



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

**IDENTIFICACIÓN DE LOS MECANISMOS  
EPIGENÉTICOS RELACIONADOS CON LOS  
FENÓMENOS DE INMUNOSUPRESIÓN EN  
SEPSIS Y SU USO COMO BIOMARCADORES  
DE PRONÓSTICO**

**TESIS DOCTORAL DE  
REBECA OSCA VERDEGAL**

**DIRIGIDA POR  
PROF. FEDERICO V. PALLARDÓ  
PROF. JOSÉ LUIS GARCÍA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÓGÍA  
MARZO 2023**



**IDENTIFICACIÓN DE LOS MECANISMOS  
EPIGENÉTICOS RELACIONADOS CON LOS  
FENÓMENOS DE INMUNOSUPRESIÓN EN SEPSIS  
Y SU USO COMO BIOMARCADORES DE  
PRONÓSTICO**

Tesis Doctoral

Presentada por:

**REBECA OSCA VERDEGAL**

Dirigida por:

Dr. José Luis García Giménez

Dr. Federico V. Pallardó Calatayud

Tutor:

Dr. Federico V. Pallardó Calatayud

Valencia, marzo de 2023



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

D. José Luis García Giménez, Profesor ayudante doctor del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València. Correo electrónico: j.luis.garcia@uv.es

**CERTIFICA/N:**

Que la presente memoria, titulada “Identificación de los mecanismos epigenéticos relacionados con los fenómenos de inmunosupresión en sepsis y su uso como biomarcadores de pronóstico”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. Rebeca Osca Verdegall, 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 09 de marzo de 2023.

FEDERICO  
VICENTE|  
PALLARDO|  
CALATAYUD  
Firmado digitalmente  
por FEDERICO  
VICENTE|PALLARDO|  
CALATAYUD  
Fecha: 2023.03.06  
17:17:53 +01'00'

Fdo.: D. Federico V. Pallardó Calatayud  
Director y Tutor

Firmado  
digitalmente por  
GARCIA GIMENEZ  
JOSE LUIS -  
20441299A



Fdo.: D. José Luis García Giménez  
Director



Para la realización de esta tesis doctoral, la investigadora Rebeca Osca Verdegall ha disfrutado de una ayuda para la Formación en Investigación en Salud, 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 y 3 capítulos en libros internacionales editados por Elsevier (Anexos II y III). Así mismo, los resultados generados durante esta tesis doctoral se han presentado en 9 congresos científicos internacionales.





Gracias a los que permitís que mis sueños se hagan realidad:

José Luis y Fede, por haberme enseñado a ser la científica que soy hoy en día. Gracias por haberme ayudado a crecer y superarme.

A mi familia, por apoyarme en todas mis decisiones, a pesar de no ser siempre fáciles. Gracias por estar siempre presentes en *El Camino*.

A Jesús, por inspirarme y motivarme. Gracias por ser mi apoyo y mi constante recordatorio de que no hay límites.



*La esperanza está en los sueños, en la imaginación y en el coraje de quien se atreve a hacer sus sueños realidad.*

- Jonas Salk -



## Índice

<b>TABLA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....</b>	<b>7</b>
<b>1. RESUMEN / ABSTRACT .....</b>	<b>13</b>
1.1. Resumen.....	15
1.2. Abstract .....	17
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
2.1. Sepsis y shock séptico.....	21
2.2. El sistema inmunitario durante la sepsis .....	25
2.2.1. Hiperinflamación e inmunosupresión durante la sepsis.....	25
2.2.2. Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión..	27
2.3. Endotelio y daño vascular durante la sepsis .....	30
2.4. Epigenética en la sepsis .....	33
2.4.1. Modificaciones post-traduccionales de histonas: citrulinación .....	34
2.4.2. RNAs regulatorios en sepsis: microRNAs .....	38
2.4.3. Metilación como modificación epigenética en sepsis .....	40
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>49</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
5.1. Diseño experimental y selección de pacientes .....	59
5.1.1. Diseño experimental del estudio.....	59
5.1.2. Comité ético del estudio .....	59
5.2. Cultivos celulares.....	59
5.2.1. Cultivo celular de las células HeLa.....	60
5.2.2. Obtención de las células endoteliales de venas umbilicales humanas.....	60
5.3. Extracción y purificación de histonas en condiciones basales.....	60

<b>5.4.</b>	<b>Cuantificación de los extractos proteicos mediante el método de Bradford .....</b>	<b>62</b>
<b>5.5.</b>	<b>Citrulinación <i>in vitro</i> de las histonas mediante el uso de <i>PAD Cocktail Active</i>. .....</b>	<b>63</b>
<b>5.6.</b>	<b>Análisis de la expresión proteica mediante Western Blot .....</b>	<b>65</b>
5.6.1.	Preparación de la muestra .....	65
5.6.2.	Electroforesis .....	66
5.6.3.	Electrotransferencia .....	67
5.6.4.	Tinción del gel .....	67
5.6.5.	Bloqueo.....	67
5.6.6.	Detección de las proteínas.....	68
5.6.7.	Detección quimioluminiscente.....	70
<b>5.7.</b>	<b>Análisis de la viabilidad celular tras la exposición a histonas extracelulares nativas y citrulinadas .....</b>	<b>70</b>
5.7.1.	Test de MTT .....	70
5.7.2.	Citometría de Flujo.....	71
5.7.3.	Microscopía de campo claro .....	73
<b>5.8.</b>	<b>Extracción y purificación de RNA .....</b>	<b>73</b>
<b>5.9.</b>	<b>Análisis de la expresión génica .....</b>	<b>75</b>
<b>5.10.</b>	<b>Criterios de selección de pacientes .....</b>	<b>77</b>
<b>5.11.</b>	<b>Análisis de las histonas circulantes en muestras de plasma de pacientes con sepsis y shock séptico .....</b>	<b>80</b>
5.11.1.	Análisis de las histonas circulantes mediante espectrometría de masas.....	80
5.11.2.	Análisis de los niveles de H3 citrulinada .....	81
<b>5.12.</b>	<b>Análisis de expresión diferencial de miRNAs en plasma de pacientes con Sepsis, ECC y PICS .....</b>	<b>83</b>
5.12.1.	Análisis de expresión diferencial de miRNAs en plasma de pacientes con Sepsis, ECC y PICS	83
5.12.2.	Secuenciación de los miRNAs y procesado de datos .....	84
5.12.3.	Análisis de expresión diferencial de miRNAs entre grupos experimentales y enriquecimiento KEGG/GO.....	84
<b>5.13.</b>	<b>Análisis global de la metilación del DNA mediante el Array EPIC 850K .....</b>	<b>85</b>
5.13.1.	Extracción de DNA de PBMCs humanas.....	85
5.13.2.	Preparación y lectura de los arrays de metilación 850K mediante el sistema HiScan SQ (Illumina)	85

5.13.3.	Análisis de la metilación diferencial .....	86
<b>5.14.</b>	<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>87</b>
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>89</b>
6.1.	Inducción de la citrulinación <i>in vitro</i> en histonas extracelulares humanas .....	91
6.2.	Las histonas extracelulares citrulinadas no afectan a la viabilidad celular en HUVEC 92	
6.3.	La citrulinación de las histonas disminuye la capacidad de las histonas extracelulares para producir estrés oxidativo y la activación de la respuesta antioxidante mediada por las histonas extracelulares .....	94
6.4.	Las histonas extracelulares alteran la biosíntesis de prostanoïdes en HUVEC .....	97
6.5.	Las histonas extracelulares activan las vías de inflamación y modulan las vías de la biosíntesis de prostanoïdes en HUVEC.....	99
6.6.	Los niveles de histonas circulantes y citrulinadas son más elevados en los pacientes con fenotipos severos .....	102
6.7.	Correlaciones entre las características clínicas y los niveles de histonas circulantes y de H3 citrulinada.....	108
6.7.1.	Correlaciones en los pacientes supervivientes a un episodio de sepsis .....	108
6.7.2.	Correlaciones en los pacientes supervivientes a un episodio de Shock Séptico .....	111
6.7.3.	Correlaciones en los pacientes no supervivientes al Shock Séptico .....	114
6.8.	Diferencias en las características clínicas de los pacientes sépticos y los subtipos clínicos ECC y PICS. ....	119
6.9.	Los pacientes sépticos, con ECC y PICS presentan diferentes patrones de expresión de microRNAs .....	121
6.9.1.	Análisis de la expresión diferencial y contextualización biológica entre ECC y Sepsis...123	
6.9.2.	Análisis de la expresión diferencial y contextualización biológica entre PICS y Sepsis..127	
6.9.3.	Análisis de la expresión diferencial y contextualización biológica entre PICS y ECC.....135	
6.9.4.	Análisis de la expresión diferencial y contextualización biológica entre pacientes con PICS a las 24h de ingreso (PICS-A) y los pacientes con PICS a los 14 días de ingreso en UCI (PICS-C)	
	140	
6.10.	Los PBMCs de los pacientes con sepsis, con ECC y PICS presentan diferentes patrones de metilación del DNA .....	155

