. Likewise, the images show that HUVECs treated with native histones tend to alter their adhesion patterns and lead to greater cell aggregation, an effect much less pronounced when HUVECs are treated with hyperacetylated histones at the same concentrations.

8.5.3. Human extracellular histones induce cell death through apoptosis and pyroptosis mechanisms in HUVEC

The analysis on the molecular mechanisms mediated by human extracellular histones, in native and hyperacetylated conditions, on HUVEC was evaluated by flow cytometry, using the same previous concentrations of 0, 2, 5, 10, 25 and 50 μ g / mL of histones. native and hyperacetylated extracellular cells (Figure 10).

The results obtained by flow cytometry showed a decreased cell viability that corresponded with an increase in the signal in cells positive for annexin V- (AV) and / or propidium iodide (PI), from 10 μ g / mL to 50 μ g / mL after HUVEC exposure to native or hyperacetylated histones compared to the control condition (0 μ g / mL) (Figure 10A and Figure 10B, respectively). In particular, HUVEC treated with 50 μ g / mL of native histones induced more AV / PI positive cells than those treated with hyperacetylated histones, that is, greater cell death.

Although, a priori, it is assumed that AV-positive cells are apoptotic cells in the early stages, and that AV + PI-positive cells are in a late apoptosis phase, it is known that piroptosis is also positive for AV and PI, and therefore it is detected by flow cytometry as late apoptosis (176), so the observed mortality could be due to both apoptosis and pyroptosis mechanisms. In order to molecularly characterize the observed cell death mechanisms, the activity of caspase-1 (CSP-1) (Figure 11A) and the expression of activated caspase-3 (CSP-3) were measured (Figure 11B and Figure 11C). as a marker of pyroptosis and apoptosis, respectively (177,178).

Our results indicated that HUVEC activated pyroptosis and apoptosis mechanisms after exposure to human extracellular histones. Consequently, 50 μ g / mL of extracellular histones, both native and hyperacetylated, showed the highest levels of CSP-3 expression (Figure 11D and Figure 11E). However, CSP-1 activation was observed in HUVEC exposed to 25 μ g / mL of native histones, but not in those exposed to hyperacetylated extracellular histones. When HUVECs were treated with 50 μ g / mL of native and hyperacetylated histones, CSP-1 was shown to be active in both conditions, but to a lesser extent in HUVECs exposed to hyperacetylated histones (Figure 11C).

8.5.4. Characterization of pyroptosis and its products.

Since extracellular histones were shown to be capable of increasing the levels of activated CSP-1 in a model of primary endothelial cells, and that this was correlated with the increase in cellular cytotoxicity, it was decided to analyze the products of pyroptosis to see if this increase in CSP-1 activity translated into an increase in pyroptotic ILs. That is, if the increase in CSP-1 directly translated into an increase in cell death by pyroptosis (see Figure 4).

For this, the expression levels of both the pyroptotic ILs produced by the canonical pathway (IL-1 β and IL-18) and that produced by the non-canonical pathway (IL-1 α) were analyzed. Likewise, given that CSP-1 activity is regulated by the inflammasome, it was decided to characterize the type of inflammasome that was mediating CSP-1 activation. Specifically, NLRP3 was evaluated, because it is the best characterized inflammasome, the one that is activated under the greatest number of stimuli and is the

only one, together with NLRP1, that has been shown to be capable of being activated by DAMPs such as extracellular histones (179,180).

The results demonstrated that the cells exposed to native extracellular histones had very high expression levels in all pyroptotic ILs (Figure 12A, Figure 12B and Figure 12C), the expression levels of endothelial cells exposed to the same conditions being lower. Hyperacetylated extracellular histones (Figure 12A, Figure 12B and Figure 12C). These results demonstrated that high levels of CSP-1 translate into an increase in the expression of IL-1 α , IL-1 β and IL-18, and therefore in an increase in cell death, mainly through pyroptosis mechanisms. (Figure 12D). Likewise, the levels of protein expression of the NLRP3 inflammasome were higher in endothelial cells exposed to native extracellular histones. In fact, HUVECs exposed to hyperacetylated extracellular histones did not show significant changes in NLRP3 expression levels (Figure 12D).

8.5.5. Extracellular histones induce oxidative stress, mediating plasma membrane depolarization and altering the antioxidant enzymatic response in HUVEC.

Oxidative stress is one of the cell death inducers par excellence, having demonstrated its role in a multitude of cytotoxic processes such as apoptosis or necrosis (181). Likewise, several authors have demonstrated the interconnectivity between oxidative stress, NLRP3 activation, and inflammation (175,182). Therefore, we measured oxidative stress markers, membrane potential and antioxidant enzyme levels in HUVEC, after being exposed to native and hyperacetylated extracellular histones.

Our results showed that native extracellular histones induced oxidative stress in HUVEC due to increased levels of total carbonylated proteins and the oxidized form of Peroxiredoxin-6 (Prdx6) (Figure 13A Figure 13B). These results indicate that native histones induced more oxidative stress damage than hyperacetylated histones, probably because of increased membrane potential, which induced membrane depolarization in HUVECs, as demonstrated by our results (Figure 13C). Likewise, we observed that the native extracellular histones induced an alteration in the membrane potential (depolarization) in a dose-dependent manner, in contrast to the hyperacetylated histones, which did not modify the cell membrane potential (Figure 13C). When we analyze the response to oxidative stress, the mRNA levels of the antioxidant enzymes

that reduce the superoxide radical (i.e., superoxide dismutase 1 (SOD1), superoxide dismutase 2 (SOD2)) as well as the antioxidant enzymes that eliminate peroxide hydrogen (ie, catalase (CAT) and glutathione peroxidase 1 (GPX1)) increased in a dose-dependent manner (Figure 13D). Likewise, the protein levels of antioxidant enzymes were higher in HUVEC exposed to native histones than in those cells exposed to hyperacetylated histones (Figure 13E, Figure 12F). The lower levels of oxidative stress markers and the lower induction of antioxidant enzymes in HUVECs exposed to hyperacetylated histones suggest that hyperacetylation produces a minor deleterious effect related to oxidative stress induced by extracellular histones.

Finally, to demonstrate the control of the redox switches involved in the activation of the inflammasome and piroptosis, the HUVECs were pre-incubated for 1 hour with 0.5mM and 1mM of glutathione ethyl ester (GSH-EE) before the 4-hour exposure to extracellular histones (50 μ g / mL). The results obtained showed that GSH-EE 1mM was able to reduce pyroptosis mediated by extracellular histones and also decreased cell death (Figure 13G), as well as produced a decrease in the production of IL-1 α , IL-1 β and IL-18 as products of pyroptosis (Figure 13H).

8.5.6. Extracellular Histones Affect Prostanoid Biosynthesis Pathways in HUVEC

Cyclooxygenase-1 (COX-1) plays an important role in the generation of prostanoids during vascular homeostasis. COX-2 is induced by pro-inflammatory cytokines and oxidative stress and is the main source of prostanoid biosynthesis during inflammation (183). Our results indicated that extracellular histones induced COX1 and COX2 overexpression in a dose-dependent manner (Figure 14A, Figure 14B, Figure 14C). Interestingly, the gene expression and protein levels of both cyclooxygenases were lower in HUVEC treated with hyperacetylated histones than in cells treated with native histones under the same conditions (Figure 14A, Figure 14B, Figure 14C).

The vascular endothelium plays a key role in the regulation of vascular homeostasis by controlling vascular tone (184). Since extracellular histones can mediate cell death in HUVEC, extracellular histones are likely to affect the self-function of cells. Consequently, PGE2 and TBXA2 are two of the main vascular prostanoids responsible

for mediating the relaxation / contraction of blood vessels. They are produced respectively by prostacyclin synthase (PGIS) and thromboxane synthase (TBXAS). Acutely, vascular homeostasis also depends on nitric oxide (NO), produced by endothelial nitric oxide synthase (eNOS or NOS3), capable of inducing rapid changes in vascular homeostasis.

Regarding the synthesis of prostanoids, the increase in the levels of PGIS mRNA (Figure 14D) was accompanied by a greater amount of protein expression when the HUVEC were treated with 50 μ g / mL of extracellular histones (Figure 14E, Figure 14F, respectively). However, despite the increase in TBXAS gene expression, under these same conditions, no changes were found in protein levels.

Elevated levels of PGIS (Figure 14E, Figure 14F), but not TBXAS, changed the PGIS / TBXAS ratio (Figure 14G), which may lead to an alteration in vascular homeostasis. Furthermore, native extracellular histones decreased the expression of NOS3 in HUVEC (Figure 14H). In contrast, hyperacetylated histones did not decrease eNOS mRNA and protein levels at extracellular histone concentrations below 50 μ g / mL (Figure 14E, Figure 14F, Figure 14I), but rather increased eNOS expression levels to 50 μ g / mL.

8.5.7. Extracellular histones modify the expression patterns of endothelial adhesion molecules and induce inflammatory responses

Activation of the NLRP3 inflammasome in endothelial cells after infection leads to inflammation and dysregulation of endothelial adhesion factors ICAM-1 and VCAM-1 (185).

Our results indicated that concentrations above 25 μ g / mL of extracellular histones produced an overexpression of IL6 (Figure 15A), which is related to an increase in ICAM1, VCAM1 and ESEL in a dose-dependent manner (Figure 15B, Figure 15C, Figure 15D). Our results revealed how the expression of IL6 and different adhesion molecules such as ICAM1, VCAM1 and ESEL were lower in HUVEC treated with hyperacetylated histones than with native histones, indicating that hyperacetylation can reduce cell signaling involved in inflammation and the expression of these molecules.

8.5.8. Inhibition of the inflammasome prevents after-effects mediated by extracellular histones in HUVEC

Secondary apoptosis is identified by positive Annexin V (AV) and PI signals, as occurs with pyroptosis. In this sense, to confirm the role played by both apoptosis and pyroptosis in HUVEC when cells are exposed to extracellular histones, we analyzed cell viability by flow cytometry incubating HUVEC with extracellular histones and two specific inhibitors, Z-LEHD- FMK (LEHD) a specific apoptosis inhibitor by blocking CSP-9 and MCC950, which inhibits the assembly of the inflammasome NLRP3, thus inhibiting pyroptosis mediated by this inflammasome.

The results demonstrated that the HUVEC pre-treated with LEHD recovered part of the cell viability when the cells were treated with native extracellular histones, indicating that apoptosis is involved as a mechanism that mediates cell death in HUVEC (Figure 16A), as we have previously demonstrated. However, the highest cell viability was recovered when HUVECs were treated with MCC950, which indicated that the mechanism that mediates endothelial cell death by histones is mainly pyroptosis (Figure 16B), specifically through NLRP3. However, apoptosis plays a more important role than piroptosis when HUVECs were exposed to hyperacetylated extracellular histones, as there was hardly a significant effect on cell viability and cell death when the drug MCC950 was used (Figure 16B, Figure 16C).

To confirm the blockade of pyroptosis when the NLRP3 inflammasome is inhibited, we measured the expression levels of pro-inflammatory cytokines released by the inflammasome and demonstrated that the MCC950-treated HUVEC reduced the expression of the pro-inflammatory interleukins IL1A, IL1B and IL18 (Figure 16D, Figure 16E, Figure 16F, respectively).

Regarding the antioxidant response after inhibiting the inflammasome, our results showed only a statistically significant reduction in the expression of SOD2, which suggests the role of extracellular histones in mediating mitochondrial superoxide production (Figure 16). Furthermore, we also evaluated the effects on endothelial function and endothelium-mediated immune response in HUVEC after inhibiting the inflammasome. Our results indicated a decrease in the expression of PGIS and TBXAS

and restored the levels of NOS3 (Figure 16G, Figure 16H, Figure 16I, respectively), after inhibiting the inflammasome in HUVEC incubated with native histones. Likewise, a decreased expression of COX1 and COX2 was also observed after exposing the cells to the inflammasome assembly inhibitor MCC950 and treating them with hyperacetylated histones (Figure 16), compared to when they were only exposed to hyperacetylated histones, suggesting a reduction in the inflammatory profile in HUVEC. These results are consistent with the decreased expression of the pro-inflammatory cytokine IL6 observed after inhibiting the inflammasome (Figure 16L). Furthermore, since IL6 overexpression was correlated with an increase in endothelial adhesion molecules, as previously described, we again measured their expression levels after inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950. The results obtained demonstrated that the inhibition of the inflammasome prevented the overexpression of endothelial adhesion factors in HUVEC treated with native extracellular histones, since it was possible to restore the levels of ICAM1 and VCAM1 to levels like those of the control HUVEC (Figure 16M, Figure 16N) and reduce eSEL levels (Figure 16O).

8.5.9. Piroptosis is activated in patients with septic shock.

Among the patients included in the study, thirty-nine samples were analyzed, including 9 healthy volunteers, 6 critically ill ICU patients with cerebrovascular events, 10 patients with sepsis, and 15 patients with SS. The mean age of the healthy subjects was 47 ± 14 years, and the men represented 55.6% (see Table 5). The mean age of the controls in the ICU was 68 (68 ± 8), and men represented 50%; the mean age of the septic patients was 68 (68 ± 11) and men represented 55.6%; The mean age of patients with SS was 65 years (65 ± 15) and men represented 73.3%. Table 5 provides detailed clinical data for ICU controls, sepsis, and SS patients. The APACHE II score did not show differences between the different groups of patients. The highest mean value of the SOFA score was presented by patients with SS (9 ± 3), being lower for ICU controls (5 ± 3) and patients with sepsis (6 ± 2). The highest marker values were found for CRP, PCT, and lactate in SS compared to the other groups (see Table 5).

As we propose histones as inducers of pyroptosis, we first measured the levels of circulating histones in plasma using the MRM-MS technique and the use of isotopically labeled peptides, as we have already published (105). Our results demonstrated that SS

patients had the highest levels of circulating histones (Figure 17A). Specifically, control patients showed mean histone levels of $1.44 \pm 3.99 \mu\text{g} / \text{mL}$, ICU patients showed mean histone levels of $5.41 \pm 8.39 \mu\text{g} / \text{mL}$, septic patients $40.24 \pm 72.57 \mu\text{g} / \text{mL}$ and SS patients $1381.95 \pm 2297.15 \mu\text{g} / \text{mL}$. Regarding IL-1 $\alpha\beta$, it was observed that it tended to increase with the severity of the disease, although we did not observe statistically significant levels. (Figure 17C). However, circulating CSP-1 (Figure 17B) and cytokine IL-18 released by pyroptosis (Figure 17D) and IL-1 α (Figure 17E) were higher in SS patients compared to septic and ICU patients. The results demonstrated that both types of pyroptosis occur simultaneously in sepsis: canonical pyroptosis through IL-18 and non-canonical pyroptosis through IL-1 α .

In addition, we analyzed the correlations between the levels of circulating histones, CSP-1, IL-18 and IL-1 α and we observed a statistically significant positive correlation between them and the levels of circulating histones (Table 6). Circulating histone levels showed a statistically significant positive correlation with SOFA and lactate levels, suggesting the role of circulating histones with the severity of SS and a poor prognosis. Circulating CSP-1 and IL-18, markers of pyroptosis, showed a statistically significant positive correlation with SOFA scores and lactate levels (Table 6).

When analyzing the circulating levels of pro-inflammatory cytokines relevant in sepsis, such as IL-6 (Figure 17F), TNF α (Figure 17G) and IL-8 (Figure 17H), we observed that patients with SS had the highest levels. Likewise, we also measured the levels of endothelial adhesion factors in plasma, such as sICAM-1 (Figure 17I) and e-SEL (Figure 17J) and found that patients with SS had the highest values for both mediators of endothelial function.

Finally, we analyze the correlations between the levels of circulating histones, pro-inflammatory cytokines, and molecular adhesion factors. Our results revealed a correlation between circulating histones and IL-6, ICAM-1, and e-SEL (Table 6). We also observed a statistically significant positive correlation between the pyroptotic interleukins IL-1 α and IL-18 with proinflammatory IL-6 and endothelial adhesion factors (Table 6).

8.5.10. The proportions of immune cells are different between critically ill patients, patients with sepsis and septic shock

The proportions of immune cells estimated from the DNA methylation data showed differences between the groups. The approach used has been through a deconvolution process of the methylation data of the EPIC850K arrays, as described in the materials and methods part. Septic shock patients showed increased neutrophil levels and low lymphocyte populations compared to septic patients and ICU controls (Figure 18). We also performed an analysis of the RLN, since it has been shown to be useful as a diagnostic and prognostic marker in patients with sepsis (186). Our results showed a high NLR ratio in SS patients compared to the other patient groups (Figure 18).

8.5.11. Increased pyroptotic interleukins in patients with sepsis and septic shock

Due to the type of mechanism that regulates pyroptosis, it has been postulated that this type of cell death may be one of the initial events that occur after infection in septic patients (180). As mentioned, pyroptosis induces hyperinflammatory phenotypes in the early stages of the disease, by producing pro-inflammatory cytokines such as IL-1 α , IL-1 β and IL-18. Pyroptosis released interleukins IL-1 α and IL-1 β are involved in inflammation and vasodilation, but IL-18 also plays an important role in immune regulation by promoting Th1 cell activation and enhancing T cell cytotoxic activity. CD8 + and "Natural Killer" (NK) innate immunity cells (187). Furthermore, IL-1 β and IL-18 are also involved in defense against bacterial pathogens due to their ability to kill them (i.e., through pore-induced intracellular traps, among others) (76,188,189).

The results obtained in Figure 19 demonstrated that patients with septic shock have significantly elevated circulating levels of IL-1 α and IL-18, compared to septic patients and the control group. Likewise, patients with septic shock showed higher levels of IL-1 α than the ICU group. However, there were no statistically significant differences in circulating IL-1 β levels between the different groups.

8.5.12. Innate immunity is over-activated in patients with septic shock in the early stages of the septic episode

As described above, IL-18 can enhance NK activity. NK cells recognize infected cells and respond by killing them and secreting IFN- γ , a cytokine that activates macrophages. Likewise, macrophages phagocytize microbes and produce IL-12, which activates NK lymphocytes to secrete more IFN- γ , thus enhancing their activity in a reciprocal manner. Furthermore, other molecules such as type 1 interferons (eg IFN- α) enhance the activity and efficiency of NK cells by increasing their microbicidal capacity (190) (see Figure 5).

The results in Figure 3 indicate that the patients with septic shock had elevated circulating levels of the pro-inflammatory cytokines IL-12p70, IFN- α and IFN- γ , compared to the control group and the group of septic patients. However, they did not show differences with the patients belonging to the ICU group.

IL-6 is secreted by macrophages in response to specific microbial molecules. This cytokine is responsible for stimulating acute phase protein synthesis and neutrophil production in the bone marrow. In addition, IL-6 promotes B cell proliferation and increases pro-inflammatory helper T cell-mediated responses 17 (Th17) and suppresses the function of anti-inflammatory regulatory T cells (Tregs) (191) (see Figure 5).

IL-8 is a pro-inflammatory chemokine produced mainly by macrophages, but also expressed by other cells with Toll-like receptors that participate in the innate immune response. IL-8 has two main functions consisting of inducing the migration of neutrophils to the site of infection and stimulating phagocytosis once they reach the site of infection (see Figure 5).

IL-10 is an anti-inflammatory cytokine produced primarily by monocytes. It negatively regulates the expression of Th1 cytokines, MHC class II antigens, and costimulatory molecules in macrophages. It also improves the survival and proliferation of B cells and the production of antibodies. Furthermore, IL-10 predominantly inhibits pro-inflammatory responses (eg, TNF α and IL-1 β) induced by LPS and other bacterial products (192) (see figure 5).

TNF- α is a pro-inflammatory cytokine involved in the recruitment and stimulation of neutrophils and monocytes. When macrophages detect pathogens, they release TNF- α to alert other cells of the immune system and other tissues, causing inflammation. TNF- α participates in systemic inflammation and is one of the cytokines that initiate the acute phase reaction. TNF- α is produced primarily by activated macrophages, although it can be produced by many other cell types, such as T helper cells, NK cells, neutrophils, and mast cells (see Figure 5).

The results shown in Figure 20 indicate that patients with septic shock have higher levels of pro-inflammatory IL-6, IL-8 and anti-inflammatory IL-10 than the control group, the group of non-septic ICU patients and the septic patients. However, the patients with septic shock did not overexpress TNF- α compared to both control groups, although the levels were higher in septic shock compared to sepsis. Furthermore, septic patients also showed elevated levels of IL-8 and IL-10, compared to the control group, and lower levels of TNF- α compared to the non-septic ICU group. These results, together with immune cell subsets, suggest that the main source of TNF- α may be neutrophils in septic shock.

Interestingly, we found that the molecules that activate macrophages and NK cells are overexpressed in patients with septic shock and the reagents produced by monocytes and neutrophils were strongly activated in patients with septic shock. However, the phagocyte system in the innate system appears to be diminished in contrast to neutrophils, as inferred from the analysis of subsets of immune cells.

8.5.13. Chemotactic cytokines are overexpressed in the plasma of patients with septic shock, altering the endothelium-mediated immune response

Chemotactic cytokines control the migration and positioning of immune cells in tissues and are key elements in the proper function of the innate immune system (193). Among chemokines, GM-CSF is a glycoprotein secreted by macrophages, T cells, mast cells, and NK cells. It stimulates stem cells to produce granulocytes (that is, neutrophils, eosinophils, and basophils) and monocytes. Furthermore, GM-CSF enhances neutrophil migration and causes an alteration of receptors expressed on the surface of cells. On the other hand, Macrophage Inflammatory Proteins (MIP) are chemokines, whose most

relevant forms in humans are MIP-1 α and MIP-1 β . Both MIP-1 α and MIP-1 β are factors mainly produced by macrophages and monocytes after being stimulated with bacterial endotoxin (194) or pro-inflammatory cytokines such as IL-1 α and IL-1 β (195). The main role of these chemokines occurs in chemotaxis and transendothelial migration. These chemokines affect monocytes, T lymphocytes, dendritic cells, NK cells, and platelets (195). MIPs also activate human granulocytes that can cause acute neutrophilic inflammation and induce the synthesis and release of other pro-inflammatory cytokines such as IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and TNF- α from fibroblasts and macrophages. Furthermore, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1 / CCL2) is a chemokine that regulates monocyte / macrophage migration and infiltration (196).

The results shown in Figure 21 indicate that patients with septic shock have the highest levels of chemotactic cytokines (GM-CSF, MIP-1 α and MIP-1 β and MCP-1) compared to the control group, ICU and sepsis.

Neutrophils and monocytes migrate to extravascular areas of infection by binding to endothelial adhesion molecules and in response to chemotactic mediators, as previously described. Among the wide variety of cytokines, two of them, IL-1 and TNF- α , are of special importance for endothelial activation. Both activate the endothelium and initiate the migration of leukocytes, including neutrophils, into the tissues (197). In response to IL-1 and TNF- α , endothelial cells express e-SEL, which enables leukocyte rolling. In turn, other stimuli, such as thrombin, produce a rapid translocation of p-SEL to the endothelial surface and platelets. Neutrophils and monocytes are anchored to the endothelium through binding to selectins, allowing them to roll onto the endothelium (198,199). Likewise, the activation of the endothelium by IL-1 and TNF- α also induces the expression of strong adhesion molecules such as I-CAM1, which stops the rolling of leukocytes once they reach the site of infection (199).

The results presented in Figure 21 indicate that the SS group showed the highest plasma levels of E-selectin and I-CAM1 compared to the control, ICU, and sepsis groups. In combination with the proportions of immune cell subsets, these results suggest that the most stimulated response in SS patients is mediated by neutrophils, which promotes neutrophilic inflammation in the endothelium, as both chemotactic cytokines and endothelial adhesion molecules increased in these patients.

8.5.14. The adaptive immune response is not fully functional in the early hours of the development of septic shock.

IL-4 is a cytokine produced by activated T-type 2 (Th2) cells, basophils, mast cells, and eosinophils. It acts as an anti-inflammatory cytokine, by blocking the synthesis of IL-1, TNF- α , IL-6 and MIP-1. In addition, IL-4 promotes the differentiation of Th2 lymphocytes, and the proliferation and differentiation of B lymphocytes (200,201).

IL-13 is a cytokine, produced mainly by Th2 cells, which plays a fundamental role in regulating the function of monocytes and B cells. IL-13 is produced by T lymphocytes, it modulates protein production IL-1, TNF, IL-8 and MIP-1, stimulate the growth and differentiation of B cells and inhibit Th1 cells (202).

IP-10, also known as C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10) is secreted by various cell types in response to IFN- γ by monocytes. IP-10 participates in the innate and adaptive immune response because it contributes to the chemoattraction of monocytes / macrophages, T cells, NK cells and dendritic cells and promotes the adhesion of T cells to endothelial cells (193,203).

IL-27 has a pronounced pro-inflammatory and anti-inflammatory effect and is produced by antigen-presenting cells. IL-27 plays an important role by positively regulating the activity of T and B lymphocytes, and also innate immune cells, which are negatively regulated by IL-27. IL-27 synergizes with IL-12 to promote IFN- γ production by CD4, CD8, and NK T cells (204–206). IL-27 has also been identified as an early initiator of Th1 differentiation and inhibits the differentiation of Th17 cells (207–209).

The results presented in Figure 22 show no differences in IL-4 and IL-13 levels in SS patients compared to the control, ICU, and sepsis groups. Regarding IL-27, the SS group showed lower levels of circulating IL-27 than the ICU and sepsis groups. The SS group had the highest plasma levels of IP-10 among all the groups studied. Interestingly, the non-septic ICU patients showed higher plasma levels of IL-13 and IL-27 than the sepsis and SS groups. These results suggest that IL-27 plays a central role in modulating the immune response by promoting T cell differentiation and neutrophil function, which may contribute to immunosuppression in SS patients.

8.5.15. Immunomodulators are strongly overexpressed in patients with septic shock

IL-17 is a pro-inflammatory cytokine produced by helper T cells 17. IL-17 induces the production of many other cytokines (such as IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , TGF- β , TNF- α) and chemokines (including IL-8, GRO- α , and MCP-1) (210) with the goal of increasing inflammation, bone marrow generation of granulocytes, and attracting leukocytes to the site of infection (210-212).

S100A8 and S100A9 are calcium and zinc binding heterodimeric proteins that play a prominent role in the regulation of inflammatory processes and the immune response (213,214), capable of inducing chemotaxis and neutrophil adhesion. Its extracellular functions include pro-inflammatory, antimicrobial, oxidant-scavenging, and apoptosis-inducing activities. Its pro-inflammatory activity includes leukocyte recruitment, promotion of cytokine and chemokine production, and regulation of leukocyte adhesion and migration.

Our results showed the highest levels of IL-17A, S100A8, and S100A9 in the group of SS patients compared to healthy control subjects and ICU patients and septic patients (Figure 23). The overexpression of these factors related to the increase of this cell subset may contribute to neutrophilic inflammation in patients with SS.

8.5.16. Correlations between different cytokines and immune mediators

A series of correlation analyzes between clinical parameters and the aforementioned cytokines and immune mediators that are relevant to sepsis and the immune response in SS were studied. Pearson's correlation coefficient was calculated for cytokines, immune mediators, and clinical parameters in cases (including patients with sepsis and SS) and controls (including healthy subjects and ICU patients). Statistical values (p-value and correlation coefficient) are shown in Table 7 and Table 8, respectively. Hierarchical grouping was performed using the complete linkage method to group the analyzed variables and identify groups of cytokines, endothelial mediators, and clinical characteristics with a strong positive correlation (Figure 24).

Several positive correlations were found between the clinical characteristics of severity and the markers with the different cytokines and immune mediators. In this sense, APACHE and SOFA scores and lactate levels showed a positive correlation with the pyroptotic cytokine IL-1 α (p-value 0.0024, 0.0038 and 0.0230, respectively) and with the pro-inflammatory cytokine IL- 6 (p-value 0.0026, 0.189 and 0.0085, respectively). Importantly, the relationship between these variables was clearly identified in a hierarchical group in Figure 24. Regarding pyroptotic cytokines, IL-18 was also found to form a hierarchical group with the endothelial adhesion molecule I-CAM1 (p-value 0.031) and E- selectin (p-value 0.021, correlation coefficient with ICAM-1), which suggests a strong relationship between pyroptosis and endothelial function, as is also demonstrated by the positive correlation between IL- 18 and dimer D (DD) (p-value 0.007). Thus, endothelial dysfunction may contribute to coagulation and thrombus formation, in which DD and activated partial thromboplastin time (APTT) are important markers of coagulation. In the same group, we also found a strong positive correlation with the anti-inflammatory cytokines IL-10 and DD (p-value 0.001), suggesting that pyroptotic inflammation and the release of anti-inflammatory cytokines may occur simultaneously and be related to a pro phenotype. -coagulation.

We also found a group consisting of lactate, P-selectin and S100A8. P-selectin showed an important correlation with S100A8 (p-value $6.07 \cdot 10^{-5}$) and lactate levels (p-value 0.0022). This group seems interesting because, as described above, S100A8 can promote apoptosis and thus contribute to increased lactate levels. Additionally, the endothelium can also release S100A8 that promotes pro-inflammatory activity, a process that is also facilitated by P-selectin on the surface of platelets and endothelium, which may further contribute to coagulation (215,216). A small group consisted of IL-12, IL-27 and the clotting time test (Quick Index, also described as thromboplastin time). IL-27 and IL-12 showed a good correlation (p-value 0.0001), which can be explained by both pro-inflammatory interleukins belonging to the same family. The close relationship of IL-12, IL-27, and the rapid index may be a consequence of the relationship between these cytokines and thrombin levels (217,218). Finally, IL-4 showed a good correlation with IL-17A (p-value 0.0024), suggesting that IL-4 derived from Th2 and IL-17A derived from Th17 provide a chronic inflammatory environment in critically ill patients. sick. GM-CSF was included in the same group since both T

cells, Th2 and Th17, can release this factor which is responsible for stimulating stem cells to produce granulocytes such as neutrophils and monocytes.

8.5.17. Leukocytes from septic patients have altered DNA methylation profiles

DNA methylation analysis was performed with samples obtained during the first 6 h after admission to the ICU. The Limma analysis obtained 68,738 differentially methylated CpGs when SS was compared with ICU control patients (38,276 hypermethylated CpGs and 30,462 hypomethylated CpGs), 3 CpG when we compared sepsis patients with ICU controls and 6 CpG when we compared the methylation pattern of SS patients versus sepsis patients. The principal component analysis was generated from the general description of the different samples and differentially methylated CpG, between patients with sepsis, septic shock, and critically ill patients admitted to the ICU (Figure 25A). Figure 25A shows global differences in CpGs between the three groups of patients, clearly identified by PCA. SS patients were classified as a separate group from ICU patients and septic patients, except for sample 56A (Figure 25A). Septic patients were also grouped separately to subjects used as ICU and SS controls, although sample 73A was close to patients with septic shock.

Likewise, using the *limma* approach, we created an unsupervised histogram of DNA methylation to show the 100 methylated CpG (beta values) with the most significant differential methylation between the patients, demonstrating that the groups showed a differential methylation signature according to the state. of their disease (Figure 25B).

In addition to evaluating differentially methylated CpG sites, we also explored differentially methylated regions (DMR) (21) between the different groups. We performed the mCSEA analysis to identify DMRs in our patient cohort (16). Results showed up to 1,619 DMRs (801 promoters and 926 genes) in SS compared to non-septic patients (ICU controls), 245 DMR in sepsis compared to non-septic patients (ICU control) (102 promoters and 148 genes), and finally 1,464 DMRs in sepsis compared to SS (821 promoters and 732 genes). These results indicated that the SS condition produced the highest changes in the DNA methylation profile. Also, we analyze our data using DMRCate. This package extracts the most differential methylation regions (DMRs) from the EPIC850K BeadChip arrays. DMR refers to a genomic region with

multiple adjacent CpG sites that exhibit different methylation states between multiple samples. DMRs are gaining relevance as one of the most important methylation variants in the epigenetic study in populations; in fact, changes in the methylation profile of DMRs have been described in several contexts, including specific imprinting functions, specific to tissue, reprogramming-specific, cancer-specific, and aging-specific (219). Using the analytical approach based on the DMRcate bioinformatics tool, he obtained 8,373 regions that included genes and promoters for the comparison of SS with the ICU control for which the *limma* bioinformatics tool produced many differential CpG sites. 4,378 of these regions were hypomethylated in SS samples, while 3,995 DMR were found to be hypermethylated. Also, up to 609 had a beta difference of greater than 15%.

8.5.18. Organ dysfunction and lactate levels are associated with changes in DNA methylation

Subsequently, DNA methylation profiles were analyzed in relation to the SOFA scale, the main score used to evaluate organ dysfunction. The results showed that changes in DNA methylation were associated with changes in the SOFA score, in fact, the DNA methylation patterns of the 6,657 CpGs were found to be differentially hypermethylated ($p > 0.01$) and they were able to classify the different groups. of patients according to the SOFA score (Figure 26A).

Likewise, we also performed an analysis of DNA methylation in comparison with lactate levels since lactate levels greater than 2mmol / L (> 18 mg / dL) is a key parameter to classify patients with SS (22). The results showed that DNA methylation changes were correlated with lactate levels. Furthermore, the 6,657 differentially hypermethylated CpGs ($p > 0.01$) classified SS patients according to lactate levels. However, DNA methylation patterns did not allow classifying septic patients according to lactate levels, because the methylation status in sepsis and ICU patients showed a similar pattern. This analysis suggested that DNA methylation changes associated with organic damage imply similar DNA methylation changes, being more prevalent in SS patients, which is in line with established classification guidelines (22), since Septic patients do not have elevated lactate levels, unlike SS patients (Figure 26).

8.5.19. Functional and biological implications of DNA methylation changes that occur in patients with sepsis and septic shock

To address the functional implications of DMRs, we used the analytical approach based on the mCSEA bioniformatic tool to identify the key biological processes underlying sepsis and septic shock. Enrichment analysis of sets of regions by mCSEA revealed molecular (Figure 27A) and biological processes of KEGG (Figure 27B) related to the inflammatory response and the immune system. Of particular interest were the KEGG pathways related to the cytokine-cytokine receptor interaction in the SS compared to ICU controls and the T cell receptor signaling pathway and the differentiation of Th17 cells in sepsis compared to the ICU controls (Figure 26A). Interestingly, when we explore the biological processes of genetic ontology (Figure 26B), we find a series of molecular pathways with DMRs in both genes and promoters, such as T cell activation, lymphocyte differentiation, neutrophil activation and degranulation, positive regulation in the production of cytokines and regulation of the inflammatory response, among others, in the comparisons between the three groups of subjects studied.

The enrichment analysis was also performed on the set of DMR obtained from the comparison of the SS group with the ICU control group by using the DMRcate bionformatic analysis tool (Figure 28), and the following significant categories were found in the Gene ontology: neutrophil-mediated immunity, T-cell activation, leukocyte cell-cell adhesion, response to molecules of bacterial origin, regulation of cysteine-like endopeptidase activity involved in the apoptotic process, regulation of the innate immune response and regulation positive activity of the transcription factor NF-kappaB. In this sense, the KEGG pathways that result from the enrichment of this set of DMRs were: T cell receptor signaling pathway, PD-L1 expression and the PD-1 checkpoint pathway, receptor signaling pathway. of lectin type C, TNF signaling pathway, increased NK cell activity, NF-kappa B signaling pathway, Th1 and Th2 cell differentiation, Th17 cell differentiation, hematopoietic cell lineage, and cytokine-cytokine receptor interaction. Genes associated with GO terms and KEGG pathways are shown in the genetic concept networks (cnetplot) in Figure 28.

8.5.20. Hypomethylation and hypermethylation occur in DMR in the SS process

The number of regions that coincided between both sets of DMRs (generated using mCSEA and DMRCate) were 1,256, of which 798 were hypomethylated and 458 hypermethylated (Figure 29A). The top 10 GO terms associated with hypomethylated regions of this DMR pool were neutrophil-mediated immunity, up-regulation of cytokine production, up-regulation of cell adhesion, regulation of interleukin-6 production, regulation of TNF production, , production of interferon gamma, response to the molecule of bacterial origin and regulation of hematopoiesis; while the enriched terms in the hypermethylated regions were T-cell activation, lymphocyte differentiation, cell surface receptor signaling pathway that activates the immune response, cell-cell adhesion through adhesion molecules to the plasma membrane (i.e., protocadherins), antigen receptor-mediated signaling pathway, and NK cell-mediated immunity (Figure 29B).

Furthermore, we also represented the results in concept gene networks that revealed the link of GO terms with DNA methylation changes in specific genes involved in the immune system. In this sense, when inspecting individual genes with significant differential methylation, we found that *IL10*, *IL27*, *IL1B*, *IRAK3*, *CSF3*, *IFNGR2*, *S100A8* and *S100A9* were hypomethylated and *TNFAIP8* hypermethylated. Previous studies revealed that these genes were associated with sepsis and have been linked in this study to relevant biological processes involved in the immune response during sepsis, which can lead to a dysregulated immune response (Figure 29C).

We found that several genes that showed differential methylation are related to inflammatory and immune responses (Table 9) and some of these genes correlate with those previously identified by Severino P, *et al.*, And Lu X, *et al.*, (220,221). Subsequently, we look for DMRs in regions that can potentially regulate the expression of those genes found in the relevant promoters or regulatory regions. Our results demonstrated differentially methylated regions (DMRs) in the different groups of patients analyzed in the promoters of pro-inflammatory cytokines (i.e. *IL1B*, *IL18*, *TNFA* and *IL17A*), pro and anti-inflammatory cytokines (i.e. *IL10*, *IL21*, *IL25*, *IL27*, *IL31*, *IL32*, *TGFB* and *IFNG*) and immunosuppression mediators such as the *IL10* superfamily member, *IL24*, (222) *S100A8* and *S100A9*. In Figure 29D we show the

methylation differences in pro-inflammatory genes and the differences in the methylation of promoters of anti-inflammatory and immunosuppressive mediators in the three groups analyzed. Changes in DNA methylation were consistent across all promoter CpG sites in almost all genes analyzed.

Among the interleukins identified with differential methylation, IL-27, which is produced by activated antigen presenting cells (APC) and enhances pro-inflammatory responses that can occur during bacterial infections by regulating the expression and function of TLR4 (223), showed large differences in methylation between groups, being hypomethylated in septic processes and in patients with SS. IL-27 showed special importance because this interleukin is involved in the interconnection of innate and adaptive immunity by regulating the differentiation of naïve Th cells into Th1 cells and in the activation of monocytic cells in terms of inflammatory responses (206).

Based on the results obtained, they were selected from the enrichment analysis of genes associated with changes in DNA methylation for annotations involving relevant biological processes and KEGG pathways for the validation of DNA methylation in an independent cohort of subjects. From the different DMR comparisons, we selected functionally relevant candidate genes for further study based on statistical significance (FDR <0.05). The selected genes were involved in the inflammatory response and immunosuppression events and are shown in Table 9.

8.5.21. Validation of DNA methylation patterns by pyrosequencing in critical ICU, sepsis, and SS patients.

To confirm the results obtained in the previous analyzes obtained from the Methylation EPIC850K BeadChip, it was validated by pyrosequencing.

To carry out the validation, the cytokines and immune mediators that showed better expression levels were chosen, as well as those cytokines and immune mediators that showed altered methylation patterns in septic patients, with special emphasis on those molecules that may be playing an important role in immunosuppression.

The results obtained demonstrated that *IL10* was strongly hypomethylated in SS patients, in comparison with septic patients and ICU control patients (Figure 30A). In

fact, although the sepsis patients showed lower levels of methylation in their promoter region than the controls included as ICU patients (25% and 35% respectively), no statistically significant changes were found (p value = 0.3). In turn, SS patients showed methylation levels in the *IL10* promoter region of 15%, and they also did not show statistically significant differences when septic shock patients were compared with septic patients (p value = 0.08). The hypomethylation of *IL10*, especially in the SS patients, was correlated with the results obtained previously, since the IL-10 levels in the SS patients were found to be elevated in relation to the other study groups. Likewise, the levels of the pro-inflammatory cytokines IL-17 and IL-18 did not show changes in the levels of methylation of their gene promoter regions in any of the three groups, despite the changes found in the levels of these circulating cytokines in SS patients (Figure 30B and Figure 30C). Likewise, the methylation of the DMRs identified in the receptor for *IFNG* and *IFGR2*, did not show statistically significant differences either since the three groups showed strong hypomethylation of this region (Figure 30). Finally, in the *TREM2* promoter region, reduced levels of DNA methylation were found, demonstrating hypomethylation in SS and sepsis patients compared to ICU control patients (Figure 30E). However, there were no differences in the methylation of the studied region in SS patients compared to sepsis patients.

8.6. DISCUSSION

8.6.1. Current context of sepsis. Circulating Histones (and Pyroptosis) as key mediators of damage during Sepsis.

Sepsis is a highly prevalent syndrome characterized by a dysregulated host immune response to infection, mediated by an initial hyperinflammatory phase followed by an anti-inflammatory response, which can sometimes coexist and induce, in many cases, permanent immunosuppression. In particular, SS is the worst clinical condition and is characterized by particularly profound circulatory, cellular and metabolic abnormalities, increasing the risk of death.