6.10.1.	Análisis de enriquecimiento funcional entre ECC y Sepsis.....	158
6.10.2.	Análisis de enriquecimiento funcional entre PICS y ECC.....	164
6.10.3.	Análisis de enriquecimiento funcional de los pacientes PICS durante su evolución clínica (entre 24 horas y 14 días).....	173
<b>6.11.</b>	<b>Integración de las rutas comunes entre los cambios de miRNAs y de metilación en pacientes con PICS .....</b>	<b>181</b>
<b>7.</b>	<b><i>LIMITACIONES DEL ESTUDIO</i>.....</b>	<b>185</b>
<b>8.</b>	<b><i>CONCLUSIONES / CONCLUSIONS</i> .....</b>	<b>189</b>
8.1.	Conclusiones.....	191
8.2.	Conclusions.....	192
<b>9.</b>	<b><i>SUMMARY</i>.....</b>	<b>193</b>
9.1.	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>195</b>
9.1.1.	<b>Sepsis and septic shock.....</b>	<b>195</b>
9.1.2.	<b>Immune system during sepsis.....</b>	<b>198</b>
9.1.2.1.	Hyperinflammation and immunosuppression during sepsis.....	198
9.1.2.2.	Syndrome of persistent inflammation, activation of catabolism and immunosuppression 200	
9.1.3.	<b>Endothelium and vascular damage during sepsis .....</b>	<b>201</b>
9.1.4.	<b>Sepsis epigenetics .....</b>	<b>203</b>
9.1.4.1.	Post-translational histone modifications: citrullination.....	204
9.1.4.2.	Regulatory RNAs in sepsis: microRNAs .....	207
9.1.4.3.	Methylation as epigenetic modification in sepsis .....	209
9.2.	<b>HYPOTHESIS.....</b>	<b>213</b>
9.3.	<b>OBJECTIVES.....</b>	<b>213</b>
9.4.	<b>RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>214</b>
9.4.1.	<b><i>In vitro</i> induction citrullination in human extracellular histones .....</b>	<b>214</b>
9.4.2.	<b>Citrullinated extracellular histones do not affect cell viability in HUVEC .....</b>	<b>215</b>



<b>9.4.3. Histone citrullination decreases the ability of extracellular histones to produce oxidative stress and the activation of the antioxidant response mediated by extracellular histones</b>	<b>216</b>
<b>9.4.4. Extracellular histones alter prostanoid biosynthesis in HUVEC.....</b>	<b>217</b>
<b>9.4.5. Extracellular histones activate inflammatory pathways and modulate prostanoid biosynthesis pathways in HUVEC .....</b>	<b>218</b>
<b>9.4.6. Circulating and citrullinated histone levels are higher in patients with severe phenotypes.....</b>	<b>220</b>
<b>9.4.7. Correlations between clinical features and circulating histones and citrullinated H3 levels</b>	<b>222</b>
9.4.7.1. Correlations in patients surviving a sepsis episode .....	223
9.4.7.2. Correlations in patients surviving a septic shock episode.....	224
9.4.7.3. Correlations in patients' non-survivors to a septic shock episode .....	225
<b>9.4.8. Differences in clinical characteristics of septic patients and clinical subtypes CCI and PICS.</b>	<b>227</b>
<b>9.4.9. Septic, ECC, and PICS patients present different microRNA expression patterns.</b>	<b>228</b>
9.4.9.1. Analysis of differential expression and biological contextualization between ECC and Sepsis.	229
9.4.9.2. Analysis of differential expression and biological contextualization between PICS and Sepsis.	231
9.4.9.3. Analysis of differential expression and biological contextualization between PICS and ECC.	235
9.4.9.4. Analysis of differential expression and biological contextualization between patients with PICS at 24 hours of admission (PICS-A) and patients with PICS at 14 days of admission to the ICU (PICS-C).....	237
<b>9.4.10. PBMCs from patients with sepsis, CCI, and PICS present different patterns of DNA methylation .....</b>	<b>244</b>
<b>9.4.10.1. Analysis of functional enrichment between ECC and Sepsis .....</b>	<b>246</b>
9.4.10.1.1. Promoters and genes with differential methylation between ECC and Sepsis.....	248
<b>9.4.10.2. Analysis of functional enrichment between PICS and CCI .....</b>	<b>249</b>
9.4.10.2.1. Promoters and genes with differential methylation between PICS and CCI.....	251

<b>9.4.10.3. Analysis of functional enrichment of PICS patients during their clinical evolution (between 24 hours and 14 days).</b>	<b>253</b>
9.4.10.3.1. Promoters and genes with differential methylation between PICS-C and PICS-A	254
<b>9.4.11. Integration of common pathways between miRNA and methylation changes in patients with PICS</b>	<b>256</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>259</b>
<b>11. ANEXOS</b>	<b>299</b>
<b>11.1. ANEXOS I: Resultados anexos (tablas y figuras suplementarias)</b>	<b>301</b>
➤ Selección de pacientes (Apartado 4.10)	302
➤ Correlaciones entre las características clínicas y los niveles de histonas circulantes y de H3 citrulinada (apartado 5.7)	303
➤ Promotores y genes con metilación diferencial entre ECC y Sepsis (apartado 5.10.1.1.)	313
➤ Promotores y genes con metilación diferencial entre PICS y ECC (Apartado 5.10.2.1)	315
➤ Promotores y genes con metilación diferencial entre PICS-C y PICS-A (Apartado 5.10.3.1)	317
<b>11.2. ANEXOS II: Trabajos publicados como primera autora durante la Tesis Doctoral</b>	<b>319</b>
<b>11.3. ANEXOS III: Trabajos publicados en colaboraciones durante la Tesis Doctoral</b>	<b>325</b>

# **TABLA DE ABREVIATURAS**



ACh	Acetilcolina
APTT	Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada
BA	Bicarbonato de amonio
BBB	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina de suero bovino
CARS	Síndrome de Respuesta Antiinflamatoria Compensatoria
CE	Energía de colisión
circRNAs	RNAs circulares
CLP	punción cecal
COX	Ciclooxigenasa
DAMPs	Patrones Moleculares Asociados a daño celular
DD	Dímero D
DIC	Cogulación Intravascular Diseminada
DMR	Región con metilación diferencial
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Reducción de potencia
DTT	Ditiotreitol
E-SEL	Selectina endotelial
ECC	Enfermedad Crítica Crónica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Espectrometría de masas
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EP	Potencial de entrada
ERN	Especies Reactivas del Nitrógeno
ERO	Especies Reactivas del Oxígeno
ET	Trampas Extracelulares
EXP	Potencial de salida
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
H3cit	Histona H3 citrulinada
HCUV	Hospital Clínico Universitario de Valencia
HUVECs	Células endoteliales de venas umbilicales humanas
IAM	Yodoacetamida
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN	Inteferon
IL	Interleuquina
IMC	Índice de Masa Corporal
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP	Ioduro de propidio
lncRNAs	RNA no codificantes largos
logFC	Logaritmo de Fold Change
LPS	Lipopolisacárido

MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz - Tiempo de vuelo
MDSC	Células supresoras derivadas de células mieloides
METs	Trampas Extracelulares de Macrófagos
miRNAs	MicroRNAs
MODS	Síndrome de Disfunción Multiorgánica
MPTs	Modificaciones post-traduccionales
MRM	Monitoreo de reacción múltiple
MTT	Sal soluble de tetrazolio
nc-RNAs	RNAs no codificantes
NETs	Trampas Extracelulares de Neutrófilo
NO	Oxido nítrico
NT	Neurotransmisor
P-Selectina	Selectina Plaquetaria
PAD	<i>Peptidilarginina Deiminasa</i>
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PCA	Análisis de Componentes principales
PCA	Proteína C Activada
PCR	Proteína C reactiva
PCT	Procalcitonina
PGIS	Prostaciclina sintasa
PICS	Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión
PMN	Células polimorfonucleares
PRF1	Perforinas
ProtFuncC	Proteína C Funcional
PS	Fosfatidilserina
PSGL-1	Glicoproteína de la P-selectina
PTMs	Modificaciones post-traduccionales de histonas
qSOFA	SOFA rápido
RNA-seq	Técnicas de secuenciación del RNA
RTq-PCR	PCR cuantitativa o en tiempo real
SAE	Encefalopatía asociada a sepsis
SBF	Suero bovino fetal
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con docecilsulfato sódico
SEL	Selectina
sICAM	ICAM-1 soluble
SIRS	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica
smallRNA-seq	Secuenciación de pequeños RNAs
SOFA	Puntuación secuencial de evaluación de la insuficiencia orgánica
SS	Shock séptico
TBXAS	Tromboxano sintasa

Tesis Doctoral Rebeca Osca-Verdegal

TCA	Tricloroacético
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TFA	Acido trifluoroacético
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Células T reguladoras
TropUS	Troponina Ultra Sensible
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1
WB	Western Blot





# **ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**



## INTRODUCCIÓN

- Figura 1 Principales alteraciones orgánicas que ocurren durante el proceso séptico.
- Figura 2 Alteraciones metabólicas que se dan en la encefalopatía asociada a sepsis.
- Figura 3 Esquema simplificado de SIRS, CARS, ECC y PICS durante la respuesta inmune en sepsis
- Figura 4 Parámetros que definen a los pacientes con sepsis, ECC y PICS
- Figura 5 Esquema de la regulación de la respuesta molecular temprana en pacientes con SS.
- Figura 6 Fuentes de histonas circulantes.
- Figura 7 Reacción de desaminación catalizada por las PAD
- Figura 8 Control epigenético de la diferenciación y función de las células del sistema inmunitario innato.
- Figura 9 Control epigenético de la diferenciación y función de las células del sistema inmunitario adaptativo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- Tabla 1 Receta empleada para el Tampón Hipotónico de Lisis
- Tabla 2 Cálculos para realizar la curva patrón de BSA.
- Tabla 3 Tampones necesarios para la citrulinación *in vitro* de histonas
- Figura 10 Resumen del flujo de trabajo
- Tabla 4 Receta del tampón de carga.
- Tabla 5 Geles y tampones necesarios para el WB.
- Tabla 6 Tampón de transferencia.
- Tabla 7 Tampón de bloqueo.
- Tabla 8 Anticuerpos empleados en WB.
- Tabla 9 Resumen de los indicadores de citometría de flujo
- Tabla 10 Receta del Mix de PCR
- Tabla 11 Lista de sondas analizadas mediante q-PCR.
- Figura 11 Cohortes independientes analizadas
- Figura 12 Criterios de selección de los pacientes de la primera cohorte: pacientes con sepsis y shock séptico
- Figura 13 Criterios de selección de la cohorte 2: pacientes con sepsis, ECC y PICS
- Tabla 12 Secuencia primaria de los péptidos pesados

## RESULTADOS Y DISCUSION

- Figura 14 Citrulinación *in vitro*
- Figura 15 Viabilidad celular

- Figura 16 Estrés oxidativo y respuesta antioxidante en HUVEC expuestas a histonas en condiciones nativas y citrulinadas
- Figura 17 Prostanoides y respuesta endotelial en HUVEC expuestas a histonas extracelulares nativas y citrulinadas
- Figura 18 Respuesta inmune mediada por las HUVEC expuestas a histonas extracelulares nativas y citrulinadas
- Figura 19 Variación de los niveles de histonas circulantes y citrulinadas a lo largo de la estancia en UCI de los pacientes
- Figura 20 Variación de los niveles de histonas circulantes y citrulinadas a lo largo de la estancia en UCI de los diferentes grupos de pacientes
- Figura 21 Mapas de calor representando los coeficientes de correlación de Spearman (de -1 a +1) del grupo de supervivientes de sepsis (n=9)
- Figura 22 Mapas de calor representando los coeficientes de correlación de Spearman (de -1 a +1) del grupo de supervivientes de SS (n=11)
- Figura 23 Mapas de calor representando los coeficientes de correlación de Spearman (de -1 a +1) del grupo de SS fallecidos (n=4)
- Tabla 13 Datos clínicos de los pacientes de UCI con Sepsis, ECC y con PICS
- Figura 24 Gráficos MDS: comparaciones entre grupos
- Tabla 14 Número de miRNAs significativos
- Tabla 15 miRNAs expresados diferencialmente de manera significativa (FDR<0,1) en la comparativa ECC vs Sepsis
- Figura 25 Mapa de calor de la comparación de pacientes ECC vs Sepsis
- Figura 26 Principales términos KEGG obtenidos del análisis GSEA
- Figura 27 Principales términos GO obtenidos del análisis GSEA
- Tabla 16 miRNAs expresados diferencialmente de manera significativa (FDR<0,1) en la comparativa PICS vs Sepsis
- Figura 28 Mapa de calor de la comparación PICS vs Sepsis
- Figura 29 Principales términos KEGG obtenidos del análisis ORA (PICS vs Sepsis)
- Figura 30 Principales términos GO obtenidos del análisis ORA (PICS vs Sepsis)
- Figura 31 Principales términos KEGG obtenidos del análisis GSEA (PICS vs Sepsis)
- Figura 32 Principales términos GO obtenidos del análisis GSEA (PICS vs Sepsis)
- Tabla 17 miRNAs expresados diferencialmente de manera significativa (FDR<0,1) en la comparativa PICS vs ECC
- Figura 33 Mapa de calor de la comparación PICS vs ECC
- Figura 34 Principales términos GO obtenidos del análisis ORA (PICS vs ECC)
- Figura 35 Principales términos KEGG obtenidos del análisis GSEA (PICS vs ECC)
- Figura 36 Principales términos GO obtenidos del análisis GSEA (PICS vs ECC)
- Tabla 18 miRNAs infraexpresados diferencialmente de manera significativa en la comparativa PICS-C vs PICS-A

- Tabla 19 miRNAs sobreexpresados diferencialmente de manera significativa en la comparativa PICS-C vs PICS-A
- Figura 37 Mapa de calor de la comparación PICS-C vs PICS-A
- Figura 38 miRNAs hallados en el análisis de miRseq (PICS-C vs PICS-A)
- Figura 39 Respresentación de los miRNAs hallados en cada comparación
- Figura 40 Principales rutas KEGG obtenidas del análisis ORA (PICS-C vs PICS-A)
- Figura 41 Principales términos GO obtenidos del análisis ORA (PICS-C vs PICS-A)
- Figura 42 Principales rutas KEGG obtenidas del análisis GSEA (PICS-C vs PICS-A)
- Figura 43 Principales términos GO obtenidos del análisis GSEA (PICS-C vs PICS-A)
- Figura 44 Exploración de los datos: Análisis de Componentes principales (PCA) de datos de metilación
- Figura 45 Mapa de calor de metilación del DNA
- Tabla 20 DMR obtenidos en genes y promotores con mCSEA entre las distintas comparaciones de grupos experimentales con un p-valor ajustado < 0.05
- Figura 46 Principales términos GO obtenidos del análisis ORA (ECC vs Sepsis)
- Figura 47 Principales términos KEGG obtenidos del análisis ORA (ECC vs Sepsis)
- Tabla 21 Promotores y genes seleccionados de la comparación de pacientes con ECC y pacientes con sepsis
- Figura 48 Representación mCSEA para el gen *IL12RB2*
- Figura 49 Representación mCSEA para el gen *LEF1*
- Figura 50 Representación mCSEA para el gen *TCF7*.
- Figura 51 Principales términos GO obtenidos del análisis ORA (PICS vs ECC)
- Figura 52 Principales términos GO obtenidos del análisis ORA (PICS vs ECC)
- Figura 53 Principales términos KEGG obtenidos del análisis ORA (PICS vs ECC)
- Figura 54 Representación mCSEA para el promotor *CD3G*
- Figura 55 Representación mCSEA para el promotor *PDCD1*
- Figura 56 Representación mCSEA para el promotor *DEFA4*
- Figura 57 Representación mCSEA para el promotor *IL10*
- Figura 58 Representación mCSEA para el gen *TNFSF4*
- Figura 59 Principales términos GO obtenidos del análisis ORA (PICS-C vs PICS-A)
- Figura 60 Principales términos GO obtenidos del análisis ORA (PICS-C vs PICS-A)
- Figura 61 Principales términos KEGG obtenidos del análisis ORA (PICS-C vs PICS-A)
- Tabla 23 Promotores y genes seleccionados de la comparación de pacientes con PICS (PICS-C vs PICS-A)
- Figura 62 Representación mCSEA para el promotor *PRTN3*
- Figura 63 Representación mCSEA para el promotor *CLEC2D*
- Figura 64 Representación mCSEA para el promotor *CD3D*
- Figura 65 Representación mCSEA para el gen *PRF1*



# **1. RESUMEN / ABSTRACT**





**1.1. RESUMEN**

La sepsis es un síndrome complejo que provoca una respuesta inmunitaria exacerbada como resultado a una infección, lo que puede causar disfunción orgánica y, en última instancia, la muerte. La sepsis puede avanzar a shock séptico (SS), caracterizado por una disfunción orgánica aguda que puede provocar una insuficiencia circulatoria y metabólica grave, aumentando el riesgo de mortalidad. Los pacientes con sepsis o SS ingresados durante al menos 7 días en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) que presentan disfunción orgánica y necesidad de ventilación mecánica se clasifican como enfermos críticos crónicos (ECC), los cuales, si están ingresados al menos 14 días y cumplen una serie de características inmunológicas y metabólicas específicas, se clasifican como pacientes con PICS (Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión). Por lo tanto, la detección temprana de la sepsis es fundamental para el manejo de la enfermedad, y comprender los mecanismos moleculares que llevan a los diferentes fenotipos clínicos ayudará a predecir su evolución. La identificación de nuevos biomarcadores permite establecer protocolos de seguimiento adecuados para estos pacientes, con el objetivo de reducir la elevada mortalidad y mejorar la calidad de vida de los pacientes sépticos que sobreviven a una sepsis.

En esta tesis doctoral se caracterizó, en un modelo de células endoteliales humanas, cómo afectan las histonas citrulinadas. Estas histonas son liberadas al torrente sanguíneo mediante procesos de la inmunidad innata, como la ETosis, siendo el tejido endotelial el primero en entrar en contacto con las histonas. Así mismo, se correlacionaron los niveles plasmáticos de histonas circulantes y citrulinadas con las características clínicas de los pacientes con sepsis y SS supervivientes y no supervivientes. Así, se identificó que las histonas citrulinadas no causan daño a las células endoteliales, aunque sí son capaces de activar respuestas inmunitarias mediadas por el endotelio, facilitando la respuesta inmune. Además, en los pacientes con SS, observamos que las histonas circulantes se relacionaron con factores de coagulación e inmunomodulación, mientras que las histonas circulantes citrulinadas correlacionaron negativamente con los eventos de coagulación.

Por otro lado, se caracterizó cómo están involucrados los cambios de expresión de microRNAs y los patrones de metilación del DNA en la evolución de los pacientes con sepsis, ECC y PICS. Se observó que los niveles circulantes del miR-10395-3p, miR-122, let-7a-5p y miR-133a, así como los cambios de metilación de los genes *IL12RB2*, *LEF1*, *TCF7*, *CD3G*, *PDCDI*, *DEFA4*, *IL10*, *TNFSF4* a tiempos iniciales indican qué pacientes evolucionarán a estos subgrupos clínicos. Así mismo, los microRNAs miR-150-5p y miRNA-335-5p sugieren una inflamación persistente, mientras que los microRNAs miR-27b y miR-4512, junto a los cambios de metilación de los

genes *PRTN3*, *CLEC2D*, *CD3D*, *PRF1* podrían ayudar a discernir qué pacientes sufrirán una inmunosupresión a largo plazo.