Circulating blood histones are recognized as DAMPs in sepsis, by inducing cellular toxicity through mechanisms dependent and independent of membrane receptors (103,224). Some previous works by our group have shown how extracellular histones can induce cytotoxic mechanisms such as apoptosis (93), or regulatory mechanisms such as autophagy (96), in a dose-dependent manner, influencing endothelial homeostasis. However, it is unknown whether the activation of endothelial inflammasomes is possible without the intervention of immune cells, not even if endothelial inflammasomes can be activated by histones, as well as the consequences at the endothelial level of this activation, such as endothelial dysfunction or injury. Knowing the role of extracellular histones in the activation of the inflammasome and, later, pyroptosis and endothelial damage, can reveal the complex events that occur in sepsis (Figure 7). In fact, the activation of the NLRP3 inflammasome, oxidative stress and the alteration of redox homeostasis, as well as the expression of antioxidant enzymes, the release of factors and mediators involved in inflammation, endothelial dysfunction and cell death are closely related events. In fact, all these cellular responses contribute to vascular injury, endothelial dysfunction, and overexpression of adhesion molecules, all related to sepsis (225,226).

Previous research has demonstrated ROS-dependent activation of NLRP3 endothelial inflammasomes under hyperglycemic conditions in a mouse vascular endothelial model (227). The authors have proposed that this pyroptosis activation mechanism may initiate endothelial dysfunction (227). Likewise, some authors demonstrated that extracellular histones induce the activation of NLRP3 in immune cells through oxidative stress mechanisms (228) (Figure 7). Similarly, we suggest that dose-dependently induced oxidative stress by extracellular histones activates the endothelial inflammasome, contributing to endothelial dysfunction and cell death.

Oxidative stress is one of the main drivers of inflammation and vice versa, and the latest findings suggest a prominent role for the inflammasome, contributing to endothelium-mediated function and immunity, as oxidative stress can control NLRP3 activation (175,229 –232). In fact, oxidative stress has been shown to induce NLRP3 activation by triggering the deglutathionylation of the ASC protein (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) to promote pyroptosis (233). In addition, it has been described that the glutathionylation of NLRP3 occurs in macrophages (234), and its

deglutathylation was associated with a greater interaction of glutathionylated ASC and therefore in the inactive state, which in turn produces the inhibition of the NLRP3 inflammasome. This finding justifies the need for further related studies, since GSH may by itself limit the activation of the inflammasome. In this sense, recently, Tang et al. demonstrated that exogenous GSH or GSSG strongly inhibited NLRP3 inflammasome activation in vitro and in vivo (235). Similarly, in this study it has been shown that GSH delivery by pre-incubation of HUVEC cells with GSH-EE prevented extracellular histone-triggered pyroptosis cell death. Furthermore, our results showed that histone-mediated oxidative stress is a key player in the activation of pyroptosis in HUVEC cells (Figure 7).

A possible explanation for the mechanism of induction of oxidative stress by extracellular histones is based on the fact that extracellular histones can enter the internal and external mitochondrial membrane of the cell, altering the potential of the mitochondrial membrane, which induces oxidative stress (236). Specifically, this may be due to the alteration of cell permeability as a consequence of the cellular exposure to extracellular histones, which in turn alters the membrane potential of the mitochondria, causing uncoupling of the mitochondrial transport chain and consequently the increase of ROS levels. In this sense, our results agree with the idea that oxidative stress can be produced by the alteration of the membrane potential. In fact, the source of ROS may be a direct consequence of the destabilization of the outer and inner membranes in the mitochondria produced by extracellular histones (236). In our model, oxidative stress was produced mainly by hydrogen peroxide (H_2O_2), since H_2O_2 has demonstrated its ability to produce carbonylated proteins (237) and generate the hyperoxidated form of Prdx6 (238). Furthermore, our results suggest that antioxidant defense is not sufficient to attenuate histone-mediated oxidative stress, since the exposure of HUVEC to extracellular histones causes an antioxidant response, raising the gene and protein levels of the main antioxidant enzymes (SOD-1, SOD-2, CAT and GPX-1), although nevertheless, they are not capable of attenuating the levels of oxidative stress since the analysis showed high levels of carbonylated proteins and a strong expression of oxidized peroxiredoxin-6.

Interestingly, neutrophil pyroptosis is gaining relevance in sepsis (239). However, pyroptosis in endothelial cells has not yet been described in sepsis. Therefore, here we

describe a new pathway in which extracellular histones regulate NLRP3 inflammasome activation in human endothelial cells. In this sense, our results demonstrated that native extracellular histones mainly induce pyroptosis and, to a lesser extent, apoptosis. Activation of the inflammasome NLRP3 induces the production of IL-1 β and IL-18, promoting many metabolic, physiological, inflammatory, hematological, and immunological effects (229) (Fig7). In fact, IL-1 β is known to increase prostanoid generation, and in mouse models lacking COX-2, IL-18 production has been shown to be defective (240). These scenarios suggest an interconnection between the inflammasome and the prostanoid biosynthesis pathway. Furthermore, IL-1 α , a product released in non-canonical pyroptosis, induces the expression of COX genes (241), which links the role of cytokines released by pyroptosis with endothelial homeostasis. Our results are consistent with those previously described by demonstrating that extracellular histones above 50 μ g / mL mediate overexpression of the *IL1B*, *IL18* and *IL1A* genes and, in turn, *COX1* and *COX2*.

8.6.1. Role of the endothelium in the context of sepsis

Sepsis alters vasoconstriction by modulating prostanoid levels (242). In this sense, the NLRP3 inflammasome activates PGE2 through IL-1 β / IL-1R signaling (243). The COX-2-dependent generation of prostanoids in endothelial cells plays an important role in vascular function, which are deregulated during sepsis and SS (244). Our results reinforce the notion that extracellular histones alter vascular homeostasis by modifying the PGIS / TBXAS ratio and affecting eNOS expression, which in turn alters NO production. This alteration in vascular homeostasis has direct consequences on the dilation of blood vessels since these mediators act on smooth muscle cells and inhibit platelet aggregation and leukocyte adhesion (245).

In response to IL-1 (IL-1 α and IL-1 β), endothelial cells express eSEL (246). Neutrophils and monocytes anchor to the endothelium through eSEL to contribute to the immune response (leukocyte migration). In addition, the expression of IL1 and, in turn, IL6, stimulates the expression of the tightly bound endothelial ligands, ICAM-1 and VCAM-1, which contributes to stopping the rolling movement of the leukocyte in the endothelium, allowing it to perform its function in the site of inflammation (247,248). Activation of the NLRP3 inflammasome mediates up-regulation of endothelial adhesion

molecules, which are induced by ROS and IL-1 β (249,250). These results are consistent with molecular processes with well-recognized endothelial dysfunction characteristics that contribute to the phenotype of severe sepsis (251). Furthermore, ICAM-1 and VCAM-1 are key players in neutrophil adhesion, transcellular migration, and organ damage during sepsis and SS, and their overexpression is a common feature in sepsis (185,252,253). Our findings are consistent with these results and demonstrate that extracellular histones increase the expression of adhesion molecules in HUVEC, their overexpression being less pronounced when HUVEC were treated with hyperacetylated histones.

Furthermore, IL-1 β mediated cleavage by caspase-1 activation is related to platelet activation, aggregation, and thrombus formation, contributing to hemostatic abnormalities in sepsis and SS (254). To clarify the role of extracellular histone-mediated inflammasome activation, we inhibited the NLRP3 inflammasome in HUVEC by using the specific inhibitor MCC950. Our results showed better cell viability and an improvement in endothelial function and restored the levels of pro-inflammatory mediators and endothelial adhesion factors. Perera et al., (255) have described how MCC950 decreases the activation of caspase-1 and reduces the release of IL-1 β , IL-18, IL-1 α and NO in colon explants. Therefore, we propose that the NLRP3 inflammasome is also a key mediator in endothelial activation by extracellular histones (Figure 7).

To demonstrate that pyroptosis occurs in SS patients when high levels of circulating histones were present in the blood, we analyzed the circulating levels of caspase-1 and pyroptotic cytokines. Our results confirmed that pyroptosis occurs in patients with SS, in whom high levels of IL-18 and IL-1 α were found. We observed a positive correlation between caspase-1, IL-1 α , IL-18 and the levels of circulating histones, which fell within the range of the levels previously published by us and other authors (94,105,256). As described above, pyroptotic cytokines mediate overexpression and release of endothelial adhesion molecules, as we observed in plasma from SS patients. Our results indicate the role of circulating histones in mediating pyroptosis and endothelial dysfunction, thus contributing to the severity of sepsis since circulating histone levels showed a positive correlation with the severity of the patients according to the SOFA scale and the lactate levels, and with the expression of other pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and

IL-8. Furthermore, we found high plasma levels of two key endothelial mediators, e-SEL and sICAM1, which are related to pyroptotic mediators such as IL-1 and IL-18 and circulating histones and showed higher levels in SS patients. Therefore, we suggest that blocking upstream activation of the NLRP3 inflammasome mediated by circulating histones may lay the groundwork for a feasible therapy. Indeed, our in vitro studies demonstrated that by blocking the NLRP3 inflammasome with MCC950, it was possible to modulate extracellular histone-mediated endothelial activation.

8.6.3. Role of acetylation as a post-translational modification of histones

On the other hand, to our knowledge, no one has previously analyzed the effect of post-translational modifications of histones on cellular cytotoxicity. In addition to analyzing the role of circulating histones in mediating endothelial cell dysfunction and pyroptosis, the effect of post-translational modifications on post-translational histones was evaluated. Our results demonstrated that hyperacetylated extracellular histones were found to be less cytotoxic because they were not capable of inducing pyroptosis and therefore induced less endothelial damage than native purified histones. Therefore, although hyperacetylated extracellular histones can also activate the NLRP3 inflammasome, their effect on pyroptotic cytokine release was less pronounced than that caused by native histones.

Some authors have speculated on the importance of the positive charge of histones in mediating all these events, considering that negatively charged agents can attenuate histone-mediated effects by neutralizing the positive charge of histone tails (257). In fact, recent discoveries by Meara and his collaborators have shown how polyanions can neutralize the pathological effects of histones (258), demonstrating the fundamental role of electrical charge in the cytotoxic mediation of histones, and therefore, in the molecular mechanisms they activate. In this regard, we propose that hyperacetylation of lysines with positive histone charge may contribute to the lower cytotoxic activity of extracellular histones in endothelial cells. Consequently, new therapeutic strategies should be implemented in sepsis in view of the current situation. In this sense, blocking mechanisms stimulated by circulating histones such as pyroptosis or elimination of extracellular histones, or even the use of histone deacetylase inhibitors to reduce cellular cytotoxicity mediated by circulating histones, are feasible therapeutic strategies for the

treatment of sepsis. In fact, the simultaneous blocking of NLRP3 and increased histone hyperacetylation may be a promising strategy. This is consistent with recent results describing a new generation of HDACi that has demonstrated its potential to inhibit the NLRP3 inflammasome (259).

8.6.4. The immune system during the pathophysiology of sepsis

However, in addition to the key role that the endothelium plays in the development of sepsis, the immune system is perhaps even more important, since it is ultimately the one that generates the patient's response to the invading pathogen, and the dysregulation of the immune system is one of the main effectors in the development of sepsis, in addition to immunosuppression being the most common morbidity, since 40% of patients who survive sepsis end up developing immunosuppression, which increases the risk of death (121). In this sense, the characterization of the innate and adaptive immune responses mediated in septic and SS patients can reveal the complex events that occur in sepsis and will help to develop new therapies to improve the diagnosis, prognosis and treatment of sepsis (133).

As previously mentioned, our results indicate that pyroptosis is active in patients with SS, which demonstrates an intense host response to infection in this pathological condition. In particular, we propose neutrophils as the main source of pyroptotic cytokines in patients with SS, since neutrophils are the most abundant immune cell type, supported by the rest of leukocytes, mainly macrophages, and in view of the findings shown in this thesis, regulated by the endothelium. These findings may reinforce the idea that neutrophils can act as a double-edged sword in severe sepsis (239,260), particularly in SS (severe phenotypes).

It is noteworthy that, when analyzing the different clinical correlations of the different cytokines and immune mediators analyzed, the pyroptotic cytokine IL-1 \square was correlated with the scores on the APACHE and SOFA scales. Likewise, lactate levels, as well as IL-18, were positively correlated with IL-1 α levels, indicating that patients with high levels of these mediators present serious clinical phenotypes and tend to have a poor prognosis. Similarly, IL-18 was positively correlated with I-CAM1, indicating that the induction of pyroptosis activates the endothelium to facilitate leukocyte

migration through the endothelium. Interestingly, we found several functional groups that denote high levels of pyroptotic cytokines and their positive correlation with endothelial mediators such as I-CAM1 and E-selectin, indicating that pyroptotic cytokines contribute to a systemic hyperinflammatory state and endothelial activation (Table 7 and Table 8). Likewise, the levels of IL-18 were correlated with the levels of the chemoattractant protein of monocytes 1 (MCP-1, also called CCL2), as well as a positive correlation of IL-18 with the inflammatory protein of macrophages-1 β (MIP-1 β , also called CCL4), indicating that pyroptosis also plays a role in macrophage response, as previously proposed by other authors (261). In addition, IL-18 was also included in the same group and was correlated with DD, APTT and the Quick index, confirming that pyroptosis participates as a mechanism in the worsening of septic patients by contributing to clotting and thrombus formation, as previously described (262,263).

Our results indicate that pyroptosis is an important player in the orchestration of the innate immune response at least in the early stages of the sepsis episode, contributing to some of the adverse phenotypes that occur during the evolution of sepsis (Figure 8). Likewise, IL-17A is produced by Th17 cells and induces the release of many cytokines and chemokines (264). Furthermore, IL-17A also induces the expression of TNF- α in macrophages (265). Our results showed that IL-17A is expressed in large quantities during the early stages of sepsis, specifically in patients with SS, who showed the highest circulating levels of this cytokine. Furthermore, IL-17A showed a strong positive correlation with TNF- α and IFN- α , as well as with the mediators IL-12, GM-CSF and MIP-1A (Table 7 and Table 8). These results demonstrate that IL-17A plays a prominent role in macrophage activation and function and neutrophil-mediated immunity by stimulating the production in neutrophils of pro-inflammatory molecules, including TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , and IL-8 (266). Likewise, one of the most important inhibitors of the differentiation and development of Th17 cells is IL-27, which showed reduced levels in patients with SS. Importantly, IL-27 positively regulates innate and adaptive immune responses and negatively modulates immune responses that contribute to immunosuppression. Furthermore, IL-27 negatively regulates the recruitment of neutrophils at the site of infection and its down-regulation has been shown to increase neutrophil levels (267). Regarding the IP-10 protein, which is expressed at high levels

in patients with SS, this chemokine has been shown to help recruit immunosuppressive CD4 C / CD8 effector T cells that express CXCR3 (the cognate receptor) and T cells regulatory (Treg). Thus, CXCR3 can inhibit adaptive immune responses (via effector T cells and NK cells) (268). Therefore, the down-regulation that we found of IL-27 and the high levels of IP-10 suggest that immunosuppressive mechanisms are active in patients with SS.

Regarding IFN- α and IL-12, both proteins play a key role in the innate immune response by activating macrophages and NK cells as previously described. In fact, IFN- α is released by activated NK cells, which stimulate macrophages (269). As a result, activated macrophages release IL-12, which, in turn, enhances the response of NK cells by secreting more IFN- α , thus creating a powerful positive feedback on early immune response (203). Our results showed that pro-inflammatory IL-12 was overexpressed in SS patients. In addition, IL-12 also showed a positive correlation with pro-inflammatory IL-8 and anti-inflammatory IL-10, indicating that SIRS and CARS are simultaneously active in septic patients, as our research group and other authors show. we have previously proposed (133,270). Interestingly, IL-12 also showed a positive correlation with S100A9, a protein that plays a prominent role in the regulation of inflammatory processes and the immune response (271) by extracellular amplification of TLR-mediated responses. Likewise, we also found a positive correlation between IFN- α and IFN- γ with the aforementioned macrophage-related proteins, as well as with IL-8 and IL-10, supporting the idea that macrophages and NK lymphocytes are strongly active during sepsis.

Regarding the immune function mediated by the endothelium, some proteins are involved with macrophages and transendothelial migration such as GM-CSF, which is responsible for stimulating stem cells to produce granulocytes such as neutrophils and monocytes, and chemotactic cytokines such as MIP- 1 α and MIP-1 β and MCP-1, involved in the infiltration of monocytes / macrophages through the endothelium. Interestingly, all these proteins were highly expressed in SS patients, indicating that transendothelial migration of macrophages and neutrophils must be occurring in the most severely ill patients and could explain, at least in part, some of the associated adverse phenotypes. Our results evaluating the neutrophil / lymphocyte ratio (NLR ratio) in immune cell subsets suggest that the most stimulated response in SS patients,

in the early stages of the disease, is mediated by neutrophils, resulting in the more abundant subpopulation and thus promotes neutrophilic inflammation which, in turn, may stimulate the production of pyroptotic IL-1 α and IL-1 β and pro-inflammatory IL-6 in patients with SS (239). However, transendothelial migration ultimately depends on the binding of neutrophils and monocytes to the endothelium through E-selectin and I-CAM (Figure 8). One of the most significant clusters that we found was formed by factors related to coagulation, endothelial mediators, pyroptotic cytokines such as IL-18 and anti-inflammatory cytokines such as IL-10 (Figure 7). Interestingly, while E-selectin allows weak binding of leukocytes to the endothelium and thus their displacement towards the site of infection, I-CAM induces strong binding, keeping leukocytes at the site of infection to ensure that they perform their function (272,273). In addition, P-selectin is rapidly expressed in response to thrombin and therefore participates in thrombus formation and platelet aggregation (274). In this sense, our results show that septic patients have the highest levels of E-selectin, which supports the idea that the endothelium collaborates with the immune response against infection (Figure 8). In addition, circulating levels of E-selectin were also correlated with the most severe phenotypes and death of septic patients, concluding that high circulating levels of E-selectin are associated with severe endothelial damage and therefore levels E-selectin can be considered a feasible biomarker for the prognosis of sepsis. Importantly, SS patients also showed high levels of I-CAM1, which were also correlated with a poor prognosis, thus confirming endothelial damage and postulating I-CAM1, alone or in combination with E-selectin, as candidate biomarkers for the prognosis of sepsis. Specifically, I-CAM1 is positively correlated with the score obtained on the APACHE and SOFA scales. Similarly, P-selectin has been proposed as a central mediator of platelet aggregation and thrombus formation in sepsis (275). On the other hand, the results obtained showed that lactate was strongly correlated with the immune mediator S100A8. This correlation is interesting because, as described above, S100A8 has apoptosis inducing activities and therefore increases lactate levels. Furthermore, S100A8 produced by neutrophils can also promote coagulation through a mechanism that involves activation of platelets (276,277), a process that is also facilitated by the expression of P-selectin on the surface of platelets. Our results showed differences in P-selectin levels when comparing sepsis and SS with the group of ICU patients, indicating that septic and SS patients could present an increase in platelet

aggregation. In agreement with this, E-selectin levels were correlated with APTT, as occurred for i-CAM1, DD and the Quick index, concluding that the endothelium plays an important role in coagulation in patients with SS.

Regarding the adaptive immune response, the interleukins IL-4 and IL-13 were also analyzed. These cytokines were found in the same group together with IL-17A and GM-CSF. Overexpression of these proteins bound to MIP-1 α (also called CCL3) and IFN- γ suggests activation of macrophages. IL-4 is produced by activated Th2 cells and together with IL-17A produced by Th17 cells provides a chronic inflammatory environment in critically ill patients. Interestingly, IL-4 can act as an anti-inflammatory molecule by blocking the synthesis of the proteins IL-1, TNF- α , IL-6, and MIP-1 (278). Similarly, IL-13 is produced by T lymphocytes and plays a fundamental role in regulating the function of monocytes and B cells by modulating the production of IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-8 and MIP-1 (279). Furthermore, IL-4 stimulates the growth and differentiation of B cells and inhibits Th1 cells and the production of inflammatory cytokines (280). Our results showed that SS patients did not show differences in circulating levels of interleukins IL-4 and IL-13 compared to other groups of patients, suggesting that, on the one hand, these cytokines are not inhibiting expression of IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and MIP-1, while, on the other hand, T lymphocytes may not be fully activated in this group of patients (Figure 8).

8.6.5. DNA methylation as a modulator of the immune response and immunosuppression during sepsis

In any case, understanding sepsis requires a deep understanding of physiology, pathology, metabolism, biochemistry, immunology, and epigenetics. In this sense, to characterize the molecular mechanisms that guide the immune response that we observe in septic patients, we proceeded to analyze DNA methylation patterns since it has been widely demonstrated that DNA methylation is one of the processes most important epigenetic mechanisms in gene expression (281). In particular, exploring DNA methylation in immune cells can help to understand the relationship between epigenetics and immunometabolism, thus helping to elucidate the intricate mechanisms involved in immunosuppression and, in turn, help to predict future comorbidities (133,282).