**1.2. ABSTRACT**

Sepsis is a complex syndrome that causes an exaggerated immune response as a result of infection, which can lead to organ dysfunction and ultimately death. In some cases, sepsis can progress to septic shock, which is characterized by acute organ dysfunction that can result in severe circulatory and metabolic failure, increasing the risk of mortality. Patients with sepsis or septic shock who are admitted to the Intensive Care Unit (ICU) and experience organ dysfunction and need for mechanical ventilation for at least 7 days are classified as chronically critically ill (CCI). If they are hospitalized for at least 14 days and meet a series of specific immunological and metabolic characteristics, they are classified as patients with PICS (Persistent Inflammation, Activation of Catabolism, and Immunosuppression Syndrome). Therefore, early detection of sepsis is essential for disease management, and understanding which molecular and epigenetic mechanisms are altered in each group of patients can help predict their evolution. The identification of new biomarkers will allow the establishment of adequate follow-up protocols for these patients to reduce high mortality and improve the quality of life of septic patients who survive sepsis.

In this doctoral thesis, the effect of citrullinated histones was characterized in a model of human endothelial cells. These histones are released into the bloodstream by innate immunity processes, such as ETosis (extracellular traps), and the endothelial tissue is the first to come into contact with the histones. Likewise, circulating and citrullinated histone levels were analyzed in plasma samples and correlated with the clinical characteristics of surviving and non-surviving patients with sepsis and SS. Thanks to this, we identified that citrullinated histones do not cause damage to endothelial cells, especially in comparison with those histones without induced modifications, and are capable of activating endothelium-mediated immune responses. In addition, we observed that in patients, histones were related to coagulation and immunomodulation factors, while citrullinated histones were negatively correlated with coagulation events.

On the other hand, we characterized which microRNA expression changes and DNA methylation patterns are involved in the evolution of septic patients, CCI, and PICS. Thanks to this, we observed that the analysis of miR-10395-3p, miR-122, let-7a-5p, and miR-133a, or the gene methylation changes of *IL12RB2*, *LEF1*, *TCF7*, *CD3G*, *PDCD1*, *DEFA4*, *IL10*, and *TNFSF4* will allow us to predict at early stages which patients will evolve into these clinical subgroups. Likewise, miR-150-5p and miRNA-335-5p will help discern which patients will present persistent inflammation, while miR-27b and miR-4512, together with the methylation changes of the *PRTN3*, *CLEC2D*, *CD3D*, *PRF1* genes, would help discern whether patients who develop PICS will suffer long-term immunosuppression.



## **2. INTRODUCCIÓN**



### 2.1. SEPSIS Y SHOCK SÉPTICO

El tercer y más reciente consenso internacional sobre sepsis y choque séptico (en lo sucesivo, *shock séptico* (SS), por sus siglas en inglés) (Sepsis-3) define la sepsis como "una afección potencialmente mortal causada por la respuesta exacerbada del organismo frente a una infección, capaz de dañar los propios tejidos del huésped". Así pues, el SS se considera "un subconjunto de la sepsis en el que las anomalías celulares, circulatorias y metabólicas son especialmente severas, asociándose con un mayor riesgo de muerte que la sepsis" (1). En este sentido, la sepsis presenta una incidencia mundial de 48 millones de casos al año, con valores que se incrementan anualmente (2). A pesar de las mejoras en los tratamientos aplicados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), se estima que causa más de 11 millones de muertes anuales en todo el mundo, de los cuales casi 3 millones son recién nacidos (3,4). Además, la sepsis es la causa más frecuente de muerte en la UCI de la mayoría de hospitales (5).

Actualmente, las pautas para el manejo de la sepsis recomiendan la administración de antibióticos lo antes posible, junto con el uso de vasopresores, la reanimación con líquidos y el uso de técnicas de soporte vital para la insuficiencia orgánica, según el trascurso de la enfermedad (6). En este sentido, en la clínica, se emplea una escala clínica que permite la evaluación del grado de afectación orgánica en pacientes que están críticamente enfermos con sospecha de infección, aunque no es capaz de diagnosticar de manera temprana la sepsis. Esta herramienta se conoce como "puntuación secuencial de evaluación de la insuficiencia orgánica" (SOFA, "Sequential Organ Failure Assessment", por sus siglas en inglés) (6). Además, el SOFA rápido ("quick SOFA", qSOFA) ayuda a identificar a los pacientes adultos con probabilidad de tener mal pronóstico, especialmente en el entorno de la UCI (1,7,8). Estas dos herramientas se diferencian principalmente en la rapidez con la que qSOFA permite identificar pacientes graves y con elevado riesgo de sufrir complicaciones, algo muy necesario para intentar identificar, en el área de emergencias o bien en planta hospitalaria, aquellos casos en los que un paciente puede desarrollar una sepsis. No obstante, a pesar de que el qSOFA selecciona con alta precisión pacientes graves, es necesario calcular el SOFA para confirmar la disfunción orgánica. No obstante, cabe destacar que, a pesar de que la mortalidad hospitalaria se ha asociado con una mayor puntuación SOFA, esta escala no es capaz de predecir la evolución clínica de los pacientes críticos, ni identifica los pacientes con SS (1,9). Por ello, es necesario el desarrollo de nuevos métodos capaces de identificar de manera temprana, y de ser posible anticipadamente, la sepsis, puesto que las primeras horas de la enfermedad son cruciales para el pronóstico de la misma (10). Diagnosticar de manera precoz la sepsis permitiría reducir los estados de mayor gravedad de la enfermedad, así como el número de muertes asociadas, y evitaría el desarrollo de comorbilidades en los

supervivientes, las cuales se han visto relacionadas con una mayor posibilidad de sufrir nuevos episodios de sepsis (11,12), aumentando así el riesgo de muerte en estos pacientes con un sistema inmunitario debilitado (13–15).

La importancia de reconocer de manera temprana la sepsis (entre las primeras 6h y 24h, y preferiblemente antes de 1h tras la llegada al hospital), administrar rápidamente los antibióticos o el tratamiento adecuado, puede reducir significativamente el número de muertes causadas por la sepsis (16). Sin embargo, dado que el daño que produce la sepsis en el paciente conlleva una gran variedad de alteraciones celulares, fisiopatológicas y orgánicas simultáneas, el diagnóstico es muy complicado (17–19) (Figura 1). Son muchas las tecnologías que se están desarrollando actualmente para el diagnóstico temprano de la sepsis. Muchas de ellas están enfocadas directamente al reconocimiento rápido del agente infeccioso, con el objetivo final de poder administrar de forma temprana el antibiótico adecuado. La espectrometría de masas (EM) con desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) es ya una herramienta de trabajo rutinaria en las unidades de microbiología clínica, por su rapidez, sensibilidad, especialmente con todos aquellos microorganismos con dificultades para crecer en los medios líquidos usados para la inoculación, y fiabilidad en la identificación de microorganismos que pueden causar una infección. De hecho, el análisis del perfil proteico del microorganismo en el rango de los 2-20kD mediante MALDI-TOF, que es donde se sitúan la mayor parte de las proteínas ribosómicas, ofrece para la gran mayoría de las especies bacterianas un perfil específico, que permite diferenciarlas de las demás con una fiabilidad similar a la ofrecida por la secuenciación del RNAr 16S. Los resultados aportados por esta técnica están perfectamente contrastados en la identificación de bacterias y levaduras, facilitan la detección de cultivos mixtos y permiten un diagnóstico rápido de especies resistentes. El principal inconveniente de la técnica MALDI-TOF es que presenta limitaciones para la identificación de determinados microorganismos, ya que no es capaz de diferenciar o discriminar entre algunos géneros concretos como, por ejemplo, *Streptococcus viridans* de *Streptococcus pneumoniae* o *E. coli* de *Shigella spp.*, lo que puede limitar el uso correcto de la antibioterapia adecuada (20). Este hecho ha provocado que se continúe con los desarrollos de tecnologías para la identificación de los microorganismos causantes de una infección. SeptiFast™ es una técnica de diagnóstico basada en PCRs que está ganando relevancia, por su capacidad para detectar DNA bacteriano, incluso cuando la bacteria ha sido eliminada, así como por la rapidez con la que se obtiene el resultado (21). Esta técnica de diagnóstico aumenta las probabilidades de aislar, al menos un microorganismo, hasta 13 veces en comparación con métodos de cultivo tradicionales (13.5; 95% CI, 5.05–36.06) en menos de 6h (22). Las técnicas de cultivo convencional y las otras técnicas más avanzadas como el MALDI-TOF (que también usan el crecimiento del cultivo para la detección), sirven para determinar si el patógeno causante de la infección es una bacteria, un virus



o un hongo, con el fin de administrar un tratamiento u otro, además de ser más lentas son menos precisas, ya que los fármacos administrados al paciente antes de la prueba pueden alterar los resultados, causando, hasta en un 30% de los casos falsos negativos (23). Sin embargo, a pesar de que SeptiFast™ está ofreciendo resultados interesantes, sus rangos de sensibilidad y especificidad varían entre el 42% y el 73%, y entre el 50 y el 97%, respectivamente (24). Por lo tanto, a pesar de que esta técnica reduce significativamente el tiempo de identificación del microorganismo causante de la infección, la sensibilidad es insuficiente y, además, reconocer el microorganismo no es sinónimo de identificar una sepsis.