It is noteworthy sepsis promotes immunosuppression (45) and simultaneously with the initial phase of the hyperinflammatory response, a compensatory anti-inflammatory response syndrome, known as CARS, occurs. CARS induces a failure or exhaustion of the innate and adaptive immune system, thus mediating immunosuppression. Therefore, immunosuppression serves to compensate for the excessive production of proinflammatory cytokines and immunomodulatory chemokines in the host and can last for months and even years (Figure 3).

Several mechanisms involved in immunosuppression have been described, such as changes in the glycolytic metabolism of leukocytes (283), increased apoptosis of immune cells such as macrophages and T lymphocytes (284), alterations in myeloid cell differentiation, increased Treg cells (141,285) and myeloid-derived suppressor cell (MDSC) proliferation (286). However, although some mechanisms have been related to immunosuppression, future efforts are needed to further characterize the mechanisms of immunosuppression and to develop diagnostic tools and therapies for the long-term survival of immunosuppressed patients.

Therefore, to characterize the mechanisms which can modify gene expression patterns are of particular interest both for research and for the clinic, as possible mediators of the immunosuppressive phenotype after sepsis and SS. In this sense, epigenetics appears as a potential tool to identify new mechanisms and molecular pathways affected during sepsis and to develop new diagnostic and prognostic tools to identify immunosuppressed patients and predict future morbidities.

The results obtained demonstrated changes in DNA methylation in genes related to the immune response and inflammatory signaling pathways. These are of special importance because we found that these genes were up-regulated in SS patients, similar to those found in severe sepsis, previously described by Severino *et al.* (220) and more recently by Lu *et al.* (221) using differential gene expression data in patients with sepsis caused by gram-negative bacteria and healthy individuals (accession number: GSE69528) (287) (accession number: GSE46955) (288), downloaded from the Gene database Expression Omnibus. Therefore, our results agree with those previously described by Severino *et al.* and Lu *et al.* in which genes such as *S100A8* or *S100A9* were hypomethylated in sepsis and septic shock and therefore up-regulated under these

conditions (220,221). Related to the SOFA score, our results are in line with the results obtained by Lorente-Sorolla *et al.* (132) and show that the methylation pattern correlated with the SOFA score in ICU, sepsis and SS patients. In the same way, DNA methylation status was also correlated with lactate levels in SS patients, demonstrating that DNA methylation is playing a key role in immunometabolism during the pathophysiology of sepsis. During primary responses to gram-negative bacteria, macrophages produce pro-inflammatory IL-1 β , IL-18, and TNF α for the elimination of microorganisms. After induction of tolerance to LPS, chromatin in macrophages has been shown to be enriched in repressive histone post-translational modifications (such as H3K9me2) in *IL1B* and *TNFA* promoter regions (289,290). Our results indicate that during the early stages of septic shock (first 24 h after ICU admission) the IL-1 β promoter is hypomethylated compared to critically ill patients with unrelated active septic processes. Regarding the *IL18* promoter that mediates pro-inflammatory states, the DNA methylation pattern showed a hypomethylated state that corresponds to an increase in protein expression in patients with septic shock, as shown by our results. However, the methylation patterns that we obtained for *TNFA* (hypomethylation in the promoter region) were not associated with circulating TNF α levels. In fact, we only obtained statistically significant differences between septic shock patients and septic patients. These results agree with those obtained by Qiu *et al.* which posited TNF α as a key mediator of sepsis severity (291).

The increase in anti-inflammatory cytokines (such as TGF- β and IL-10) and TH2 cytokines opposed to TH1 (such as IL-13) during CARS is helpful in counteracting the pro-inflammatory responses of SIRS (292,293). In addition, the anti-inflammatory cytokine IL-10 inhibits the expression of class II major histocompatibility complex (MHC) proteins (HLA-DR) on the surface of macrophages and monocytes that, in addition to TGF- β , suppress the proliferation of T cells, contributing to immunosuppression during sepsis (294,295). In this sense, it has been shown that HLA-DR expression is suppressed in most patients with early-stage sepsis, but its expression recovers within 10 days in survivors (48). These findings agree with our methylation results that showed a hypermethylation state in the HLA-DMB promoters in SS patients, which contributes to a decrease in the expression of HLA-DMB proteins. Furthermore, IL-10 levels have been shown to positively correlate with the percentage

of Treg cells in the CD4 + T cell population in patients with postoperative infections (296). In our results, we also found that hypomethylation of IL10 correlates with elevated levels of IL-10 in the plasma of septic patients. This is relevant because of the anti-inflammatory role of IL-10 by inhibiting the expression of pro-inflammatory mediators, such as TNF- α and IL-1 β , and by conferring decreased resistance to pathogenic organisms during sepsis (297).

On the other hand, another key factor that contributes to immunosuppression is the proliferation of myeloid cell-derived suppressor cells (MDSC) that perform powerful immunosuppressive functions in cancer (298) and inflammatory diseases (299). In this sense, it has been described that the genes involved in the suppressor functions of the MDSCs, which encode the soluble factors S100A12, S100A8, S100A9, MMP8, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), IL-6, IL -10, vascular endothelial growth factor (VEGF), GFR- α and ARG1, had elevated levels in the peripheral blood of patients with sepsis (54). Our results showed how the promoters of the *S100A8*, *S100A9* and *IL10* genes were hypomethylated in the early stages of sepsis and SS, suggesting that immunosuppression events are occurring concomitantly with the cytokine storm. In addition, we also observed hypomethylation of CSF3, granulocyte colony stimulating factor 3 or G-CSF, which is the main regulator of neutrophil production under basal hematopoiesis conditions and is also essential for granulopoiesis in response to bacterial infections to improve the functions of neutrophils, as well as preventing the overstimulated action of neutrophils during infection (300). T cells induce the production of G-CSF through the release of IL-17, so there is a positive correlation between the expression levels of G-CSF and IL-17 and the hypomethylation detected in both genes CSF3 and IL17 as we also observe in our results. The DNA methylation results obtained are consistent with the results described above, confirming the coexistence of pro-inflammatory and anti-inflammatory responses in the early stages of sepsis and SS. Both the pro-inflammatory and anti-inflammatory responses promote immunosuppression of the patient, making them more susceptible to secondary infections and long-term comorbidities. Importantly, post-septic immunosuppression is not only limited to anti-inflammatory responses during CARS, as septic patients may experience a suppression not only in pro-inflammatory functions in innate immune cells, but also in adaptive immune cells (17, 37,301,302).

Another relevant gene evaluated in our analysis was *IRAK3*, the IL-1 receptor associated kinase M, a protein associated with the immune system that negatively regulates the signaling of Toll-like receptors (TLRs) and mediates critical aspects of innate immunity that result in an immunosuppressed state during sepsis (303). Importantly, *IRAK3* expression is elevated in blood monocytes from patients with sepsis (221,304), and even more so in SS (305). Our results showed that the promoter of the *IRAK3* gene is hypomethylated in sepsis and SS, which contributes to the increase in circulating *IRAK3* in patients with sepsis and SS. Finally, in the analysis of the methylation of the *TREM2* gene, we found hypomethylated levels in its promoter region, which in turn translates into an increase in the expression of this gene. This is especially relevant since TREM-2 protein functions as an immune regulator and has been linked to chronic inflammation by triggering the production of inflammatory cytokines in a constitutive way (306). In particular, TREM-2 triggers the activation of immune responses in macrophages and dendritic cells in response to signaling mediated by TLRs (307). Likewise, TREM-2 suppresses PI3K and NF-kappaB signaling in response to lipopolysaccharide, thus promoting phagocytosis, suppressing the production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide, inhibiting apoptosis and increasing the expression of IL-10 and TGF-β. Furthermore, during oxidative stress, it promotes anti-apoptotic NF-kappa-B signaling and ERK signaling (by similarity) (308). However, TREM-2 not only functions as a regulator of the inflammatory response, but also serves as a phagocytic receptor for bacteria. Specifically, in sepsis, elevated levels of TREM-2 have been found in septic patients (309), and it has been related to the survival of these patients (310), since TREM-2 deficiency restricts the inflammatory response, thus reducing organic damage and mortality. However, high levels of TREM-2 are also related to immunosuppressive phenotypes (311), since it induces the expression of immunosuppressive cytokines such as IL-10 or TFG-α, thus promoting a sustained anti-inflammatory response over time (312). The hypomethylated levels found in the promoter regions of the *TREM2* gene suggest that TREM-2 may be playing a compensatory anti-inflammatory role during the early stages of sepsis, possibly contributing to CARS. However, it may also be playing a strong immunosuppressive role in SS patients.

In summary, our studies provide more information on the molecular mechanisms that contribute to the severity of sepsis stimulated by circulating histones and its role as an inducer of pyroptosis in endothelial cells, thus contributing to inflammation, oxidative stress response and altered enzymatic antioxidant and endothelial dysfunction (Figure 31). Furthermore, our results indicate that in the early stages of sepsis the innate immune system tries to counteract the infection, mainly through neutrophils (Figure 18). On the contrary, the adaptive immune system is not yet fully activated, neither in septic patients nor in SS in the first hours after the patients are admitted to the ICU. Likewise, immunosuppressive responses and pro-coagulation signals are active in patients with SS, demonstrating the dual pro-inflammatory-immunosuppressive state (SIRS-CARS) of septic patients (Figure 3). However, despite the latest advances and findings, there is still little clinical and scientific knowledge about the time of onset and evolution of immunosuppressive events, and their ability to predict the fatal outcome or late mortality of patients who have developed sepsis. Likewise, there is also little information on how epigenetics can modulate immunosuppression phenomena and therefore affect patient survival. Increasing our current knowledge of the underlying mechanism of immunosuppression may help to design new immunomodulatory therapies based on the control of epigenetic mechanisms.

9. REFERENCIAS

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - J Am Med Assoc.* 2016;315:801–10.
2. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, et al. Assessment of clinical criteria for sepsis for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *J Am Med Assoc.* 2016;315(8):762–74.
3. Inada-Kim M, Nsutebu E. NEWS 2: An opportunity to standardise the management of deterioration and sepsis. *BMJ.* 2018 Mar;1(360):1260–5.
4. Sepsis Trust. Screening and Action tools.UK Sepsis Trust. 2019;
5. Vincent J-L, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med.* 1996 Jul;22(7):707–10.
6. Paoli CJ, Reynolds MA, Sinha M, Gitlin M, Crouser E. Epidemiology and costs of sepsis in the United States—an analysis based on timing of diagnosis and severity level. *Crit Care Med.* 2018;46(12):1889–97.
7. Zanotti-Cavazzoni SL. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *Yearb Crit Care Med.* 2011;20(11):188–90.
8. Hajj J, Blaine N, Salavaci J, Jacoby D. The "Centrality of Sepsis": A review on incidence, mortality and cost of care. *Healthc (Basel, Switzerland).* 2018 Jul 30;6(3).
9. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet (London, England).* 2020;395(10219):200–11.
10. Fleischmann-Struzek C, Goldfarb DM, Schlattmann P, Schlapbach LJ, Reinhart K, Kissoon N. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic

- review. Vol. 6, The Lancet Respiratory Medicine. Lancet Publishing Group; 2018. p. 223–30.
11. Torio CM, Andrews RM. STATISTICAL BRIEF # 160 National Inpatient Hospital Costs : The Most. Healthc Cost Util Proj Stat Br #160 Natl Inpatient Hosp Costs Most Expens Cond by Payer, 2011. 2013;31(1):1–12.
 12. Vincent J-L. Increasing awareness of sepsis: World Sepsis Day. Crit Care. 2012;16(5):152.
 13. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, Angelis G De, Falcone M, Frank U, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. 2013.
 14. Liu V, Escobar GJ, Greene JD, Soule J, Whippy A, Angus DC, et al. Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts. JAMA. 2014 Jul 2;312(1):90–2.
 15. Torio C, Moore B. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2013. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs [Internet]. 2016.
 16. Prescott HC, Osterholzer JJ, Langa KM, Angus DC, Iwashyna TJ. Late mortality after sepsis: Propensity matched cohort study. BMJ. 2016;353:1–8.
 17. Carson WF, Cavassani KA, Dou Y, Kunkel SL. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. Epigenetics. 2011;6(3):273–83.
 18. Celes MRN, Malvestio LM, Suadicani SO, Prado CM, Figueiredo MJ, Campos EC, et al. Disruption of calcium homeostasis in cardiomyocytes underlies cardiac structural and functional changes in severe sepsis. Mohanraj R, editor. PLoS One. 2013 Jul 23;8(7):e68809.
 19. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004 Mar

- 5;303(5663):1532–5.
20. Kaplan JM. Neutrophil extracellular traps (NETs):Double-edged swords of innate immunity 1. *J Immunol.* 2013;189(6):2689–95.
 21. Pieterse E, Hofstra J, Berden J, Herrmann M, Dieker J, van der Vlag J. Acetylated histones contribute to the immunostimulatory potential of neutrophil extracellular traps in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2015;179(1):68–74.
 22. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012. *Crit Care Med.* 2013;41(2):580–637.
 23. Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2010 Aug 5;36(8):1286–98.
 24. Regueira T, Andresen M, Mercado M, Downey P. Physiopathology of acute renal failure during sepsis. *Med Intensiva (English Ed.* 2011 Oct;35(7):424–32.
 25. Cerra FB, Siegel JH, Border JR, Wiles J, McMenamy RR. The hepatic failure of sepsis: cellular versus substrate. *Surgery.* 1979 Sep;86(3):409–22.
 26. Annane D, Bellissant E, Cavaillon J-M. Septic shock. *Lancet.* 2005 Jan;365(9453):63–78.
 27. Andrade SS, Bispo PJM, Gales AC. Advances in the microbiological diagnosis of sepsis. *Shock.* 2008 Oct;30(7):41–6.
 28. Suberviela B, Marquez-Lopez A, Castellanos-Ortega A, Fernandez-Mazarrasa C, Santibanez M, Martinez LM. Microbiological Diagnosis of Sepsis: Polymerase Chain Reaction System Versus Blood Cultures. *Am J Crit Care.* 2016 Jan 1;25(1):68–75.
 29. Tziolos N, Giannarellou-Bourboulis EJ. Contemporary approaches to the rapid molecular diagnosis of sepsis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016 Nov 1;16(11):1201–

- 7.
30. Pierrickos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: A review. *Crit Care*. 2010;14:1–18.
 31. Pierrickos C, Velissaris D, Bisdorff M, Marshall JC, Vincent J-L. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Crit Care*. 2020 Dec 5;24(1):287.
 32. Cavaillon J, Singer M, Skrecki T. Sepsis therapies: learning from 30 years of failure of translational research to propose new leads. *EMBO Mol Med*. 2020 Apr;12(4).
 33. Hotchkiss A, Feridooni T, Zhang F, Pasumarthi KBS. The effects of calcium channel blockade on proliferation and differentiation of cardiac progenitor cells. *Cell Calcium*. 2014;55(3):238–51.
 34. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: From cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:862–74.
 35. Tsu L, Ching TT. Sepsis: The future is bright. *Crit Care Med*. 2006;34(3):2484–5.
 36. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med*. 2006;34(1):15–21.
 37. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:316–21.
 38. Busslinger M, Tarakhovsky A. Epigenetic control of immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Jun 2;6(6):373–80.
 39. Bierne H, Hamon M, Cossart P. Epigenetics and Bacterial Infections. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Dec;2(12):a010272–a010272.
 40. Silmon de Monerri NC, Kim K. Pathogens hijack the epigenome: a new twist on host-pathogen interactions. *Am J Pathol*. 2014 Apr;184(4):897–911.
 41. Cizmeci D, Dempster EL, Champion OL, Wagley S, Akman OE, Prior JL, et al. Mapping epigenetic changes to the host cell genome induced by Burkholderia

- pseudomallei reveals pathogen-specific and pathogen-generic signatures of infection. *Sci Rep.* 2016 Nov;6(1):30861.
42. Davis FM, Schaller MA, Dendekker A, Joshi AD, Kimball AS, Evanoff H, et al. Sepsis induces prolonged epigenetic modifications in bone marrow and peripheral macrophages impairing inflammation and wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019 Nov;39(11):2353–66.
43. Zhang H, Rodriguez S, Wang L, Wang S, Serezani H, Kapur R, et al. Sepsis induces hematopoietic stem cell exhaustion and myelosuppression through distinct contributions of TRIF and MYD88. *Stem Cell Reports.* 2016 Jun;6(6):940–56.
44. Rubio I, Osuchowski MF, Shankar-Hari M, Skirecki T, Winkler MS, Lachmann G, et al. Current gaps in sepsis immunology: new opportunities for translational research. *Lancet Infect Dis.* 2019 Dec;19(12):e422–36.
45. Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14(2):121–37.
46. Vugt LA, Klouwenberg PMC, Spitoni C, Scicluna BP, Wiewel MA, Horn J, et al. Incidence, risk factors and attributable mortality of secondary infections in the intensive care unit after admission for sepsis. *JAMA.* 2016 Apr;315(14):1469.
47. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro-versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis.* 2000;181(1):176–80.
48. Tschaikowsky K, Hedwig-Geissling M, Schiele A, Bremer F, Schywalsky M, Schüttler J. Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and p. *Crit Care Med.* 2002 May;30(5):1015–23.
49. Pinsky MR. Sepsis: a pro- and anti-inflammatory disequilibrium syndrome. *Contrib Nephrol.* 2001;132(132):354–66.

50. Beltrán-García J, Osca-Verdegal R, Romá-Mateo C, Carbonell N, Ferreres J, Rodríguez M, et al. Epigenetic biomarkers for human sepsis and septic shock: insights from immunosuppression. *Epigenomics*. 2020 Apr;12(7):617–46.
51. Nelson JE, Cox CE, Hope AA, Carson SS. Chronic Critical Illness. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Aug 15;182(4):446–54.
52. Mira JC, Gentile LF, Mathias BJ, Efron PA, Brakenridge SC, Mohr AM, et al. Sepsis pathophysiology, chronic critical illness, and persistent inflammation-Immunosuppression and catabolism syndrome. *Crit Care Med*. 2017 Feb;45(2):253–62.
53. Rawal G, Yadav S, Kumar R. Post-intensive care syndrome: an overview. *J Transl Intern Med*. 2017 Jun;5(2):90–2.
54. Uhel F, Azzaoui I, Grégoire M, Pangault C, Dulong J, Tadié J-M, et al. Early expansion of circulating granulocytic myeloid-derived suppressor cells predicts development of nosocomial infections in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Aug;196(3):315–27.
55. Monneret G, Debard A-L, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, et al. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med*. 2003 Jul;31(7):2068–71.
56. Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, Ang D, Bihorac A, McKinley BA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012 Jun;72(6):1491–501.
57. Cross D, Drury R, Hill J, Pollard AJ. Epigenetics in sepsis: understanding its role in endothelial dysfunction, immunosuppression and potential therapeutics. *Front Immunol*. 2019 Jun 18;10(3):1363.
58. Ciarlo E, Savva A, Roger T. Epigenetics in sepsis: Targeting histone deacetylases. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42(1):8–12.
59. Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*. 1992 Jul 9;358(6382):167–9.

60. Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.* 2001 Mar;9(3):113–4.
61. Boise LH, Collins CM. Salmonella-induced cell death: apoptosis, necrosis or programmed cell death? *Trends Microbiol.* 2001 Feb;9(2):64–7.
62. Liu X-H, Kwon D, Schielke GP, Yang G-Y, Silverstein FS, Barks JDE. Mice Deficient in Interleukin-1 Converting Enzyme are Resistant to Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999 Oct 31;19(10):1099–108.
63. Monack DM, Hersh D, Ghori N, Bouley D, Zychlinsky A, Falkow S. Salmonella Exploits Caspase-1 to Colonize Peyer's Patches in a Murine Typhoid Model. *J Exp Med.* 2000 Jul 17;192(2):249–58.
64. Reisetter AC, Stebounova L V., Baltrusaitis J, Powers L, Gupta A, Grassian VH, et al. Induction of Inflammasome-dependent Pyroptosis by Carbon Black Nanoparticles. *J Biol Chem.* 2011 Jun 17;286(24):21844–52.
65. Jeng M-J, Soong W-J, Lee Y-S, Tsao P-C, Yang C-F, Chiu S-Y, et al. Meconium exposure dependent cell death and apoptosis in human alveolar epithelial cells. *Pediatr Pulmonol.* 2010 Jul 9;45(8):816–23.
66. Lacey CA, Mitchell WJ, Dadelahi AS, Skyberg JA. Caspase-1 and Caspase-11 Mediate Pyroptosis, Inflammation, and Control of Brucella Joint Infection. Palmer GH, editor. *Infect Immun.* 2018 Jun 25;86(9).
67. Ge X, Li W, Huang S, Yin Z, Xu X, Chen F, et al. The pathological role of NLRs and AIM2 inflammasome-mediated pyroptosis in damaged blood-brain barrier after traumatic brain injury. *Brain Res.* 2018 Oct 15;1697:10–20.
68. Lamkanfi M, Dixit VM. Modulation of Inflammasome Pathways by Bacterial and Viral Pathogens. *J Immunol.* 2011 Jul 15;187(2):597–602.
69. Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol.* 2009 Apr;27(1):519–50.

70. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018;281(1):8–27.
71. Afonina IS, Zhong Z, Karin M, Beyaert R. Limiting inflammation—the negative regulation of NF-κB and the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol.* 2017 Aug 1;18(8):861–9.
72. Man SM, Karki R, Kanneganti T-D. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol Rev.* 2017;277(1):61–75.
73. Yipp BG, Kubes P. NETosis : how vital is it ? *Blood.* 2013;122(16):2784–95.
74. Opal SM. Endotoxins and other sepsis triggers. In: *Endotoxemia and Endotoxin Shock.* Basel: KARGER; 2010. p. 14–24.
75. Gao Y-L, Zhai J-H, Chai Y-F. Recent advances in the molecular mechanisms underlying pyroptosis in sepsis. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:1–7.
76. Jorgensen I, Zhang Y, Krantz BA, Miao EA. Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis. *J Exp Med.* 2016 Sep 19;213(10):2113–28.
77. Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature.* 2014 Oct 9;514(7521):187–92.
78. Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascón GA, et al. The Endothelium in Sepsis. *Shock.* 2016 Mar;45(3):259–70.
79. Joffre J, Hellman J, Ince C, Ait-Oufella H. Endothelial responses in sepsis. Vol. 202, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* American Thoracic Society; 2020. p. 361–70.
80. Vincent J-L, Ince C, Pickkers P. Endothelial dysfunction: a therapeutic target in bacterial sepsis? *Expert Opin Ther Targets.* 2021 Oct 22;1–16.

81. Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med.* 2001 Jul;29(7 Suppl):S21-7.
82. Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med.* 2002 May;30(5 Suppl):S302-12.
83. Martinez-Mier G, Toledo-Pereyra LH, Ward PA. Adhesion molecules in liver ischemia and reperfusion. *J Surg Res.* 2000 Dec;94(2):185–94.
84. Zhong L, Simard MJ, Huot J. Endothelial microRNAs regulating the NF-κB pathway and cell adhesion molecules during inflammation. *FASEB J.* 2018;32(8):4070–84.
85. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013 Mar;13(3):159–75.
86. Mestas J, Ley K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2008 Aug;18(6):228–32.
87. Garton KJ. Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. *J Leukoc Biol.* 2006 Mar;79(6):1105–16.
88. Kjaergaard AG, Dige A, Nielsen JS, Tønnesen E, Krog J. The use of the soluble adhesion molecules sE-selectin, sICAM-1, sVCAM-1, sPECAM-1 and their ligands CD11a and CD49d as diagnostic and prognostic biomarkers in septic and critically ill non-septic ICU patients. *APMIS.* 2016 Oct;124(10):846–55.
89. Duman A, Turkdogan KA, Avcil M, Yenisey C, Ture M, Akoz A, et al. The predictive value of the inflammatory markers P-selectin and MCP1 in determining the length of stay and 30-day survival in the differentiation of sepsis patients. *J Pak Med Assoc.* 2018 Sep;68(9):1321–6.
90. Vassiliou AG, Mastora Z, Orfanos SE, Jahaj E, Maniatis NA, Koutsoukou A, et al. Elevated biomarkers of endothelial dysfunction/activation at ICU admission are associated with sepsis development. *Cytokine.* 2014 Oct;69(2):240–7.
91. Sessler CN, Windsor AC, Schwartz M, Watson L, Fisher BJ, Sugerman HJ, et al.

- Circulating ICAM-1 is increased in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 May;151(5):1420–7.
92. Zhao Y, Yi W, Wan X, Wang J, Tao T, Li J, et al. Blockade of ICAM-1 Improves the Outcome of Polymicrobial Sepsis via Modulating Neutrophil Migration and Reversing Immunosuppression. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:1–10.
93. Pérez-Cremades D, Bueno-Betí C, García-Giménez JL, Ibañez-Cabellos JS, Hermenegildo C, Pallardó F V., et al. Extracellular histones disarrange vasoactive mediators release through a COX-NOS interaction in human endothelial cells. *J Cell Mol Med.* 2017;21(8):1584–92.
94. Abrams ST, Zhang N, Manson J, Liu T, Dart C, Baluwa F, et al. Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(1):160–9.
95. Nakahara M, Ito T, Kawahara K, Yamamoto M, Nagasato T, Shrestha B, et al. Recombinant thrombomodulin protects mice against histone-induced lethal thromboembolism. Miyata T, editor. *PLoS One.* 2013 Sep;8(9):e75961.
96. Ibañez-Cabellos JS, Aguado C, Pérez-Cremades D, García-Giménez JL, Bueno-Betí C, García-López EM, et al. Extracellular histones activate autophagy and apoptosis via mTOR signaling in human endothelial cells. *Biochim Biophys acta Mol basis Dis.* 2018;1864(10):3234–46.
97. Opitz B, Eitel J, Meixenberger K, Suttorp N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thromb Haemost.* 2009 Nov;102(12):1103–9.
98. Elliott EI, Sutterwala FS. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunol Rev.* 2015 May;265(1):35–52.
99. Colbert JF, Schmidt EP. Endothelial and Microcirculatory Function and Dysfunction in Sepsis. Vol. 37, *Clinics in Chest Medicine.* W.B. Saunders; 2016. p. 263–75.

100. Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(1).
101. HIRSCH JG. Bactericidal action of histone. *J Exp Med.* 1958 Dec 1;108(6):925–44.
102. Hoeksema M, Van Eijk M, Haagsman HP, Hartshorn KL. Histones as mediators of host defense, inflammation and thrombosis. *Future Microbiology.* 2016.
103. Silk E, Zhao H, Weng H, Ma D. The role of extracellular histone in organ injury. *Cell Death Dis.* 2017;8(5):2812.
104. Carson WF, Kunkel SL. Regulation of cellular immune responses in sepsis by histone modifications. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2017;106(1):191–225.
105. García-Giménez JL, Romá-Mateo C, Carbonell N, Palacios L, Peiró-Chova L, García-López E, et al. A new mass spectrometry-based method for the quantification of histones in plasma from septic shock patients. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–10.
106. Chen R, Kang R, Fan X-G, Tang D. Release and activity of histone in diseases. *Cell Death Dis.* 2014;5:1–9.
107. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med.* 2009;15:1318–21.
108. McCall CE, Yoza B, Liu T, El Gazzar M. Gene-specific epigenetic regulation in serious infections with systemic inflammation. *J Innate Immun.* 2010;2:395–405.
109. Rother N, Pieterse E, Lubbers J, Hilbrands L, van der Vlag J. Acetylated Histones in Apoptotic Microparticles Drive the Formation of Neutrophil Extracellular Traps in Active Lupus Nephritis. *Front Immunol.* 2017 Sep 14;8(SEP):1136.

110. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol.* 2009 Jan 26;184(2):205–13.
111. Gatla H, Muniraj N, Thevkar P, Yavvari S, Sukhavasi S, Makena M. Regulation of Chemokines and Cytokines by Histone Deacetylases and an Update on Histone Decetylase Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 5;20(5):1110.
112. Zhou R, Gong A-Y, Chen D, Miller RE, Eischeid AN, Chen X-M. Histone deacetylases and NF- κ B signaling coordinate expression of CX3CL1 in epithelial cells in response to microbial challenge by suppressing miR-424 and miR-503. *PLoS One.* 2013;8(5):651–3.
113. Li Y, Zhao T, Liu B, Halaweish I, Mazitschek R, Duan X, et al. Inhibition of histone deacetylase 6 improves long-term survival in a lethal septic model. *J Trauma Acute Care Surg.* 2015 Feb;78(2):378–85.
114. Bonizzio CR, Clara M, Rodrigues T, Soriano FG. The viability of using epigenetic drugs as a treatment of patients in sepsis - a translational perspective*. *Rev Med.* 2016;95(1):91–102.
115. Li Y, Alam HB. Modulation of Acetylation: Creating a Pro-survival and Anti-Inflammatory Phenotype in Lethal Hemorrhagic and Septic Shock. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:1–15.
116. García-Giménez JL, Sanchis-Gomar F, Lippi G, Mena S, Ivars D, Gomez-Cabrera MC, et al. Epigenetic biomarkers: A new perspective in laboratory diagnostics. *Clin Chim Acta.* 2012 Oct 9;413(19–20):1576–82.
117. Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci.* 2014 Jun;1319(1):82–95.
118. Jin L, Batra S, Jeyaseelan S. Deletion of *Nlrp3* Augments Survival during Polymicrobial Sepsis by Decreasing Autophagy and Enhancing Phagocytosis. *J Immunol.* 2017 Feb;198(3):1253–62.

119. Fan Y, Du L, Fu Q, Zhou Z, Zhang J, Li G, et al. Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 ameliorates isoflurane-induced pyroptosis and cognitive impairment in aged mice. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:426.
120. Kim M-J, Bae SH, Ryu J-C, Kwon Y, Oh J-H, Kwon J, et al. SESN2/sestrin2 suppresses sepsis by inducing mitophagy and inhibiting NLRP3 activation in macrophages. *Autophagy.* 2016;12(8):1272–91.
121. Martínez-García JJ, Martínez-Banaclocha H, Angosto-Bazarrá D, de Torre-Minguela C, Baroja-Mazo A, Alarcón-Vila C, et al. P2X7 receptor induces mitochondrial failure in monocytes and compromises NLRP3 inflammasome activation during sepsis. *Nat Commun.* 2019;10(1):2711.
122. Shi C, Wang Y, Chen Q, Jiao F, Pei M, Gong Z. Extracellular Histone H3 Induces Pyroptosis During Sepsis and May Act Through NOD2 and VSIG4/NLRP3 Pathways. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 May;10.
123. Teitel M, Richardson B. Dna methylation in the immune system. *Clin Immunol.* 2003 Oct;109(1):2–5.
124. Deaton AM, Webb S, Kerr ARW, Illingworth RS, Guy J, Andrews R, et al. Cell type-specific DNA methylation at intragenic CpG islands in the immune system. *Genome Res.* 2011 Jul 1;21(7):1074–86.
125. Schuyler RP, Merkel A, Raineri E, Altucci L, Martens JHA, Pourfarzad F, et al. Distinct trends of DNA methylation patterning in the innate and adaptive immune systems. *Cell rep.* 2016;17(8):2101–11.
126. Hopp L, Loeffler-Wirth H, Nersisyan L, Arakelyan A, Binder H. Footprints of sepsis framed within community acquired pneumonia in the blood transcriptome. *Front Immunol.* 2018;9(3):1620.
127. Zemmour H, Planer D, Magenheim J, Moss J, Neiman D, Gilon D, et al. Non-invasive detection of human cardiomyocyte death using methylation patterns of circulating DNA. *Nat Commun.* 2018 Dec 24;9(1):1443.
128. Dhas DBB, Ashmi AH, Bhat BV, Kalaivani S, Parija SC. Comparison of

- genomic DNA methylation pattern among septic and non-septic newborns — An epigenome wide association study. *Genomics Data*. 2015 Mar;3(2):36–40.
129. Lorente-Pozo S, Navarrete P, Garzón MJ, Lara-Cantón I, Beltrán-García J, Osca-Verdegal R, et al. DNA Methylation Analysis to Unravel Altered Genetic Pathways Underlying Early Onset and Late Onset Neonatal Sepsis. A Pilot Study. *Front Immunol*. 2021 Feb 15;12.
130. Gongora MC, Lob HE, Landmesser U, Guzik TJ, Martin WD, Ozumi K, et al. Loss of extracellular superoxide dismutase leads to acute lung damage in the presence of ambient air: A potential mechanism underlying adult respiratory distress syndrome. *Am J Pathol*. 2008;173(4):915–26.
131. Kang S-C, Kim B-R, Lee S-Y, Park T-S. Sphingolipid metabolism and obesity-induced inflammation. *Front Endocrinol cytokines organ Dysfunct Assoc with aberrant DNA m*. 2013;4(2):67.
132. Lorente-Sorolla C, Garcia-Gomez A, Català-Moll F, Toledano V, Ciudad L, Avendaño-Ortiz J, et al. Inflammatory cytokines and organ dysfunction associate with the aberrant DNA methylome of monocytes in sepsis. *Genome Med*. 2019 Dec 29;11(1):66.
133. Schäfer ST, Gessner S, Scherag A, Rump K, Frey UH, Siffert W, et al. Hydrocortisone fails to abolish NF-κB1 protein nuclear translocation in deletion allele carriers of the NFKB1 promoter polymorphism (-94ins/delATTG) and is associated with increased 30-day mortality in septic shock. *PLoS One*. 2014;9(8):1–9.
134. Unterberg M, Kreuzer MJ, Schäfer ST, Bazzi Z, Adamzik M, Rump K. NFKB1 promoter DNA from nt+402 to nt+99 is hypomethylated in different human immune cells. Chiariotti L, editor. *PLoS One*. 2016 Jun 1;11(6):e0156702.
135. Matwiyoff GN, Prahl JD, Miller RJ, Carmichael JJ, Amundson DE, Seda G, et al. Immune regulation of procalcitonin: Abiomarker and mediator of infection. *Inflamm Res*. 2012;61(5):401–9.

136. Tendl KA, Schulz SMF, Mechtler TP, Bohn A, Metz T, Greber-Platzer S, et al. DNA methylation pattern of CALCA in preterm neonates with bacterial sepsis as a putative epigenetic biomarker. *Epigenetics*. 2013;8(12):1261–7.
137. Greer JR. Pathophysiology of cardiovascular dysfunction in sepsis. *BJA Educ*. 2015;15(6):316–21.
138. Cavassani KA, Carson IV WF, Moreira AP, Wen H, Schaller MA, Ishii M, et al. The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. *Blood*. 2010;115(22):4403–11.
139. Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, et al. DNA demethylation in the humanFOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(9):2378–89.
140. Venet F, Chung CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4+CD25+CD127-) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med*. 2009;35(4):678–86.
141. Binnie A, Walsh CJ, Hu P, Dwivedi DJ, Fox-Robichaud A, Liaw PC, et al. Epigenetic profiling in severe sepsis: A pilot study of DNA methylation profiles in critical illness. *Crit Care Med*. 2019 Dec 11;1(1):1–9.
142. Binnie A, Walsh CJ, Hu P, Dwivedi DJ, Fox-Robichaud A, Liaw PC, et al. Epigenetic profiling in severe sepsis: A pilot study of DNA methylation profiles in critical illness. *Crit Care Med*. 2020 Feb;48(2):142–50.
143. Angrisano T, Pero R, Peluso S, Keller S, Sacchetti S, Bruni CB, et al. LPS-induced IL-8 activation in human intestinal epithelial cells is accompanied by specific histone H3 acetylation and methylation changes. *BMC Microbiol*. 2010 Jun 14;10(1):172.
144. McClure EA, North CM, Kaminski NE, Goodman JI. Changes in DNA

- methylation and gene expression during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced suppression of the lipopolysaccharide-stimulated IgM response in splenocytes. *Toxicol Sci.* 2011;120(2):339–48.
145. Takahashi K, Sugi Y, Nakano K, Tsuda M, Kurihara K, Hosono A, et al. Epigenetic control of the host gene by commensal bacteria in large intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2011;286(41):35755–62.
146. Dhas BB, Antony HA, Bhat V, Newton B, Parija SC. Global DNA methylation in neonatal sepsis. *Indian J Pediatr.* 2015 Apr;82(4):340–4.
147. Matwiyoff GN, Prahl JD, Miller RJ, Carmichael JJ, Amundson DE, Seda G, et al. Immune regulation of procalcitonin: a biomarker and mediator of infection. *Inflamm Res.* 2012 May;61(5):401–9.
148. Novakovic B, Habibi E, Wang S-Y, Arts RJW, Davar R, Megchelenbrink W, et al. β -Glucan reverses the epigenetic state of LPS-induced immunological tolerance. *Cell.* 2016 Nov 17;167(5):1354–68.
149. Vento-Tormo R, Company C, Rodríguez-Ubreva J, de la Rica L, Urquiza JM, Javierre BM, et al. IL-4 orchestrates STAT6-mediated DNA demethylation leading to dendritic cell differentiation. *Genome Biol.* 2016 Dec;17(1):4.
150. Yang X, Wang X, Liu D, Yu L, Xue B, Shi H. Epigenetic regulation of macrophage polarization by DNA methyltransferase 3b. *Mol Endocrinol.* 2014 Apr;28(4):565–74.
151. Cheng C, Huang C, Ma T-T, Bian E-B, He Y, Zhang L, et al. SOCS1 hypermethylation mediated by DNMT1 is associated with lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokines in macrophages. *Toxicol Lett.* 2014 Mar;225(3):488–97.
152. Rump K, Unterberg M, Dahlke A, Nowak H, Koos B, Bergmann L, et al. DNA methylation of a NF- κ B binding site in the aquaporin 5 promoter impacts on mortality in sepsis. *Sci Rep.* 2019 Dec;9(1):18511.
153. Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, et al. DNA

- demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol.* 2007 Sep;37(9):2378–89.
154. Venet F, Chung C-S, Monneret G, Huang X, Horner B, Garber M, et al. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol.* 2007;83(3):523–35.
155. Lai AY, Mav D, Shah R, Grimm SA, Phadke D, Hatzi K, et al. DNA methylation profiling in human b cells reveals immune regulatory elements and epigenetic plasticity at alu elements during b-cell activation. *Genome Res.* 2013;23(12):2030–41.
156. Gustave C-A, Gossez M, Demaret J, Rimmelé T, Lepape A, Malcus C, et al. Septic Shock shapes B cell response toward an exhausted-like/Immunoregulatory profile in patients. *J Immunol.* 2018 Apr;200(7):2418–25.
157. Seguín-Estévez Q, De Palma R, Krawczyk M, Leimgruber E, Villard J, Picard C, et al. The transcription factor RFX protects MHC class II genes against epigenetic silencing by DNA methylation. *J Immunol.* 2009 Aug;183(4):2545–53.
158. Ost M, Singh A, Peschel A, Mehling R, Rieber N, Hartl D. Myeloid-derived suppressor cells in bacterial infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016 Mar;6(1):37.
159. Sido JM, Yang X, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Δ 9 -Tetrahydrocannabinol-mediated epigenetic modifications elicit myeloid-derived suppressor cell activation via STAT3/S100A8. *J Leukoc Biol.* 2015 Apr;97(4):677–88.
160. Lee-Chang C, Rashidi A, Miska J, Zhang P, Pituch KC, Hou D, et al. Myeloid-derived suppressive cells promote B cell-mediated immunosuppression via transfer of PD-L1 in glioblastoma. *Cancer Immunol Res.* 2019 Dec;7(12):1928–

- 43.
161. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* [Internet]. 2020 Jan 18 [cited 2021 May 10];395(10219):200–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/>
 162. Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc*. 2007;2:1445–57.
 163. Noble JE, Bailey MJA. Chapter 8 Quantitation of Protein. In 2009. p. 73–95.
 164. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul 28;9(7):676–82.
 165. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995 Jul 17;184(1):39–51.
 166. Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *BIO-PROTOCOL*. 2019;9(1).
 167. Kamsler A, Daily D, Hochman A, Stern N, Shiloh Y, Rotman G, et al. Increased oxidative stress in ataxia telangiectasia evidenced by alterations in redox state of brains from Atm-deficient mice. *Cancer Res*. 2001 Mar 1;61(5):1849–54.
 168. Suzuki YJ, Carini M, Butterfield DA. Protein carbonylation. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Mar;12(3):323–5.
 169. Maksimovic J, Phipson B, Oshlack A. A cross-package Bioconductor workflow for analysing methylation array data. *F1000Research*. 2016;5:1281.
 170. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen

- KD, et al. Minfi: A flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 2014;30(10):1363–9.
171. Fortin J-P, Triche TJ, Hansen KD. Preprocessing, normalization and integration of the Illumina HumanMethylationEPIC array with minfi. *Bioinformatics*. 2016 Dec;btw691.
172. Pidsley R, Zotenko E, Peters TJ, Lawrence MG, Risbridger GP, Molloy P, et al. Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biol*. 2016 Dec;17(1):208.
173. Martorell-Marugán J, González-Rumayor V, Carmona-Sáez P. mCSEA: detecting subtle differentially methylated regions. Valencia A, editor. *Bioinformatics*. 2019 Sep;35(18):3257–62.
174. Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *Omi A J Integr Biol*. 2012 May;16(5):284–7.
175. Abais JM, Xia M, Zhang Y, Boini KM, Li P-L. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(13):1111–29.
176. Abe J-I, Morrell C. Pyroptosis as a Regulated Form of Necrosis: PI+/Annexin V-/High Caspase 1/Low Caspase 9 Activity in Cells = Pyroptosis? *Circ Res*. 2016;118(10):1457–60.
177. Miao EA, Rajan J V, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev*. 2011 Sep;243(1):206–14.
178. Medina V, Edmonds B, Young GP, James R, Appleton S, Zalewski PD. Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Res*. 1997 Sep 1;57(17):3697–707.

179. Jo E-K, Kim JK, Shin D-M, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol.* 2016 Mar;13(2):148–59.
180. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discov.* 2020 Dec 9;6(1):36.
181. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene.* 1999 Dec 4;18(54):7719–30.
182. Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura ALM, Persechini PM, Ojcius DM. ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages. *J Biol Chem.* 2007 Feb;282(5):2871–9.
183. Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, Fitzgerald GA. Prostanoids in health and disease. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50(Supplement):S423–8.
184. Sandoo A, Veldhuijzen van Zanten JJC., Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *Open Cardiovasc Med J.* 2010 Dec 23;4(1):302–12.
185. Chen Y, Li X, Boini KM, Pitzer AL, Gulbins E, Zhang Y, et al. Endothelial Nlrp3 inflammasome activation associated with lysosomal destabilization during coronary arteritis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2015;1853(2):396–408.
186. Terradas R, Grau S, Blanch J, Riu M, Saballs P, Castells X, et al. Eosinophil Count and Neutrophil-Lymphocyte Count Ratio as Prognostic Markers in Patients with Bacteremia: A Retrospective Cohort Study. Caylà JA, editor. *PLoS One.* 2012 Aug 9;7(8):e42860.
187. O’Shea JJ, Gadina M, Siegel RM, Farber J. Cytokines. In: *Rheumatology: Sixth Edition.* Elsevier Inc.; 2015. p. 99–112.
188. Biet F, Locht C, Kremer L. Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its

- role in defense against bacterial pathogens. Vol. 80, Journal of Molecular Medicine. J Mol Med (Berl); 2002. p. 147–62.
189. Sahoo M, Ceballos-Olvera I, Del Barrio L, Re F. Role of the inflammasome, IL-1 β , and IL-18 in bacterial infections. ScientificWorldJournal. 2011;11:2037–50.
190. Kwaa AKR, Talana CAG, Blankson JN. Interferon Alpha Enhances NK Cell Function and the Suppressive Capacity of HIV-Specific CD8 + T Cells. Silvestri G, editor. J Virol. 2018 Nov 7;93(3).
191. Lin G, Wang J, Lao X, Wang J, Li L, Li S, et al. Interleukin-6 Inhibits Regulatory T Cells and Improves the Proliferation and Cytotoxic Activity of Cytokine-induced Killer Cells. J Immunother. 2012 May;35(4):337–43.
192. Opp MR, Smith EM, Hughes TK. Interleukin-10 (cytokine synthesis inhibitory factor) acts in the central nervous system of rats to reduce sleep. J Neuroimmunol. 1995 Jul;60(1–2):165–8.
193. Sokol CL, Luster AD. The Chemokine System in Innate Immunity. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015 May;7(5):a016303.
194. Sherry B, Tekamp-Olson P, Gallegos C, Bauer D, Davatidis G, Wolpe SD, et al. Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. J Exp Med. 1988 Dec 1;168(6):2251–9.
195. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. Cytokine Growth Factor Rev. 2002 Dec;13(6):455–81.
196. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. J Interf Cytokine Res. 2009 Jun;29(6):313–26.
197. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. Immunity. 2014 Nov;41(5):694–707.
198. Feizi T. Carbohydrate Ligands for the Leukocyte-Endothelium Adhesion Molecules, Selectins. Results Probl Cell Differ. 2001;33(1):201–23.

199. DN G, E S. Leukocyte–Endothelial Cell Adhesion. In: *Inflammation and the Microcirculation*. 2010.
200. Silva-Filho JL, Caruso-Neves C, Pinheiro AAS. IL-4: an important cytokine in determining the fate of T cells. *Biophys Rev*. 2014 Mar 9;6(1):111–8.
201. Zhu J. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine*. 2015 Sep;75(1):14–24.
202. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2014 Nov;1843(11):2563–82.
203. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front Immunol*. 2014 Oct;5.
204. Yoshida H, Hamano S, Senaldi G, Covey T, Faggioni R, Mu S, et al. WSX-1 Is Required for the Initiation of Th1 Responses and Resistance to *L. major* Infection. *Immunity*. 2001 Oct;15(4):569–78.
205. Chen Q, Ghilardi N, Wang H, Baker T, Xie M-H, Gurney A, et al. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature*. 2000 Oct;407(6806):916–20.
206. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, et al. IL-27, a Heterodimeric Cytokine Composed of EBI3 and p28 Protein, Induces Proliferation of Naive CD4+ T Cells. *Immunity*. 2002 Jun;16(6):779–90.
207. Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol*. 2006 Sep 13;7(9):937–45.
208. Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol*. 2006 Sep 13;7(9):929–36.

209. Colgan J, Rothman P. All in the family: IL-27 suppression of TH-17 cells. *Nat Immunol.* 2006 Sep;7(9):899–901.
210. Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M, Kakiuchi T. The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:1–11.
211. Valeri M, Raffatellu M. Cytokines IL-17 and IL-22 in the host response to infection. Napier B, editor. *Pathog Dis.* 2016 Dec;74(9):ftw111.
212. Zenobia C, Hajishengallis G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol 2000.* 2015 Oct;69(1):142–59.
213. Vogl T, Gharibyan AL, Morozova-Roche LA. Pro-Inflammatory S100A8 and S100A9 Proteins: Self-Assembly into Multifunctional Native and Amyloid Complexes. *Int J Mol Sci.* 2012 Mar 5;13(3):2893–917.
214. Chernov A V., Dolkas J, Hoang K, Angert M, Srikrishna G, Vogl T, et al. The Calcium-binding Proteins S100A8 and S100A9 Initiate the Early Inflammatory Program in Injured Peripheral Nerves. *J Biol Chem.* 2015 May 1;290(18):11771–84.
215. Wang Y, Fang C, Gao H, Bilodeau ML, Zhang Z, Croce K, et al. Platelet-derived S100 family member myeloid-related protein-14 regulates thrombosis. *J Clin Invest.* 2014 May;124(5):2160–71.
216. Furie B. P-Selectin and Blood Coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 May;25(5):877–8.
217. Naldini A, Aarden L, Pucci A, Bernini C, Carraro F. Inhibition of interleukin-12 expression by α -thrombin in human peripheral blood mononuclear cells: a potential mechanism for modulating Th1/Th2 responses. *Br J Pharmacol.* 2003 Nov;140(5):980–6.
218. Foley JH, Conway EM. Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation. *Circ Res.* 2016 Apr;118(9):1392–408.

219. Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, Beck S. Epigenome-Wide Association Studies for common human diseases. *Nat Rev Genet.* 2012;12(8):529–41.
220. Severino P, Silva E, Baggio-Zappia GL, Brunialti MKC, Nucci LA, Rigato Jr. O, et al. Patterns of Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Outcomes from Patients with Sepsis Secondary to Community Acquired Pneumonia. Heimesaat MM, editor. *PLoS One.* 2014 Mar;9(3):e91886.
221. Lu X, Xue L, Sun W, Ye J, Zhu Z, Mei H. Identification of key pathogenic genes of sepsis based on the Gene Expression Omnibus database. *Mol Med Rep.* 2017 Dec;
222. Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 May;121(5):1108–11.
223. Guzzo C, Ayer A, Basta S, Banfield BW, Gee K. IL-27 Enhances LPS-Induced Proinflammatory Cytokine Production via Upregulation of TLR4 Expression and Signaling in Human Monocytes. *J Immunol.* 2012 Jan;188(2):864–73.
224. Allam R, Kumar SVR, Darisipudi MN, Anders H-J. Extracellular histones in tissue injury and inflammation. *J Mol Med.* 2014;92(5):465–72.
225. Xiong S, Hong Z, Huang LS, Tsukasaki Y, Nepal S, Di A, et al. IL-1 β Suppression of VE-cadherin transcription underlies sepsis-induced inflammatory lung injury. *J Clin Invest.* 2020 Apr 16;
226. Wang J-G, Williams JC, Davis BK, Jacobson K, Doerschuk CM, Ting JP-Y, et al. Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1 -dependent manner. *Blood.* 2011 Aug;118(8):2366–74.
227. Chen Y, Wang L, Pitzer AL, Li X, Li P-L, Zhang Y. Contribution of redox-dependent activation of endothelial Nlrp3 inflammasomes to hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *J Mol Med.* 2016 Dec;94(12):1335–47.

228. Allam R, Darisipudi MN, Tschopp J, Anders HJ. Histones trigger sterile inflammation by activating the NLRP3 inflammasome. *Eur J Immunol.* 2013;43:3336–42.
229. Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T, et al. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol.* 2015;4:296–307.
230. Sena CM, Leandro A, Azul L, Seiça R, Perry G. Vascular Oxidative Stress: Impact and Therapeutic Approaches. *Front Physiol.* 2018 Dec;9:1668.
231. Chen Y, Zhou Z, Min W. Mitochondria, Oxidative Stress and Innate Immunity. *Front Physiol.* 2018;9:1–25.
232. Sharma A, Tate M, Mathew G, Vince JE, Ritchie RH, de Haan JB. Oxidative stress and NLRP3-inflammasome activity as significant drivers of diabetic cardiovascular complications: therapeutic implications. *Front Physiol.* 2018;9:114–49.
233. Li S, Wang L, Xu Z, Huang Y, Xue R, Yue T, et al. ASC deglutathionylation is a checkpoint for NLRP3 inflammasome activation. *J Exp Med.* 2021 Sep;218(9).
234. Guglielmo A, Sabra A, Elbery M, Cerveira MM, Ghenov F, Sunasee R, et al. A mechanistic insight into curcumin modulation of the IL-1 β secretion and NLRP3 S-glutathionylation induced by needle-like cationic cellulose nanocrystals in myeloid cells. *Chem Biol Interact.* 2017 Aug;274:1–12.
235. Zhang T, Tsutsuki H, Islam W, Ono K, Takeda K, Akaike T, et al. ATP exposure stimulates glutathione efflux as a necessary switch for NLRP3 inflammasome activation. *Redox Biol.* 2021 May;41:101930.
236. Cascone A, Bruelle C, Lindholm D, Bernardi P, Eriksson O. Destabilization of the Outer and Inner Mitochondrial Membranes by Core and Linker Histones. Santos J, editor. *PLoS One.* 2012 Apr 16;7(4):e35357.
237. Costa VM., Amorim MA, Quintanilha A, Moradas-Ferreira P. Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces*

- cerevisiae: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. *Free Radic Biol Med.* 2002 Dec;33(11):1507–15.
238. Kim SY, Jo H-Y, Kim MH, Cha Y, Choi SW, Shim J-H, et al. H₂O₂-dependent Hyperoxidation of Peroxiredoxin 6 (Prdx6) Plays a Role in Cellular Toxicity via Up-regulation of iPLA2 Activity. *J Biol Chem.* 2008 Nov;283(48):33563–8.
239. Liu L, Sun B. Neutrophil pyroptosis: new perspectives on sepsis. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(11):2031–42.
240. Radeke HH, Martin M, Topley N, Kaever V, Resch K. Differential biological activities of human interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta. *Eur Cytokine Netw.* 1991;2(1):51–9.
241. Maier JA, Hla T, Maciag T. Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1990;265(19):10805–8.
242. Kawabe T, Harris PD, Zakaria ELR, Garrison RN. Sepsis alters vessel contraction by adrenoceptor-induced nitric oxide and prostanoid. *J Surg Res.* 2003;110(2):352–9.
243. Zoccal KF, Sorgi CA, Hori JI, Paula-Silva FWG, Arantes EC, Serezani CH, et al. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. *Nat Commun.* 2016;7(1):10760.
244. Li Z, Zhang Y, Liu B, Luo W, Li H, Zhou Y. Role of E-type prostaglandin receptor EP3 in the vasoconstrictor activity evoked by prostacyclin in thromboxane-prostanoid receptor deficient mice. *Sci Rep.* 2017 Mar;7(1):42167.
245. Pober JS, Min W, Bradley JR. Mechanisms of endothelial dysfunction, injury, and death. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:71–95.
246. Yan J, Nunn AD, Thomas R. Selective induction of cell adhesion molecules by proinflammatory mediators in human cardiac microvascular endothelial cells in culture. *Int J Clin Exp Med.* 2010 Oct 23;3(4):315–31.

247. Barnes TC, Anderson ME, Moots RJ. The many faces of interleukin-6: the role of IL-6 in inflammation, vasculopathy, and fibrosis in systemic sclerosis. *Int J Rheumatol.* 2011 Sep;2011:721608.
248. Lin Y-M, Chang Z-L, Liao Y-Y, Chou M-C, Tang C-H. IL-6 promotes ICAM-1 expression and cell motility in human osteosarcoma. *Cancer Lett.* 2013;328(1):135–43.
249. Habas K, Shang L. Alterations in intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in human endothelial cells. *Tissue Cell.* 2018 Oct;54:139–43.
250. Hashimoto M, Shingu M, Ezaki I, Nobunaga M, Minamihara M, Kato K, et al. Production of soluble ICAM-1 from human endothelial cells induced by IL-1 beta and TNF-alpha. *Inflammation.* 1994;18(2):163–73.
251. Chang JC. Sepsis and septic shock: endothelial molecular pathogenesis associated with vascular microthrombotic disease. *Thromb J.* 2019;17:10.
252. Figueras-Aloy J, Gómez-López L, Rodríguez-Miguélez J-M, Salvia-Roiges MD, Jordán-García I, Ferrer-Codina I, et al. Serum soluble ICAM-1, VCAM-1, L-selectin, and P-selectin levels as markers of infection and their relation to clinical severity in neonatal sepsis. *Am J Perinatol.* 2007 Jun;24(6):331–8.
253. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-activated vascular endothelium under flow. *Blood.* 2005 Jul;106(2):584–92.
254. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent J-L. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2:1–21.
255. Perera AP, Fernando R, Shinde T, Gundamaraju R, Southam B, Sohal SS, et al. MCC950, a specific small molecule inhibitor of NLRP3 inflammasome attenuates colonic inflammation in spontaneous colitis mice. *Sci Rep.* 2018;8(1):8618.
256. Alhamdi Y, Abrams ST, Cheng Z, Jing S, Su D, Liu Z, et al. Circulating histones

- are major mediators of cardiac injury in patients with sepsis. *Crit Care Med.* 2015;43(10):2094–103.
257. Kawai C, Kotani H, Miyao M, Ishida T, Jemail L, Abiru H, et al. Circulating extracellular histones are clinically relevant mediators of multiple organ injury. *Am J Pathol.* 2016;186:829–43.
258. Meara CHO, Coupland LA, Kordbacheh F, Quah BJC, Chang C-W, Simon Davis DA, et al. Neutralizing the pathological effects of extracellular histones with small polyanions. *Nat Commun.* 2020;11(1):6408.
259. Ni D-X, Wang Q, Li Y-M, Cui Y-M, Shen T-Z, Li X-L, et al. Synthesis of nigranoic acid and manwuweizic acid derivatives as HDAC inhibitors and anti-inflammatory agents. *Bioorg Chem.* 2021 Apr;109:104728.
260. Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol.* 1994 Dec;56(6):672–86.
261. Brodsky IE, Medzhitov R. Pyroptosis: Macrophage Suicide Exposes Hidden Invaders. *Curr Biol.* 2011 Jan;21(2):R72–5.
262. Wu C, Lu W, Zhang Y, Zhang G, Shi X, Hisada Y, et al. Inflammasome Activation Triggers Blood Clotting and Host Death through Pyroptosis. *Immunity.* 2019 Jun;50(6):1401-1411.e4.
263. Zhang Y, Zhang G, Jian C, Wu C, Mackman N, Smyth S, et al. Inflammasome Activation Promotes Deep Vein Thrombosis through Pyroptosis. *Blood.* 2019 Nov 13;134(Supplement_1):3644–3644.
264. Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol.* 2010 May 12;7(3):164–74.
265. Chen J, Liao MY, Gao XL, Zhong Q, Tang TT, Yu X, et al. IL-17A induces pro-inflammatory cytokines production in macrophages via MAPKinas, NF-κB and AP-1. *Cell Physiol Biochem.* 2013;32(5):1265–74.
266. Liu R, Lauridsen HM, Amezquita RA, Pierce RW, Jane-wit D, Fang C, et al. IL-

- 17 Promotes Neutrophil-Mediated Immunity by Activating Microvascular Pericytes and Not Endothelium. *J Immunol.* 2016 Sep 15;197(6):2400–8.
267. Wirtz S, Tubbe I, Galle PR, Schild HJ, Birkenbach M, Blumberg RS, et al. Protection from lethal septic peritonitis by neutralizing the biological function of interleukin 27. *J Exp Med.* 2006 Aug 7;203(8):1875–81.
268. Lunardi S, Lim SY, Muschel RJ, Brunner TB. IP-10/CXCL10 attracts regulatory T cells: Implication for pancreatic cancer. *Oncoimmunology.* 2015 Sep 2;4(9):e1027473.
269. Ivashkiv LB. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. Vol. 18, *Nature Reviews Immunology.* Nature Publishing Group; 2018. p. 545–58.
270. Rosenthal MD, Moore FA. Persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism: Evolution of multiple organ dysfunction. *Surg Infect (Larchmt).* 2016 Apr 1;17(2):167–72.
271. Dai J, Kumbhare A, Youssef D, McCall CE, Gazzar M El. Intracellular S100A9 Promotes Myeloid-Derived Suppressor Cells during Late Sepsis. *Front Immunol.* 2017 Nov 17;8.
272. Muller WA. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Vet Pathol.* 2013 Jan 23;50(1):7–22.
273. Yanaba K, Kaburagi Y, Takehara K, Steeber DA, Tedder TF, Sato S. Relative Contributions of Selectins and Intercellular Adhesion Molecule-1 to Tissue Injury Induced by Immune Complex Deposition. *Am J Pathol.* 2003 May;162(5):1463–73.
274. Tomaiuolo M, Brass LF, Stalker TJ. Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. *Interv Cardiol Clin.* 2017 Jan;6(1):1–12.

275. Evans CE, Spier AB, Zhao Y-Y. Sepsis-induced thrombus formation and cell-specific HIFs. *Thromb Res.* 2018 Nov;171:187–9.
276. Kraakman MJ, Lee MKS, Al-Sharea A, Dragoljevic D, Barrett TJ, Montenont E, et al. Neutrophil-derived S100 calcium-binding proteins A8/A9 promote reticulated thrombocytosis and atherogenesis in diabetes. *J Clin Invest.* 2017 May 15;127(6):2133–47.
277. Deguchi A, Yamamoto T, Shibata N, Maru Y. S100A8 may govern hyperinflammation in severe COVID-19. *FASEB J.* 2021 Sep 2;35(9).
278. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2009 Sep;78(6):539–52.
279. Zhu C, Zhang A, Huang S, Ding G, Pan X, Chen R. Interleukin-13 inhibits cytokines synthesis by blocking nuclear factor- κ B and c-Jun N-terminal kinase in human mesangial cells. *J Biomed Res.* 2010 Jul;24(4):308–16.
280. McKenzie AN, Culpepper JA, de Waal Malefyt R, Briere F, Punnonen J, Aversa G, et al. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc Natl Acad Sci.* 1993 Apr 15;90(8):3735–9.
281. Gibney ER, Nolan CM. Epigenetics and gene expression. *Heredity (Edinb).* 2010 Jul 12;105(1):4–13.
282. Córneo E da S, Michels M, Dal-Pizzol F. Sepsis, immunosuppression and the role of epigenetic mechanisms. *Expert Rev Clin Immunol.* 2021 Feb 1;17(2):169–76.
283. Arts RJW, Gresnigt MS, Joosten LAB, Netea MG. Cellular metabolism of myeloid cells in sepsis. *J Leukoc Biol.* 2017;101(1):151–64.
284. Liu Z, Ni S, Chen G, Cai J, Guo Z, Chang P, et al. Histones-mediated lymphocyte apoptosis during sepsis is dependent on p38 phosphorylation and mitochondrial permeability transition. Caldwell CC, editor. *PLoS One.* 2013 Oct 22;8(10):e77131.