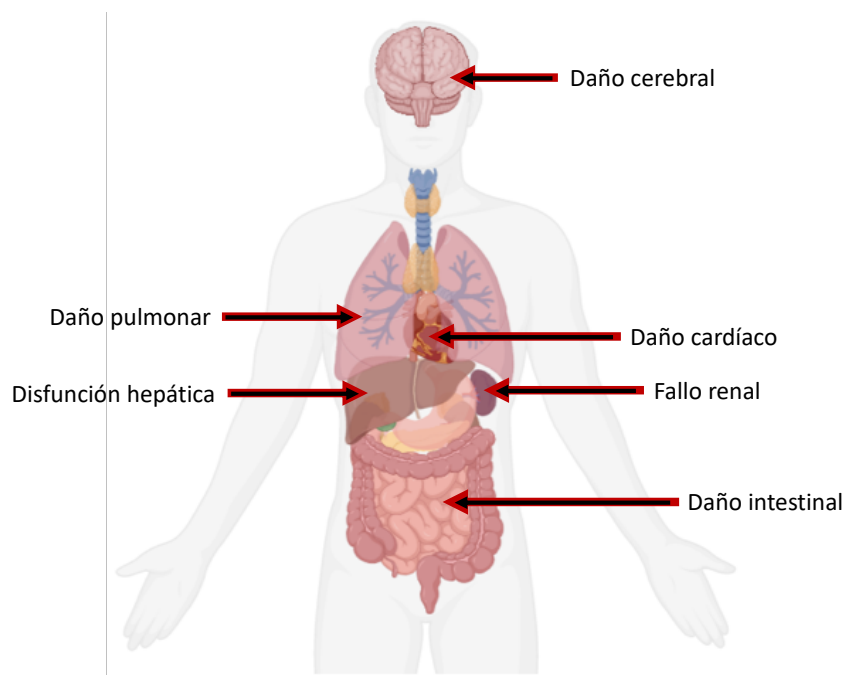
El hecho de que únicamente la identificación del microorganismo no sea *per se* la herramienta idónea para el diagnóstico rápido de la sepsis, y menos todavía para establecer su pronóstico, ha llevado a la búsqueda de otros biomarcadores. En esta línea, otros parámetros moleculares como el lactato, la proteína C reactiva (PCR) o la procalcitonina (PCT), entre otros (25,26) también se tienen en cuenta para identificar un posible caso de sepsis. Sin embargo, estos marcadores presentan un problema, y es que son inespecíficos, es decir, otros factores independientes de un episodio séptico pueden aumentarlos, pudiendo aparecer falsos positivos en ausencia de infección, y falsos negativos en casos de infección vírica o fúngica, puesto que, por ejemplo, la PCT sólo se ve alterada en infecciones bacterianas (26,27).

Todo lo descrito anteriormente hace evidente lo difícil que es diagnosticar la sepsis, especialmente en las primeras etapas. Puesto que cuando los eventos fisiopatológicos se vuelven evidentes, recuperar la homeostasis celular y orgánica del paciente es mucho más complicado, lo cual puede llevar a que el paciente pueda ser derivado a una UCI, alargar su estancia hospitalaria o incluso desembocar en un desenlace fatal.

Es importante destacar el coste económico que tiene esta enfermedad, puesto que sólo en Estados Unidos la sepsis supone un gasto sanitario de más de 24.000 millones de dólares, y en Europa alrededor de 7.600 millones de euros anualmente (13,28,29). Además, la sepsis compromete la calidad de vida de los supervivientes debido a las secuelas, entre las que se encuentran: depresión, deterioro cognitivo e inmunosupresión (30–32), haciéndolos dependientes del sistema sanitario. Además, como ha publicado recientemente nuestro grupo de investigación, la sepsis frecuentemente se relaciona con el daño cardíaco, desarrollando cardiopatías asociadas a sepsis, con el daño neurológico desarrollando encefalopatía asociada a sepsis, y con el daño renal (33–35). Curiosamente, tanto el daño cardíaco como el daño renal, aparecen como patologías predominantes debido a que la sepsis puede acelerar la aparición de patologías pre-existentes, o agudizar sus síntomas (36,37). En este sentido, es importante destacar que un estudio epidemiológico retrospectivo ha demostrado que la enfermedad cardiovascular de nueva

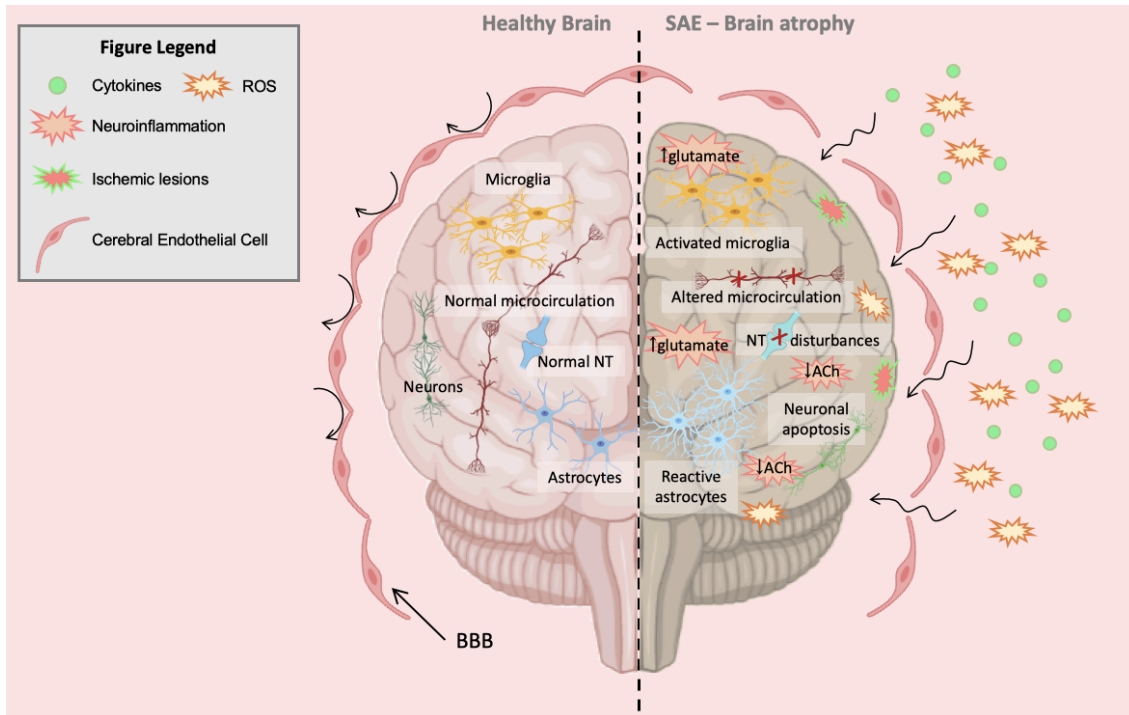
aparición es uno de los resultados cardiovasculares a largo plazo más frecuentes en los supervivientes a una sepsis, incluyendo la aparición de eventos como la insuficiencia cardíaca, el infarto de miocardio, el accidente cerebrovascular, la revascularización coronaria, y la fibrilación auricular muchos años después de sobrevivir a la sepsis (38–41). Además, se ha descrito que la aparición de patologías cardiovasculares aumenta considerablemente el riesgo de morir, alcanzando hasta a un 80% de los pacientes, en comparación a un 20% que fallecen sin problemas cardíacos (42). Así mismo, la alteración en el tejido endotelial que se da durante la sepsis, causa una desregulación de la barrera hematoencefálica que deteriora su función de filtrado de sustancias tóxicas hacia el cerebro (43) (Figura 2). Estas sustancias, como las citoquinas, causan hiperinflamación y apoptosis neuronal, así como estrés oxidativo, desregulación del metabolismo y alteraciones de la neurotransmisión, en la señalización cerebral, en la microcirculación (44,45). La activación de todos estos procesos, causa una gliosis exacerbada, comúnmente observada en los pacientes con encefalopatía asociada a sepsis (43).

Cabe destacar que los pacientes que sobreviven a una sepsis, quedan inmunosuprimidos y, la inmunosupresión a corto plazo, implica un mayor riesgo para el paciente de padecer infecciones por patógenos oportunistas, las cuales podrían ser controladas por un sistema inmunitario en buen estado (46). En este sentido, un amplio porcentaje de los pacientes es rehospitalizado durante el mes y medio posterior al episodio séptico. Además, el sistema inmunitario puede quedar afectado a largo plazo, provocando una inmunosupresión que causa una reducción significativa de la supervivencia (47,48).



**Figura 1. Principales alteraciones orgánicas que ocurren durante el proceso séptico.**

**Fuente:** Imagen adaptada empleando recursos de Biorender, del trabajo de Cavaillon JM et al. (49).



**Figura 2. Alteraciones metabólicas que se dan en la encefalopatía asociada a sepsis.** Las principales alteraciones observadas en esta patología causan hiperinflamación, que deriva en la activación de la microglia y la disfunción cerebral. Abreviaturas: SAE: Encefalopatía asociada a sepsis; BBB: Barrera hematoencefálica; ACh: Acetilcolina; NT: Neurotransmisor.

**Fuente:** Figura adaptada de nuestro trabajo Osca-Verdegal et al. (34).

## 2.2. EL SISTEMA INMUNITARIO DURANTE LA SEPSIS

La respuesta inmunitaria del paciente, tanto innata como adaptativa, se ve afectada a medida que progresa la sepsis, puesto que recuperar la homeóstasis se complica a medida que avanza la enfermedad. A pesar de que los patógenos causantes de la infección y del desarrollo de la enfermedad se eliminen por completo, la capacidad inmunitaria del paciente puede no recuperarse completamente. Desde el punto de vista clásico, la disfunción orgánica y la letalidad asociadas a la sepsis se han atribuido a la interacción que se da entre las respuestas inflamatorias y antiinflamatorias (50).