285. Venet F, Pachot A, Debard A-L, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, et al. Human CD4 + CD25 + Regulatory T Lymphocytes Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Monocyte Survival through a Fas/Fas Ligand-Dependent Mechanism. *J Immunol.* 2006 Nov;177(9):6540–7.
286. Schrijver IT, Théroude C, Roger T. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Sepsis. *Front Immunol.* 2019;10:327.
287. Pankla R, Buddhisa S, Berry M, Blankenship DM, Bancroft GJ, Banchereau J, et al. Genomic transcriptional profiling identifies a candidate blood biomarker signature for the diagnosis of septicemic melioidosis. *Genome Biol.* 2009;10(11):R127.
288. Shalova IN, Lim JY, Chittezhath M, Zinkernagel AS, Beasley F, Hernández-Jiménez E, et al. Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1 α . *Immunity.* 2015 Mar;42(3):484–98.
289. Chan C, Li L, McCall CE, Yoza BK. Endotoxin Tolerance Disrupts Chromatin Remodeling and NF- B Transactivation at the IL-1 Promoter. *J Immunol.* 2005;175(1):461–8.
290. Gazzar ME, Yoza BK, Chen X, Garcia BA, Young NL, McCall CE. Chromatin-specific remodeling by HMGB1 and linker histone H1 silences proinflammatory genes during endotoxin tolerance. *Mol Cell Biol.* 2009;29(7):1959–71.
291. Qiu P, Cui X, Barochia A, Li Y, Natanson C, Eichacker PQ. The evolving experience with therapeutic TNF inhibition in sepsis: considering the potential influence of risk of death. *Expert Opin Investig Drugs.* 2011 Nov;20(11):1555–64.
292. Ward NS, Casserly B, Ayala A. The Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (CARS) in Critically Ill Patients. *Clin Chest Med.* 2008 Dec;29(4):617–25.

293. Aziz M, Jacob A, Yang W-L, Matsuda A, Wang P. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. *J Leukoc Biol.* 2013 Mar 1;93(3):329–42.
294. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol.* 2012;32(1):23–63.
295. Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology.* 2006 Apr;117(4):433–42.
296. Hiraki S, Ono S, Tsujimoto H, Kinoshita M, Takahata R, Miyazaki H, et al. Neutralization of interleukin-10 or transforming growth factor- β decreases the percentages of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in septic mice, thereby leading to an improved survival. *Surgery.* 2012 Feb;151(2):313–22.
297. Garnacho Montero J, Ortiz-Leyba C, Jiménez-Jiménez J, García-Garmendia JL. Interleukin 10 and sepsis. *Arch Surg.* 2000 Jul;135(7):875.
298. Law AMK, Valdes-Mora F, Gallego-Ortega D. Myeloid-Derived Suppressor Cells as a Therapeutic Target for Cancer. *Cells.* 2020;9(3).
299. Bronte V. Myeloid-derived suppressor cells in inflammation: uncovering cell subsets with enhanced immunosuppressive functions. *Eur J Immunol.* 2009 Oct;39(10):2670–2.
300. Panopoulos AD, Watowich SS. Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and “emergency” hematopoiesis. *Cytokine.* 2008 Jun;42(3):277–88.
301. Ono S, Tsujimoto H, Hiraki S, Aosasa S. Mechanisms of sepsis-induced immunosuppression and immunological modification therapies for sepsis. *Ann Gastroenterol Surg.* 2018 Sep;2(5):351–8.
302. Boomer JS, To K, Chang KC, Ii SDJ, Kreisel D, Krupnick AS, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *Jama.* 2011;306(23):2594–605.

303. Deng JC, Cheng G, Newstead MW, Zeng X, Kobayashi K, Flavell RA, et al. Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M. *J Clin Invest.* 2006 Sep;116(9):2532–42.
304. Escoll P, del Fresno C, García L, Vallés G, Lendínez MJ, Arnalich F, et al. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Nov 14;311(2):465–72.
305. Cazalis M-A, Lepape A, Venet F, Frager F, Mougin B, Vallin H, et al. Early and dynamic changes in gene expression in septic shock patients: a genome-wide approach. *Intensive care Med Exp.* 2014 Dec;2(1):20.
306. Natale G, Biagioni F, Busceti CL, Gambardella S, Limanaqi F, Fornai F. TREM Receptors Connecting Bowel Inflammation to Neurodegenerative Disorders. *Cells.* 2019;8(10).
307. Ito H, Hamerman JA. TREM-2, triggering receptor expressed on myeloid cell-2, negatively regulates TLR responses in dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2012 Jan;42(1):176–85.
308. TREM2 protein expression summary - The Human Protein Atlas.
309. Chen Q, Zhang K, Jin Y, Zhu T, Cheng B, Shu Q, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells-2 protects against polymicrobial sepsis by enhancing bacterial clearance. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Jul;188(2):201–12.
310. Gregory DJ. Triggering receptor expressed on myeloid cells-2: a new ally against sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Jul;188(2):125–6.
311. Alkan FK, Korkaya H. Therapeutic utility of immunosuppressive TREM2+ macrophages: an important step forward in potentiating the immune checkpoint inhibitors. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Dec;5(1):264.
312. Liu W, Taso O, Wang R, Bayram S, Graham AC, Garcia-Reitboeck P, et al. Trem2 promotes anti-inflammatory responses in microglia and is suppressed under pro-inflammatory conditions. *Hum Mol Genet.* 2020;29(19):3224–48.

10. ANEXOS

ANEXO 1: Trabajos publicados como primer autor durante la Tesis Doctoral

*Communication***Comparative Analysis of Chromatin-Delivered Biomarkers in the Monitoring of Sepsis and Septic Shock: A Pilot Study**

Jesús Beltrán-García ^{1,2,3,†}, Juan J. Manclús ^{4,†}, Eva M. García-López ^{1,3,5}, Nieves Carbonell ^{2,6} , José Ferreres ^{2,6}, María Rodríguez-Gimillo ^{2,6}, Concepción Garcés ¹ , Federico V. Pallardó ^{1,2,3} , José L. García-Giménez ^{1,2,3,5} , Ángel Montoya ^{4,*} and Carlos Romá-Mateo ^{1,2,3,*}

¹ Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain; jesus.beltran@ext.uv.es (J.B.-G.); E.Maria.Garcia@uv.es (E.M.G.-L.); Concepcion.Garces@uv.es (C.G.); Federico.V.Pallardo@uv.es (F.V.P.); J.Luis.Garcia@uv.es (J.L.G.-G.)

² INCLIVA Biomedical Research Institute, 46010 Valencia, Spain; edurnecarbonell@yahoo.es (N.C.); ferreresj@gmail.com (J.F.); mariarodriguezgimillo@gmail.com (M.R.-G.)

³ Biomedical Research Networking Center of Rare Diseases (CIBERER), Institute of Health Carlos III, 28029 Madrid, Spain

⁴ Centro de Investigación e Innovación en Bioingeniería, Universitat Politècnica de València, 46022 Valencia, Spain; jmanclus@ci2b.upv.es

⁵ EpiDisease SL (Spin-Off Ciber-ISCIII), 46980 Paterna, Spain

⁶ Intensive Care Unit, Clinical University Hospital of Valencia, 46010 Valencia, Spain

* Correspondence: amontoya@ci2b.upv.es (Á.M.); carlos.roma@uv.es (C.R.-M.); Tel.: +34-96-387-7093 (Á.M.); +34-96-398-3170 (C.R.-M.)

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Beltrán-García, J.; Manclús, J.J.; García-López, E.M.; Carbonell, N.; Ferreres, J.; Rodríguez-Gimillo, M.; Garcés, C.; Pallardó, F.V.; García-Giménez, J.L.; Montoya, Á.; et al. Comparative Analysis of Chromatin-Delivered Biomarkers in the Monitoring of Sepsis and Septic Shock: A Pilot Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9935. <https://doi.org/10.3390/ijms22189935>

Academic Editor: Dumitru Constantin-Teodosiu

Received: 29 July 2021

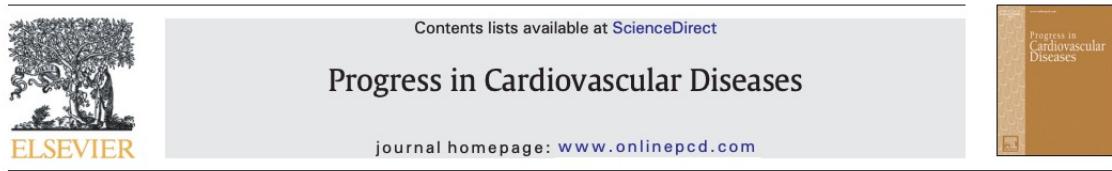
Accepted: 11 September 2021

Published: 14 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Abstract: Sepsis management remains one of the most important challenges in modern clinical practice. Rapid progression from sepsis to septic shock is practically unpredictable, hence the critical need for sepsis biomarkers that can help clinicians in the management of patients to reduce the probability of a fatal outcome. Circulating nucleoproteins released during the inflammatory response to infection, including neutrophil extracellular traps, nucleosomes, and histones, and nuclear proteins like HMGB1, have been proposed as markers of disease progression since they are related to inflammation, oxidative stress, endothelial damage, and impairment of the coagulation response, among other pathological features. The aim of this work was to evaluate the actual potential for decision making/outcome prediction of the most commonly proposed chromatin-related biomarkers (i.e., nucleosomes, citrullinated H3, and HMGB1). To do this, we compared different ELISA measuring methods for quantifying plasma nucleoproteins in a cohort of critically ill patients diagnosed with sepsis or septic shock compared to nonseptic patients admitted to the intensive care unit (ICU), as well as to healthy subjects. Our results show that all studied biomarkers can be used to monitor sepsis progression, although they vary in their effectiveness to separate sepsis and septic shock patients. Our data suggest that HMGB1/citrullinated H3 determination in plasma is potentially the most promising clinical tool for the monitoring and stratification of septic patients.

Keywords: sepsis; septic shock; circulating histones; nucleosomes; HMGB1; biomarkers; ELISA



Role of non-coding RNAs as biomarkers of deleterious cardiovascular effects in sepsis

Jesús Beltrán-García ^{a,b,c}, Rebeca Osca-Verdegal ^{a,c}, Elena Nácher-Sendra ^{b,c}, Alejandro Cardona-Monzonís ^d, Fabian Sanchis-Gomar ^e, Nieves Carbonell ^{b,f}, Federico V. Pallardó ^{a,b,c}, Carl J. Lavie ^g, José Luis García-Giménez ^{a,b,c,d,*}

^a Center for Biomedical Research Network on Rare Diseases (CIBERER), Carlos III Health Institute, Valencia 900225235, Spain

^b INCLIVA Biomedical Research Institute, Valencia, Spain

^c Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, Valencia, Spain

^d EpiDisease S.L. (Spin-Off CIBER-ISCIII), Parc Científic de la Universitat de València, Paterna, 46980 Valencia, Spain

^e Division of Cardiovascular Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA

^f Intensive Care Unit, Clinical University Hospital of Valencia, Valencia 46010, Spain

^g John Ochsner Heart and Vascular Institute, Ochsner Clinical School, The University of Queensland School of Medicine, New Orleans, LA, USA

ARTICLE INFO

Available online xxxx

ABSTRACT

The mechanisms occurring during sepsis that produce an increased risk of cardiovascular (CV) disease (CVD) are poorly understood. Even less information exists regarding CV dysfunction as a complication of sepsis, particularly for sepsis-induced cardiomyopathy. However, recent research has demonstrated that non-coding RNAs, including microRNAs, long non-coding RNAs, and circular RNAs, play a crucial role in genetic reprogramming, gene regulation, and inflammation during the development of CVD. Here we describe experimental findings showing the importance of non-coding RNAs mediating relevant mechanisms underlying CV dysfunction after sepsis, so contributing to sepsis-induced cardiomyopathy. Importantly, non-coding RNAs are critical novel regulators of CVD risk factors. Thus, they are potential candidates to improve diagnostics and prognosis of sepsis-induced cardiomyopathy and other CVD events occurring after sepsis and set the basis to design novel therapeutic strategies.

© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords:
Non-coding RNAs
miRNAs
lnc-RNAs
circRNAs
Biomarkers
Sepsis
Cardiomyopathy
Epigenetics

*Review*

Oxidative Stress and Inflammation in COVID-19-Associated Sepsis: The Potential Role of Anti-Oxidant Therapy in Avoiding Disease Progression

Jesús Beltrán-García ^{1,2,3,4,†}, Rebeca Osca-Verdegal ^{2,†}, Federico V. Pallardó ^{1,2,3,4,✉}, José Ferreres ^{3,§}, María Rodríguez ^{3,§}, Sandra Mulet ^{3,§}, Fabian Sanchis-Gomar ^{2,3,✉}, Nieves Carbonell ^{3,5,*} and José Luis García-Giménez ^{1,2,3,4,✉}

¹ Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Institute of Health Carlos III, 46010 Valencia, Spain; jesus.beltran@ext.uv.es (J.B.-G.); federico.v.pallardo@uv.es (F.V.P.)

² Department of Physiology, Faculty of Medicine & Dentistry, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain; rebeca.osca@gmail.com (R.O.-V.); fabian.sanchis@uv.es (F.S.-G.)

³ INCLIVA Biomedical Research Institute, 46010 Valencia, Spain; ferreresj@gmail.com (J.F.); mariarodriguezgimillo@gmail.com (M.R.); sandramuletmascarell@gmail.com (S.M.)

⁴ EpiDisease S.L. (Spin-Off CIBER-ISCIII), Parc Científic de la Universitat de València, 46980 Paterna, Valencia, Spain

⁵ Intensive Care Unit, Clinical University Hospital of Valencia, 46010 Valencia, Spain

* Correspondence: edurnecarbonell@yahoo.es (N.C.); J.luis.garcia@uv.es (J.L.G.-G.); Tel.: +34-9638-64646 (N.C. & J.L.G.-G.)

† Authors contributed equally.

Received: 4 August 2020; Accepted: 27 September 2020; Published: 29 September 2020



Abstract: Since the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) outbreak emerged, countless efforts are being made worldwide to understand the molecular mechanisms underlying the coronavirus disease 2019 (COVID-19) in an attempt to identify the specific clinical characteristics of critically ill COVID-19 patients involved in its pathogenesis and provide therapeutic alternatives to minimize COVID-19 severity. Recently, COVID-19 has been closely related to sepsis, which suggests that most deceases in intensive care units (ICU) may be a direct consequence of SARS-CoV-2 infection-induced sepsis. Understanding oxidative stress and the molecular inflammation mechanisms contributing to COVID-19 progression to severe phenotypes such as sepsis is a current clinical need in the effort to improve therapies in SARS-CoV-2 infected patients. This article aims to review the molecular pathogenesis of SARS-CoV-2 and its relationship with oxidative stress and inflammation, which can contribute to sepsis progression. We also provide an overview of potential antioxidant therapies and active clinical trials that might prevent disease progression or reduce its severity.

Keywords: SARS-CoV-2; sepsis; ACE2; pyroptosis; NETosis; cytokine storm

Sepsis and Coronavirus Disease 2019: Common Features and Anti-Inflammatory Therapeutic Approaches

Jesús Beltrán-García, MSc¹⁻⁴; Rebeca Osca-Verdegal, MSc²; Federico V. Pallardó, PhD, MD¹⁻⁴; José Ferreres, PhD, MD^{1,5}; María Rodríguez, MD^{1,5}; Sandra Mulet, MD^{1,5}; Carolina Ferrando-Sánchez, MD^{1,5}; Nieves Carbonell, PhD, MD^{1,5}; José Luis García-Giménez, PhD¹⁻⁴

Abstract: Great efforts are being made worldwide to identify the specific clinical characteristics of infected critically ill patients that mediate the associated pathogenesis, including vascular dysfunction, thrombosis, dysregulated inflammation, and respiratory complications. Recently, coronavirus disease 2019 has been closely related to sepsis, which suggests that most deaths in ICUs in infected patients are produced by viral sepsis. Understanding the physiopathology of the disease that lead to sepsis after severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection is a current clinical need to improve intensive care–applied therapies applied to critically ill patients. Although the whole representative data characterizing the immune and inflammatory status in coronavirus disease 2019 patients are not completely known, it is clear that hyperinflammation and coagulopathy contribute to disease severity. Here, we present some common features shared by severe coronavirus disease 2019 patients and sepsis and describe proposed anti-inflammatory therapies for coronavirus disease 2019 which have been previously evaluated in sepsis.

Key Words: anti-inflammatory therapy; cytokine storm; sepsis; severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

overwhelming and jeopardized most critical care capacity in several hospitals worldwide (1). Clinically, most patients infected by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) present no severe symptomatology, but almost 5% of patients show severe lung injury or even Multiple Organ Dysfunction Score (MODS), with mortality at the ICUs between 8% and 38% depending on the country (2). Interestingly, most SARS-CoV-2-infected patients admitted to ICU showed a dysregulated host response characterized by hyperinflammation, alterations in the coagulation, and dysregulation in the immune response (3) that further contribute to MODS, like occurs in sepsis (4, 5).

In particular, some COVID-19 patients show metabolic acidosis, high levels of lactate, and abnormal coagulation variables (i.e. D-dimer, abnormal fibrin degradation products levels) (6), which are indicative of microcirculation dysfunction (7, 8). In fact, these patients suffer from coagulopathy (9), and about 2.5% of COVID-19 patients showed evidence of disseminated intravascular coagulation (DIC) (10-12). It seems that the challenge in recognizing disease complications in COVID-19 patients remains in the heterogeneity manifested in these patients as occurs also in sepsis.

Due to virus infection and to MODS in some cases, many patients with severe COVID-19 meet the Third International Consensus Definitions for Sepsis (Sepsis-3) (13), which define sepsis as "a life-threatening condition that arises when the body's response to infection damages the host's own tissues" (13). It is noteworthy that after Sepsis-3 consensus, both pro- and anti-inflammatory responses were considered to occur simultaneously during sepsis (14).

In this scenario, most deaths in critically ill COVID-19 patients are caused by sepsis (15, 16). In fact, the clinical characteristics shown by these patients meet the typically associated features of septic patients (17, 18). Interestingly, when performing specimen cultures in septic patients from a COVID-19 cohort, about 80% of patients had no bacterial or fungal infection. So viral infection would seem to be the only reason for sepsis (18, 19). Therefore, sepsis is expected to worsen the clinical phenotypes of these critically ill COVID-19 patients (19).

SEVERE CORONAVIRUS DISEASE 2019 MAINTAINS COMMON FEATURES TO SEPSIS

During coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak, the surge in patients requiring ICU admission has been

¹Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Institute of Health Carlos III, Valencia, Spain.

²Department of Physiology, Faculty of Medicine & Dentistry, University of Valencia, Valencia, Spain.

³INCLIVA Biomedical Research Institute, Valencia, Spain.

⁴Intensive Care Unit, Clinical University Hospital of Valencia, Valencia, Spain.

⁵EpDisease S.L. (Spin-OH CIBER-ISCIII), Parc Científic de la Universitat de València, Valencia, Spain.

Copyright © 2020 by the Society of Critical Care Medicine and Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved.

DOI: 10.1097/CCM.0000000000004625

*Review*

Circular RNAs in Sepsis: Biogenesis, Function, and Clinical Significance

Jesús Beltrán-García ^{1,2,3,†}, Rebeca Osca-Verdegal ^{2,3,‡}, Elena Nacher-Sendra ³, Federico V. Pallardo ^{1,2,3,¶} and José Luis García-Giménez ^{1,2,3,*¶}

¹ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain; jesus.beltran@ext.uv.es (J.B.-G.); federico.v.pallardo@uv.es (F.V.P.)

² Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, 46010 Valencia, Spain; rebeca.osca@gmail.com

³ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València, 46010 València, Spain; elena_nacher@hotmail.com

* Correspondence: j.luis.garcia@uv.es

† These authors contributed equally to this paper.

Received: 29 April 2020; Accepted: 24 June 2020; Published: 25 June 2020



Abstract: Sepsis is a life-threatening condition that occurs when the body responds to an infection that damages its own tissues. The major problem in sepsis is rapid, vital status deterioration in patients, which can progress to septic shock with multiple organ failure if not properly treated. As there are no specific treatments, early diagnosis is mandatory to reduce high mortality. Despite more than 170 different biomarkers being postulated, early sepsis diagnosis and prognosis remain a challenge for clinicians. Recent findings propose that circular RNAs (circRNAs) may play a prominent role in regulating the patients' immune system against different pathogens, including bacteria and viruses. Mounting evidence also suggests that the misregulation of circRNAs is an early event in a wide range of diseases, including sepsis. Despite circRNA levels being altered in sepsis, the specific mechanisms controlling the dysregulation of these noncoding RNAs are not completely elucidated, although many factors are known to affect circRNA biogenesis. Therefore, there is a need to explore the molecular pathways that lead to this disorder. This review describes the role of this new class of regulatory RNAs in sepsis and the feasibility of using circRNAs as diagnostic biomarkers for sepsis, opening up new avenues for circRNA-based medicine.