### 2.2.1. HIPERINFLAMACIÓN E INMUNOSUPRESIÓN DURANTE LA SEPSIS

Los pacientes con sepsis sufren una respuesta inflamatoria que implica una liberación de citoquinas. Se sabe que la pérdida del control local de la liberación de estas citoquinas conduce a una inflamación sistémica, conocida como tormenta de citoquinas, y a sus consecuencias potencialmente perjudiciales, incluyendo el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS), el Síndrome de Disfunción Multiorgánica (MODS), el fallo orgánico, el shock y la muerte (51,52).

La respuesta inmunitaria está mediada inicialmente por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por su nombre en inglés *Patogen Associated Molecular Patterns*) y patrones moleculares asociados a daño celular (DAMP, por su nombre en inglés *Damage Associated Molecular Patterns*) generados por los organismos causantes de la infección, pudiendo ser de origen bacteriano, vírico o fúngico. Estas moléculas, los PAMPs y los DAMPs, son capaces de unirse a receptores de reconocimiento expresados en las células inmunitarias innatas del huésped (53–55). La activación de estos receptores de reconocimiento causa la producción de numerosas citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias de manera simultánea, lo que conduce a la activación de respuestas celulares contrapuestas, contribuyendo a una desregulación del organismo. Entre las respuestas que se activan, se incluyen una elevada actividad fagocítica, el daño endotelial vascular, la quimiotaxis de leucocitos a los sitios de infección y la activación del sistema de coagulación (53–56). De hecho, en un trabajo publicado por nuestro grupo (57), describimos que en los estados iniciales de la sepsis, el sistema inmunitario intenta contrarrestar la infección, probablemente a través de los neutrófilos que forman parte del sistema de inmunidad innata. Por el contrario, el sistema inmunitario adaptativo aún no está completamente activado en estos pacientes. Sin embargo, las respuestas inmunosupresoras y las señales de procoagulación sí están activas en pacientes sépticos, concretamente en aquellos que presentan fenotipos clínicos más graves (57). En este trabajo publicado describimos que este grupo de pacientes presentan elevados niveles de la citoquina S1008, derivada de los neutrófilos y capaz de promover la coagulación a través de la activación de las plaquetas (58,59). Así mismo, la P-selectina (selectina plaquetaria), cuya función es facilitar este proceso mediado por la S100A8 y aumentar la agregación plaquetaria, también se encontró aumentada en estos pacientes. Además, cuando se analizaron los niveles de selectina endotelial (E-selectina) y los niveles de Dímero-D (DD), altamente relacionado con los procesos de coagulación, también se encontró una fuerte correlación en los pacientes con SS. La coagulación se ha relacionado estrechamente con la inflamación, por lo que en la sepsis, la inflamación se acompaña de la activación de la coagulación, la generación de trombina y la coagulación intravascular diseminada (CID, o DIC, por sus siglas en inglés) (60). Los monocitos y neutrófilos se unen a la trombina, la cual se une a receptores activados en células endoteliales activadas, favoreciendo la liberación de citoquinas proinflamatorias, especialmente interleuquinas (IL) IL-6 e IL-8, y moléculas de adhesión endotelial (60). Los leucocitos reclutados producen enzimas líticas, especies reactivas del oxígeno (ERO) y especies reactivas del nitrógeno (ERN) que contribuyen a que se produzca daño tisular en el sitio de infección, que puede ser seguido de un fallo microcirculatorio, una hemorragia difusa y, finalmente, un fallo orgánico (60).

Por otro lado, cabe destacar que se ha visto que a medida que los pacientes sobreviven a la fase hiperinflamatoria inicial de la tormenta de citoquinas, muchos pacientes sépticos desarrollan un

estado antiinflamatorio contrarregulador y potencialmente prolongado, que trata de recuperar la homeostasis del sistema inmunitario (61). Este estado se conoce como Síndrome de Respuesta Antiinflamatoria Compensatoria (CARS, por su nombre en inglés *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*), que también se conoce como mecanismo de hipoinflamación (62–66) (Figura 3). El CARS es el evento responsable de la inmunosupresión a corto plazo, ya que causa el fallo o agotamiento del sistema inmunitario por estar activos simultáneamente eventos contrapuestos (67). En consecuencia, la desregulación de la respuesta inmunitaria combinada con el MODS que han sufrido los pacientes sépticos, aumenta la mortalidad a corto plazo y debe contribuir en la mortalidad a largo plazo de estos pacientes, ya que las infecciones oportunistas con un sistema inmunitario agotado pueden ser letales para el paciente (65,68–71).

Se sabe que el SIRS aparece como consecuencia de la respuesta inflamatoria innata principalmente mediada por las células polimorfonucleares (PMN) (72,73), y el CARS representa la respuesta inmune adaptativa (principalmente linfocitos) (74–76). Por lo tanto, se encontró que el MODS tardío es en realidad un estado persistente de CARS donde las infecciones y la mala cicatrización de heridas son síntomas de la fisiopatología subyacente (75). La inmunosupresión puede mantenerse en el tiempo, llegando a durar meses o años, produciendo comorbilidades graves en pacientes que han sobrevivido a un episodio séptico, e incrementando de forma significativa el riesgo de muerte (Figura 3).

#### 2.2.2. SÍNDROME DE INFLAMACIÓN PERSISTENTE, ACTIVACIÓN DEL CATABOLISMO E INMUNOSUPRESIÓN

A finales de la década de 1990, el paradigma SIRS/CARS se convirtió en la explicación para la trayectoria inflamatoria e inmunológica de un paciente ingresado en la UCI con una evolución clínica complicada. En la actualidad, con el mejor manejo de las terapias de soporte extracorpóreo aplicados en medicina intensiva, los pacientes con enfermedades graves sobreviven más a las fases agudas de la enfermedad. Sin embargo, algunos de estos pacientes ingresados en la UCI con sepsis pueden evolucionar a la mejoría clínica o a la persistencia del estado de alteraciones fisiológicas con requerimientos de soporte mecánico ventilatorio prolongado y otras terapias de Cuidados Intensivos. Entre estos pacientes sépticos, normalmente mayores de 65 años, se puede encontrar un subconjunto de pacientes que sufren lo que se conoce como Enfermedad Crítica Crónica (ECC), que se caracteriza porque el paciente está ingresado en la UCI durante más de 7 días y mantiene un MODS en curso (Figura 3). Dentro de este subconjunto, puede aparecer otro fenotipo del MODS denominado Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión (en inglés conocido como *persistent inflammation, immunosuppression and catabolism syndrome*, PICS), cuando el catabolismo celular y los fenómenos de inmunosupresión están presentes (Figura 4) en estos pacientes que permanecen en la UCI durante largos períodos

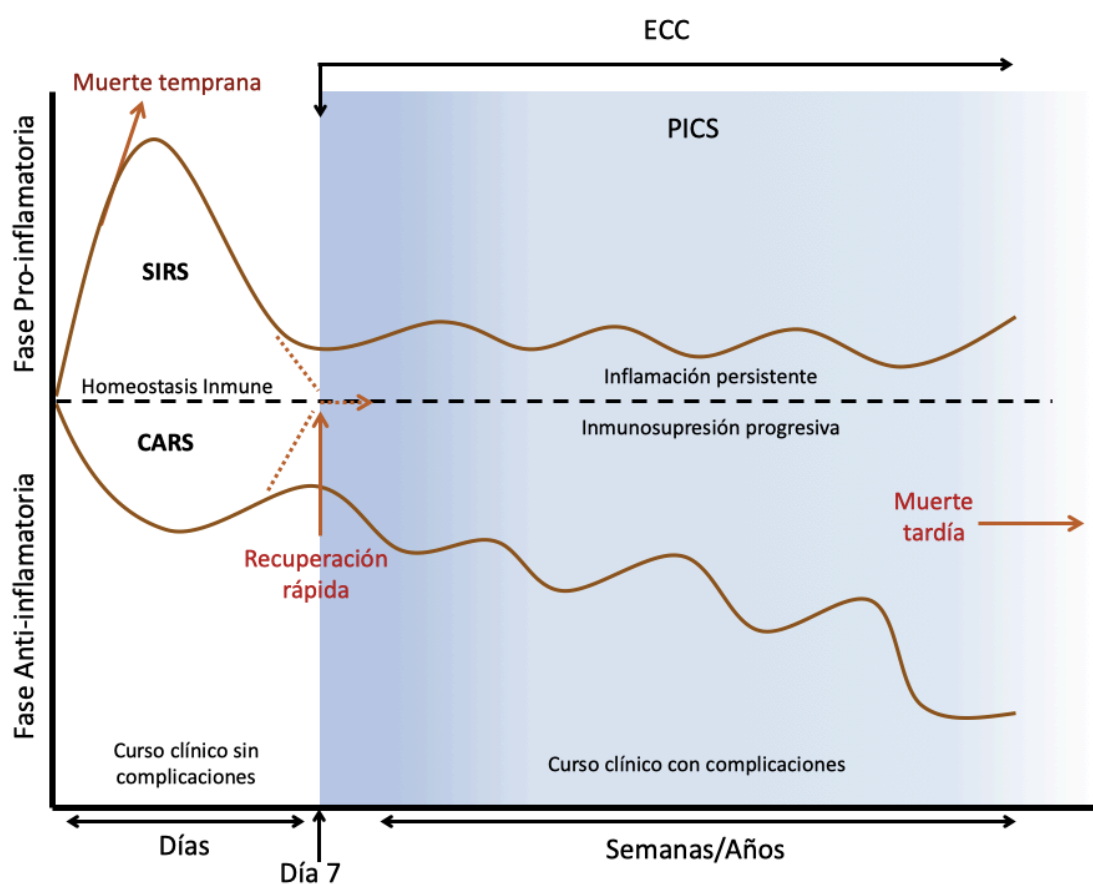
de tiempo, y el MODS va asociado con un estado catabólico, inflamación latente e inmunosupresión progresiva (77) (Figura 3).

Los pacientes que sufren PICS están afectados principalmente por un proceso inflamatorio continuo de bajo grado con defectos en su inmunidad innata y adaptativa, además se caracterizan por presentar desnutrición, la cual causa una pérdida de la masa corporal considerable a pesar de la suplementación adecuada y una terapia nutricional optimizada; fragilidad, dependencia de soporte respiratorio y padecen infecciones nosocomiales recurrentes junto a una inmunosupresión prolongada. Todo ello, aumenta la probabilidad de muerte tardía de estos pacientes (77–79) (Figura 3). Además, parece haberse relacionado la gravedad del PICS temprano con la gravedad de la inmunosupresión tardía (80). Esto se debe a que, en la clínica se ha visto que los pacientes con peor curso de la enfermedad, desarrollan una etapa temprana de activación y secuestro de PMN, especialmente de neutrófilos (72,74). Posteriormente, hay un período en el que los PMN circulantes se vuelven funcionalmente ineficaces y se inhibe la granulopoyesis en la médula ósea, lo que determina la inmunosupresión (81–83).

Actualmente, no existen unos parámetros claramente definidos para diagnosticar un paciente con PICS, lo que hace que cada hospital defina los suyos propios. Sin embargo, la literatura más reciente establece algunos parámetros para definir o identificar a los pacientes con PICS, consistentes en: la pérdida de peso (más de un 10% durante el tiempo de ingreso), IMC (Índice de Masa Corporal) por debajo de 18, la albúmina por debajo de 3mg/dL, la prealbúmina por debajo de 10mg/dL, la proteína C reactiva (PCR) superior a 150 mg/dL, y un recuento de linfocitos total inferior a  $800/\text{mm}^3$  ( $<0,80 \times 10^9/\text{L}$ ) (84) (Figura 4). A pesar de que el diagnóstico de PICS puede variar entre hospitales, se ha observado una tendencia al alza en el diagnóstico y la prevalencia del PICS (85). El aumento de casos de este síndrome es un dato importante, ya que supone un enorme coste económico para los sistemas sanitarios (77,86), puesto que estos pacientes generalmente son derivados a centros de cuidados crónicos, donde no logran recuperarse y terminan con dependencia funcional completa tras un año del alta, ya que sufren depresión, deterioro cognitivo, anomalías fisiológicas complejas, disfunción de órganos, déficits neuroendocrinos y disfunción inmunológica; incluso en algunos casos terminan muriendo de manera precoz (86–92) (Figura 3).

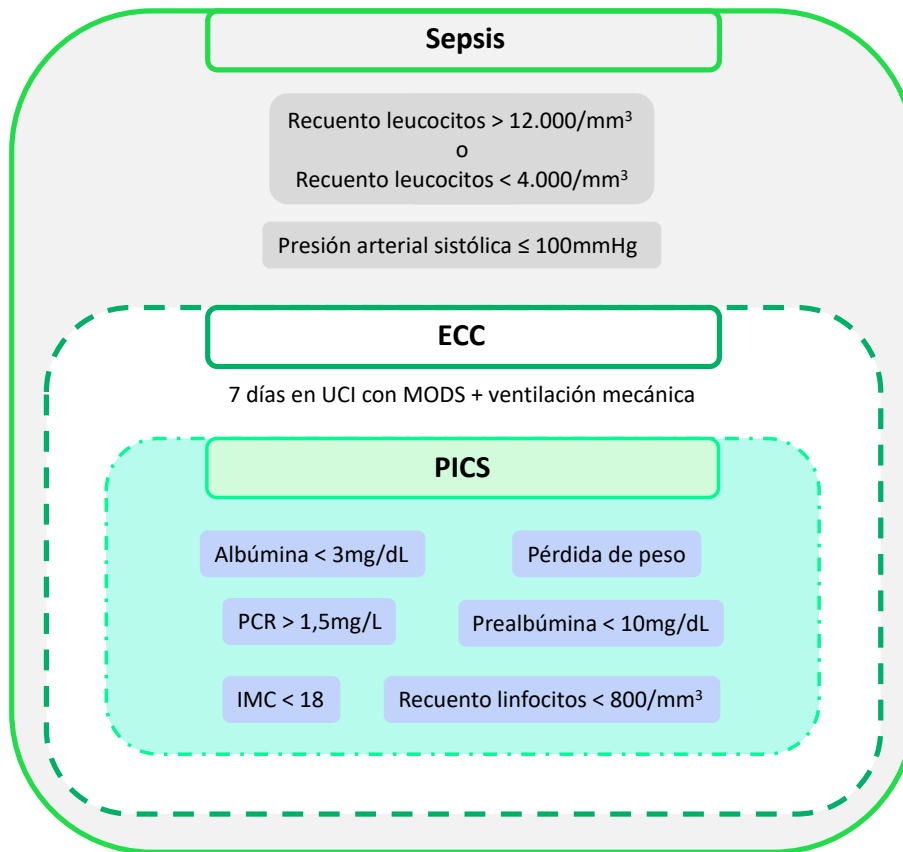
Debido al envejecimiento de la población, se prevé que los casos de PICS sigan en aumento. Sin embargo, no se dispone de biomarcadores para predecir fenómenos de inmunosupresión, más allá del aumento de la IL-6 e IL-10, la expresión de monocitos HLA-DR y las alteraciones en las células supresoras derivadas de células mieloides (MDSC) (67,69,78). Estas últimas incluyen dos subtipos, pudiendo ser granulocíticas y monocíticas, que inhiben la función de los linfocitos B y

los linfocitos T (93). Esta disregulación causa un agotamiento del sistema inmunitario del paciente con PICS, el cual se suma a un aumento de células T reguladoras (Tregs), las cuales presentan características inmunosupresoras (84,94). Además, el aumento de la población de MDSCs, la cual también puede participar en la inmunosupresión observada en estos pacientes (95), las convierte en candidatos para ser biomarcadores de PICS. Sin embargo, no son marcadores específicos de este síndrome. Por todo ello, existe una necesidad de desarrollar biomarcadores específicos capaces de predecir eventos de inmunosupresión, síndromes como el PICS, y las comorbilidades observadas en los supervivientes de sepsis; a lo cual pretende contribuir el trabajo realizado en esta tesis doctoral.



**Figura 3. Esquema simplificado de SIRS, CARS, ECC y PICS durante la respuesta inmune en sepsis.** Esta imagen muestra que algunos pacientes mueren de manera temprana por una fase hiperinflamatoria aguda de la sepsis y otros sobreviven tras superar la inflamación aguda (SIRS) seguida de una fase hipoinflamatoria contrarreguladora (CARS) que trata de devolver al sistema inmunitario a la homeostasis. También se muestra que aquellos pacientes que presentan una sepsis durante 7 días, entran en una nueva fase conocida como ECC (Enfermos Críticos Crónicos), en la cual hay un subgrupo de pacientes que desarrolla un Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión (PICS), el cual termina en dependencia de estos pacientes o muertes tardías.

**Fuente:** Figura adaptada de Rosenthal and Moore (96).



**Figura 4.** Parámetros que definen a los pacientes con sepsis, a los Enfermos Críticos Crónicos (ECC) y a los pacientes con PICS (Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión). Abreviaturas: MODS: Síndrome de Disfunción Multiorgánica; PCR: Proteína C Reactiva; IMC: Índice de Masa Corporal.

**Fuente:** Figura adaptada del trabajo de Horiguchi et al y Rosenthal and Moore (96,97).

Finalmente, es importante destacar que este síndrome no debe confundirse con el llamado Síndrome Post-UCI, para el que se usa el mismo acrónimo "PICS". Este síndrome se da en los supervivientes de un caso séptico y hace referencia a la discapacidad que conduce a un deterioro en la cognición, la salud psicológica y la función física (98).