Keywords: circular RNAs (circRNAs); alternative splicing; transcription; biomarker; epigenetics; sepsis

EPIGENOMICS, VOL. 12, NO. 7 | REVIEW

normal

Epigenetic biomarkers for human sepsis and septic shock: insights from immunosuppression

Jesús Beltrán-García[†], Rebeca Osca-Verdegal[‡], Carlos Romá-Mateo, Nieves Carbonell, José Ferreres, María Rodríguez, Sandra Mulet, Eva García-López, Federico V Pallardó & José Luis García-Giménez

Published Online: 12 May 2020 | <https://doi.org/10.2217/epi-2019-0329>

Tools Share

Sepsis is a life-threatening condition that occurs when the body responds to an infection damaging its own tissues. Sepsis survivors sometimes suffer from immunosuppression increasing the risk of death. To our best knowledge, there is no 'gold standard' for defining immunosuppression except for a composite clinical end point. As the immune system is exposed to epigenetic changes during and after sepsis, research that focuses on identifying new biomarkers to detect septic patients with immunoparalysis could offer new epigenetic-based strategies to predict short- and long-term pathological events related to this life-threatening state. This review describes the most relevant epigenetic mechanisms underlying alterations in the innate and adaptive immune responses described in sepsis and septic shock, and their consequences for immunosuppression states, providing several candidates to become epigenetic biomarkers that could improve sepsis management and help predict immunosuppression in postseptic patients.

Keywords: **circulating histones • DNA methylation • epigenetic biomarkers • histones PTMs • immunosuppression • miRNAs • PICS • sepsis • septic shock**



Epigenetic IVD Tests for Personalized Precision Medicine in Cancer

Jesús Beltrán-García^{1,2,3}, Rebeca Osca-Verdegal^{2,3}, Salvador Mena-Mollá^{3,4*} and José Luis García-Giménez^{1,2,3,4*}

¹ Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Institute of Health Carlos III, Valencia, Spain,

² INCLIVA Biomedical Research Institute, Valencia, Spain, ³ Department of Physiology, School of Medicine and Dentistry, Universitat de València (UV), Valencia, Spain, ⁴ EpiDisease S.L. Spin-Off of CIBERER (ISCI), Valencia, Spain

Epigenetic alterations play a key role in the initiation and progression of cancer. Therefore, it is possible to use epigenetic marks as biomarkers for predictive and precision medicine in cancer. Precision medicine is poised to impact clinical practice, patients, and healthcare systems. The objective of this review is to provide an overview of the epigenetic testing landscape in cancer by examining commercially available epigenetic-based *in vitro* diagnostic tests for colon, breast, cervical, glioblastoma, lung cancers, and for cancers of unknown origin. We compile current commercial epigenetic tests based on epigenetic biomarkers (i.e., DNA methylation, miRNAs, and histones) that can actually be implemented into clinical practice.

Keywords: precision medicine, epigenetic biomarker, In Vitro Diagnostic (IVD), DNA methylation, miRNA, cfDNA, circulating nucleosomes

ANEXO 2: Trabajos publicados en colaboraciones durante la Tesis Doctoral

Molecular Neurobiology
<https://doi.org/10.1007/s12035-021-02445-3>



Role of microRNAs As Biomarkers in Sepsis-Associated Encephalopathy

Rebeca Osca-Verdegal^{1,2} · Jesús Beltrán-García^{2,3} · Federico V. Pallardó^{1,2,3} · José Luis García-Giménez^{1,2,3}

Received: 10 March 2021 / Accepted: 6 June 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

Sepsis-associated encephalopathy (SAE) is a neurological complication of sepsis, characterized by brain dysfunction without any direct central nervous system infection. The diagnosis of SAE is currently a challenge. In fact, problems in making a diagnosis of SAE cause a great variability of incidence that can reach up to 70% of all septic patients. Even more, despite SAE is the most frequent type of encephalopathy occurring in critically ill patients, the molecular mechanisms that guide its progression have not been completely elucidated. On the other hand, miRNAs have proven to be excellent biomarkers for both diagnosis and prognosis, especially in brain pathologies because of their small size they can cross the blood–brain barrier easier than other biomolecules. The identification of new miRNAs as biomarkers may help to improve SAE diagnosis and prognosis and also to design new therapies for this clinical manifestation that produces diffuse cerebral dysfunction. This review is focused on SAE physiopathology and the need to have clear criteria for its diagnosis; thus, this work postulates some miRNA candidates to be used for SAE biomarkers because of their role in both, neurological damage and sepsis.

Keywords Sepsis-associated encephalopathy · Sepsis · Biomarkers · microRNAs



DNA Methylation Analysis to Unravel Altered Genetic Pathways Underlying Early Onset and Late Onset Neonatal Sepsis. A Pilot Study

OPEN ACCESS
Edited by:

Jing Hui Wang,
University College Cork, Ireland

Reviewed by:

Tin Rehmel,
University Hospital Bonn
GmbH, Germany
Vishnu Bhat,
Aanapadi Veedu Medical College and
Hospital, India

***Correspondence:**

José Luis García-Giménez
jl.garcia@uv.es

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Inflammation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 28 October 2020

Accepted: 25 January 2021

Published: 15 February 2021

Citation:

Lorente-Pozo S, Navarrete P,
García-MJ, Lara-Cantón L,
Beltrán-García J, Osca-Verdegal R,
Mena-Mollá S, García-López E,
Vento M, Pallardó JV and
García-Giménez JL (2021) DNA
Methylation Analysis to Unravel
Altered Genetic Pathways Underlying
Early Onset and Late-Onset Neonatal
Sepsis. A Pilot Study.
Front. Immunol. 12:522532.
doi: 10.3389/fimmu.2021.622599

Sheila Lorente-Pozo^{1,2†}, Paula Navarrete^{2†}, María José Garzón³,
Inmaculada Lara-Cantón^{1,2}, Jesús Beltrán-García^{4,5}, Rebeca Osca-Verdegal^{2,3},
Salvador Mena-Mollá^{3,5}, Eva García-López³, Máximo Vento^{1,2}, Federico V. Pallardó^{3,4,5} and
José Luis García-Giménez^{2,4,5*}

¹ Neonatal Research Group, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain, ² Division of Neonatology, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain, ³ EpiDiseases SL (Spin-off from the CIBER-ISCIII), Parc Científico de la Universidad de Valencia, Paterna, Spain, ⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia, Spain, ⁵ Department Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia-IUCLIVA, Valencia, Spain

Background: Neonatal sepsis is a systemic condition widely affecting preterm infants and characterized by pro-inflammatory and anti-inflammatory responses. However, its pathophysiology is not yet fully understood. Epigenetics regulates the immune system, and its alteration leads to the impaired immune response underlying sepsis. DNA methylation may contribute to sepsis-induced immunosuppression which, if persistent, will cause long-term adverse effects in neonates.

Objective: To analyze the methylome of preterm infants in order to determine whether there are DNA methylation marks that may shed light on the pathophysiology of neonatal sepsis.

Design: Prospective observational cohort study performed in the neonatal intensive care unit (NICU) of a tertiary care center.

Patients: Eligible infants were premature \leq 32 weeks admitted to the NICU with clinical suspicion of sepsis. The methylome analysis was performed in DNA from blood using Infinium Human Methylation EPIC microarrays to uncover methylation marks.

Results: Methylation differential analysis revealed an alteration of methylation levels in genomic regions involved in inflammatory pathways which participate in both the innate and the adaptive immune response. Moreover, differences between early and late onset sepsis as compared to normal controls were assessed.

Conclusions: DNA methylation marks can serve as a biomarker for neonatal sepsis and even contribute to differentiating between early and late onset sepsis.

Keywords: neonatology and pediatric intensive care, DNA methylation, sepsis, inflammation, immunosuppression

JLPM JOURNAL OF LABORATORY AND PRECISION MEDICINE
AN OPEN ACCESS JOURNAL FOR HIGH-QUALITY RESEARCH IN LABORATORY MEDICINE

Title
 Search

[Home](#) [Journal Info](#) [For Authors](#) [For Reviewers](#) [Special Contents](#) [Archives](#) [Online First](#) [Article Processing Charge](#)

[Home](#) / [Vol 3, No 3 \(March 2018\)](#) / Epigenetic biomarkers in cardiovascular disease

Review Article



Epigenetic biomarkers in cardiovascular disease

Alejandro Cardona-Monzonís¹, Jesús Beltrán-García^{1,2}, José Santiago Ibañez-Cabellos^{1,2,3}, Gisselle Pérez-Machado^{1,4,5}, Kabir Malkani⁶, Fabian Sanchis-Gomar^{1,2,6}, Salvador Mena-Mollá^{1,5}, José Luis García-Giménez^{1,2,3,4,5}

¹Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, Valencia, Spain; ²INCLIVA Biomedical Research Institute, Valencia, Spain; ³Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Institute of Health Carlos III, Valencia, Spain; ⁴Epigenetics Research Platform (CIBERER/UV/INCLIVA), Valencia, Spain; ⁵EpiDisease S.L. Paterna, Valencia, Spain; ⁶Leon H. Charney Division of Cardiology, New York University School of Medicine, New York, USA

Contributions: (I) Conception and design: JL García-Giménez, S Mena-Mollá, F Sanchis-Gomar, G Pérez-Machado; (II) Administrative support: None; (III) Provision of study materials or patients: None; (IV) Collection and assembly of data: G Pérez-Machado, A Cardona-Monzonís, J Beltrán-García, JS Ibañez-Cabellos; (V) Data analysis and interpretation: JL García-Giménez, S Mena-Mollá, A Cardona-Monzonís, J Beltrán-García; (VI) Manuscript writing: All authors; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

Correspondence to: José Luis García-Giménez, PhD. Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Medicine and Dentistry School, University of Valencia, Av/Blasco Ibañez, 14, 46010 Valencia, Spain. Email: j.luis.garcia@uv.es; Salvador Mena Mollá, PhD. Medicine and Dentistry School. University of Valencia, Av/Blasco Ibañez, 14, 46010 Valencia, Spain. Email: Salvador.mena@uv.es.

Abstract: In recent years we have lived a technological revolution that has made it possible to decipher the human genome. However, most diseases, such as cardiovascular diseases (CVDs), are not simply due only to genetic alteration but also to epigenetic events conditioned by environmental inputs and lifestyle. Epigenetics explains the ability to modulate gene expression without altering the genetic sequence. Epigenetic biomarkers are revolutionizing precision medicine and improving the capacity of diagnosing and prognosticating CVDs and predicting the risk of future comorbidities. This review presents a list of the most reliable epigenetic biomarkers (i.e., based on DNA methylation, circulating histones and circulating miRNAs) which will probably improve the diagnostic and prognostic of several CVD conditions, such as coronary artery disease (CAD), hypertrophic cardiomyopathy (HCM), acute myocardial infarction (AMI) and heart failure (HF).

Keywords: Epigenetic biomarkers, microRNAs (miRNAs); DNA methylation; circulating histones and nucleosomes; cardiovascular disease (CVD)

Received: 25 October 2017; Accepted: 05 February 2018; Published: 15 March 2018.

doi: 10.21037/jlpm.2018.02.04

Review > *Clin Chem Lab Med.* 2017 Aug 28;55(10):1474-1477. doi: 10.1515/cclm-2016-1162.

Challenges in the analysis of epigenetic biomarkers in clinical samples

José Luis García-Giménez ¹, Salvador Mena-Mollá ¹, Jesús Beltrán-García ¹,
Fabian Sanchis-Gomar ¹

Affiliations + expand

PMID: 28301317 DOI: [10.1515/cclm-2016-1162](https://doi.org/10.1515/cclm-2016-1162)

Abstract

Epigenetic modifications represent an interesting landscape which can describe relevant features of human disease. Epigenetic biomarkers show several advantages as disease biomarkers because they provide information about gene function, specific endophenotypes and can even incorporate information from the environment and the natural history of disease. The improvement in genomic and epigenomic technologies has revolutionized the current comprehension of biological processes underlying health and disease. However, now is the time to adopt these new technologies to improve human health, thus converting this information into reliable biomarkers. This endeavor should be focused on improving methodologies to analyze gene methylation, histone modifications and microRNAs. Ideally, epigenetic biomarkers should be robust, routine, accurate and inexpensive in order to provide better information for patient diagnosis, prognosis, stratification and treatment monitoring. Here we describe some challenges and provide strategies to improve the adoption of epigenetic biomarkers into clinical routine. Furthermore, we summarize the recommended properties for clinical epigenetic biomarkers.

Keywords: ChIP assay; DNA methylation; formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE); liquid biopsy; microRNAs (miRNAs).

Hindawi
Stem Cells International
Volume 2017, Article ID 8920356, 14 pages
<https://doi.org/10.1155/2017/8920356>

Research Article

Cellular Responses in Human Dental Pulp Stem Cells Treated with Three Endodontic Materials

Alejandro Victoria-Escandell,¹ José Santiago Ibañez-Cabellos,^{2,3,4}
Sergio Bañuls-Sánchez de Cutanda,^{4,5} Ester Berenguer-Pascual,³ Jesús Beltrán-García,³
Eva García-López,³ Federico V. Pallardó,^{2,3,4} José Luis García-Giménez,^{2,3,4}
Antonio Pallarés-Sabater,¹ Ignacio Zarzosa-López,¹ and Manuel Monterde¹

¹Department of Endodontics, Faculty of Medicine and Dentistry, Catholic University of Valencia "San Vicente Mártir", C/Quevedo, 2, 46001 Valencia, Spain

²Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), CIBER-ISCIII, Valencia, Spain

³Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, Av. Blasco Ibañez 15, 46010 Valencia, Spain

⁴INCLIVA Health Research Institute, Av. de Menéndez y Pelayo 4, 46010 Valencia, Spain

⁵Cell Culture Laboratory, Central Unit of Research in Medicine (UCIM), University of Valencia, Av. Blasco Ibañez 15, 46010 Valencia, Spain

Correspondence should be addressed to Alejandro Victoria-Escandell; alejandro.victoria@ucv.es

Received 17 January 2017; Revised 22 March 2017; Accepted 12 April 2017; Published 24 May 2017

Academic Editor: Andrea Ballini

Copyright © 2017 Alejandro Victoria-Escandell et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Human dental pulp stem cells (HDPSCs) are of special relevance in future regenerative dental therapies. Characterizing cytotoxicity and genotoxicity produced by endodontic materials is required to evaluate the potential for regeneration of injured tissues in future strategies combining regenerative and root canal therapies. This study explores the cytotoxicity and genotoxicity mediated by oxidative stress of three endodontic materials that are widely used on HDPSCs: a mineral trioxide aggregate (MTA-Angelus white), an epoxy resin sealant (AH-Plus cement), and an MTA-based cement sealer (MTA-Fillapex). Cell viability and cell death rate were assessed by flow cytometry. Oxidative stress was measured by OxyBlot. Levels of antioxidant enzymes were evaluated by Western blot. Genotoxicity was studied by quantifying the expression levels of DNA damage sensors such as ATM and RAD53 genes and DNA damage repair sensors such as RAD51 and PARP-1. Results indicate that AH-Plus increased apoptosis, oxidative stress, and genotoxicity markers in HDPSCs. MTA-Fillapex was the most cytotoxic oxidative stress inductor and genotoxic material for HDPSCs at longer times in preincubated cell culture medium, and MTA-Angelus was less cytotoxic and genotoxic than AH-Plus and MTA-Fillapex at all times assayed.

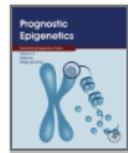
ANEXO 3: Capítulos de libro publicados durante la Tesis Doctoral



Prognostic Epigenetics

Volume 15 in Translational Epigenetics

2019, Pages 21-44



Chapter 2 - Epigenetic biomarkers for disease diagnosis

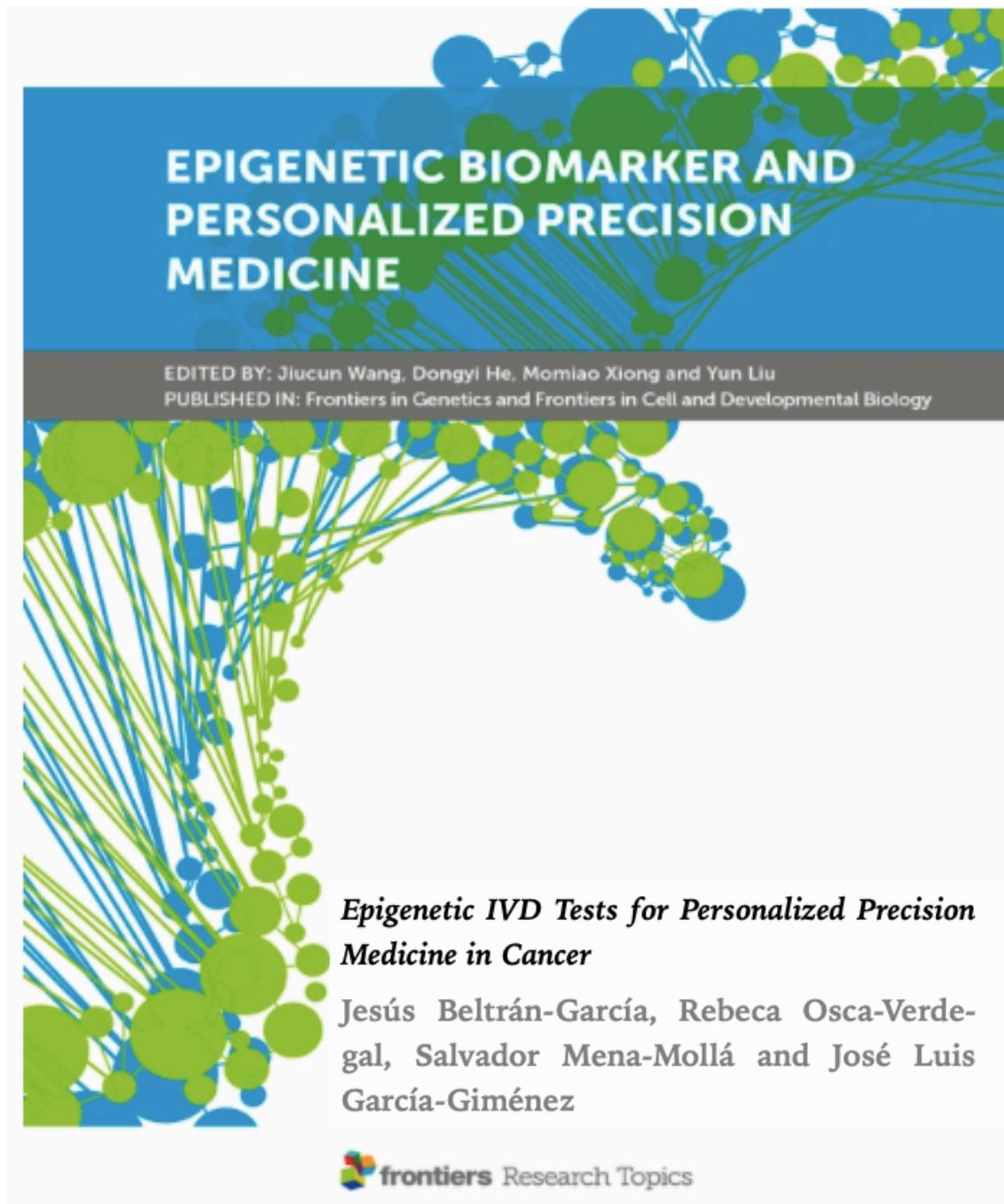
José Luis García-Giménez ^{*, †, ‡, §, ¶}, Jesús Beltrán-García ^{*, †, ‡}, Carlos Romá-Mateo ^{*, †, ‡, §}, Marta Seco-Cervera ^{*, †,}
[‡], Gisselle Pérez-Machado ^{†, ‡, §, ¶}, Salvador Mena-Mollá ^{‡, ¶}

[Show more ▾](#)[+ Add to Mendeley](#) [Share](#) [Cite](#)<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814259-2.00002-9>[Get rights and content](#)

Abstract

Epigenetic dysregulation plays an important role in the initiation and progression of human diseases; therefore, because of the dynamic nature of this orchestrated regulation of epigenetic marks and epigenetic mechanisms, it is possible to use these marks as biomarkers.

In this context, an epigenetic biomarker is “any epigenetic mark or altered epigenetic mechanism” which generally serves to evaluate health or disease status, progression or treatment response and is particularly stable and reproducible during sample processing. Advances in precision medicine, with better diagnostic and treatment strategies are the hope to improve the management of diseases, comorbidities, and mortality. For this purpose, biomarker research and discovery, especially in the field of epigenetics, has increased in recent years. Adoption of high-throughput technologies, such as next-generation sequencing (NGS) and mass spectrometry (MS) into the clinical laboratory, together with the development of epigenetic biomarkers, will help to introduce new epigenetics-based in vitro diagnostic (IVD) tests, thus improving medical decisions.





Tesis Doctoral
JESÚS BELTRÁN GARCÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLOGÍA

ENERO 2022