### 2.3. ENDOTELIO Y DAÑO VASCULAR DURANTE LA SEPSIS

Las células endoteliales forman la pared interna de los vasos sanguíneos creando una interfaz entre la sangre y las células responsables de las funciones orgánicas. El endotelio es fundamental para la regulación de la coagulación, el control vasomotor por liberación de moléculas como las prostaciclina o el óxido nítrico (NO) (99) y la función inmunitaria a través de la secreción de moléculas que inician la señalización transcelular e intercelular (100). La sepsis afecta prácticamente todos los aspectos de la función de las células endoteliales y se cree que el endotelio

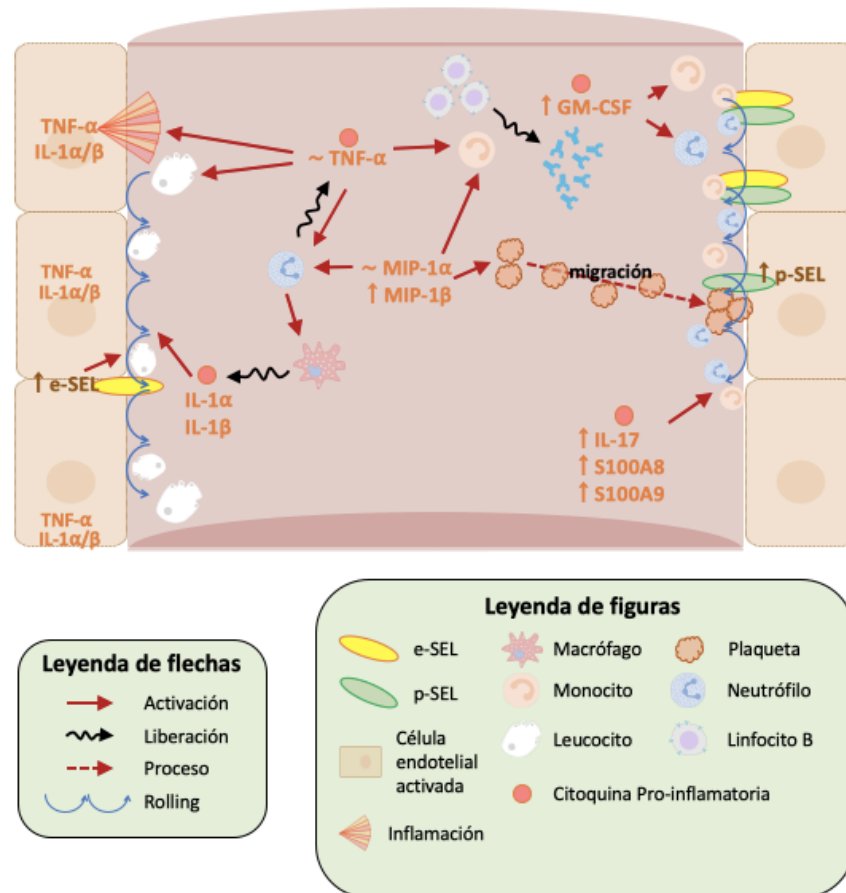


es un factor clave en la progresión de la sepsis a la insuficiencia orgánica (100), puesto que es uno de los primeros tejidos en verse afectados respondiendo a la infección (101–103).

La integridad de las células endoteliales como barrera y transportador de solutos está determinada en gran medida por el citoesqueleto endotelial y el glucocálix, que están estrechamente regulados. El glucocálix interviene en varios procesos fisiológicos clave, como la función de barrera vascular, la coagulación, la adhesión de leucocitos y plaquetas, la transmisión de la tensión de cizallamiento al endotelio y las defensas antiinflamatorias y antioxidantes (104). De hecho, la expresión de moléculas de adhesión y la producción de compuestos vasoactivos, así como moléculas inflamatorias, ayudan a que el endotelio pase de un estado anticoagulante a uno procoagulante (105). Se cree que el desprendimiento del glucocálix se produce en presencia de oxidantes, como pueden ser las ERO, endotoxinas bacterianas (que actúan como DAMPs), y citoquinas, como pueden ser el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (106–108). Cabe destacar que el endotelio es una diana y una fuente de inflamación, puesto que relaciona la respuesta inmunitaria local y sistémica (109). En este sentido, la activación endotelial ayuda a combatir la infección a nivel local, pero la activación sistémica puede causar trombosis microvascular, permeabilidad capilar, hipotensión, hipoxia tisular y, finalmente, daño tisular (110).

Las selectinas (E-selectina (E-SEL), L-selectina (L-SEL) y P-selectina (P-SEL)) median la adherencia y el rodamiento, mientras que las integrinas como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) median la adhesión firme y el tráfico transcelular de los leucocitos. Estas moléculas aumentan considerablemente en la superficie de las células endoteliales como respuesta a las citoquinas inflamatorias, especialmente a IL-1 y TNF- $\alpha$  (111). Inicialmente, se produce una unión entre los leucocitos, a través de los ligandos de carbohidratos de Sialil-Lewis y la E-selectina y la P-selectina, permitiéndoles rodar sobre el endotelio. Cabe destacar que la P-selectina en las células endoteliales no sólo está implicada en el reclutamiento y rodamiento de los leucocitos, sino que además favorece la activación de integrinas a través del ligando 1 de la glicoproteína de la P-selectina (PSGL-1), induciendo una mayor activación de los leucocitos (112). A continuación, estos leucocitos son activados por macrófagos y células endoteliales a través de la liberación de quimioquinas (CXCL8, CXCL1, CXCL2 y CXCL5), para que expresen integrinas en su superficie. Estas integrinas les permiten una adhesión más fuerte y firme a ICAM-1 y VCAM-1, iniciando su migración hacia los tejidos lesionados (113). Las quimioquinas previamente liberadas, forman un gradiente quimiotáctico que dirige la migración de los leucocitos hacia los sitios de infección, especialmente de los neutrófilos, y mejora su adhesión (114) (Figura 5).

Cabe destacar que durante la sepsis una de las características clínicas más importantes es la hipotensión, la cual ocurre por una desregulación endotelial causada por un desajuste en los niveles de prostaciclina (115,116). Además, se sabe que el NO es un potente vasodilatador y que también varía sus niveles durante un episodio de sepsis, ayudando a la desregulación del tono vascular (117). En este sentido, se ha descrito que la expresión de P-SEL y E-SEL pueden variar en función de la concentración de NO (118).



**Figura 5.** Esquema de la regulación de la respuesta molecular temprana en pacientes con SS. Las flechas hacia arriba indican sobreexpresión, ~ indica que no varían en comparación con las muestras control. Los nombres en naranja son citoquinas pro-inflamatorias. Abreviaturas: TNF: Factor de Necrosis Tumoral; e-SEL: Selectina endotelial; IL: interleuquina; MIP: Proteína Inflamatoria de Macrófagos; GM-CSF: Factor Estimulador de Colonia – Macrófago-granulocito.

**Fuente:** Imagen adaptada de nuestro trabajo: Beltrán-García et al. (57).

Según avanza la respuesta inflamatoria, algunas moléculas de adhesión encargadas de reclutar a los leucocitos, se desprenden de las superficies celulares para reducir las interacciones leucocito-endotelio, con el fin de proteger al huésped de daños colaterales excesivos (119). Estas moléculas que se han desprendido de las superficies celulares son solubles y se acumulan en el plasma sanguíneo, por lo que medir sus niveles en sangre puede ser útil para diagnosticar de manera

temprana la sepsis, predecir su gravedad y pronosticar su desenlace, ya que la concentración de estos factores solubles sE-SEL, sP-SEL, sICAM-1 y sVCAM-1 aumentan durante la sepsis y se correlacionan con la mortalidad (120,121). En este sentido, algunos estudios han planteado a estas moléculas como candidatos ideales para seguir la evolución de la sepsis, por la elevada sensibilidad y especificidad que muestran, especialmente en comparación a otros parámetros que se miden en la actualidad como la procalcitonina, y por la relación que tienen con la disfunción orgánica causada por la sepsis, puesto que se ha visto que los niveles de estas moléculas aumentan con la disfunción orgánica y se normalizan con la mejora del paciente (121,122). A pesar de su importancia en la función endotelial e inmune durante la sepsis y de su correlación con el avance de la sepsis, actualmente estas moléculas no se emplean como biomarcadores en la clínica, ni tampoco hay estudios que se centren en ellas para el desarrollo de fármacos para la sepsis.

Por todo lo descrito, el endotelio juega un papel clave durante el desarrollo de la sepsis, puesto que su desregulación causa la alteración de numerosos procesos relacionados con este, como puede ser la trombosis, la agregación leucocitaria o la pérdida del tono vascular. Además, el endotelio está relacionado con la inflamación y la respuesta inmune, procesos que están muy activos en la sepsis. Finalmente, cabe destacar que la alteración del endotelio está muy relacionada con el fallo orgánico y el fenómeno de coagulación intravascular diseminada que se puede producir durante la sepsis, contribuyendo así a la mortalidad en estos pacientes (123–125).

#### **2.4. EPIGENÉTICA EN LA SEPSIS**

Nuestro grupo de investigación se ha dedicado durante años a comprender cómo diferentes mecanismos epigenéticos están implicados en la sepsis (123,126–128).

La epigenética estudia el flujo de la información entre una secuencia constante del DNA y la variabilidad de los distintos patrones de expresión que se pueden derivar de ella. Los procesos epigenéticos pueden producir efectos intergeneracionales heredables, propagación clonal de una identidad celular, y también alteraciones estables en los programas transcripcionales, y no necesariamente heredables (129). En este sentido, la epigenética es una ciencia revolucionaria con el potencial de mejorar la medicina de precisión. Las marcas epigenéticas pueden actuar como archivos que registran la historia natural de las enfermedades y las exposiciones a lo largo de la vida, además de explicar los cambios biológicos que aumentan nuestra susceptibilidad a las enfermedades (130). Por lo tanto, las marcas epigéticas pueden ser empleadas como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades (131).

Durante la última década se han lanzado varias iniciativas para mapear datos epigenómicos e interrelacionarlos, como el Consorcio internacional del Epigenoma Humano (IHEC), el Consorcio del Proyecto Enciclopedia de los Elementos del DNA (ENCODE), el Consorcio del Proyecto Epigenoma Humano (HEP), el Consorcio de Epigenómica de la hoja de ruta del NIH, el Proyecto Internacional del Epigenoma Humano (EpigGeneSys) y el Proyecto nucleosoma en 4D (132–136). Todo ello, con el fin de crear un análisis más completo sobre las enfermedades humanas, puesto que los biomarcadores epigenéticos podrían ayudar a obtener un diagnóstico temprano, una monitorización de la progresión y pronóstico del desenlace de la enfermedad, y la predicción de futuras morbilidades. Además, los biomarcadores epigenéticos podrían servir para seleccionar y estratificar pacientes para tratamientos específicos y evaluar los efectos, positivos o negativos, de las intervenciones terapéuticas (130).

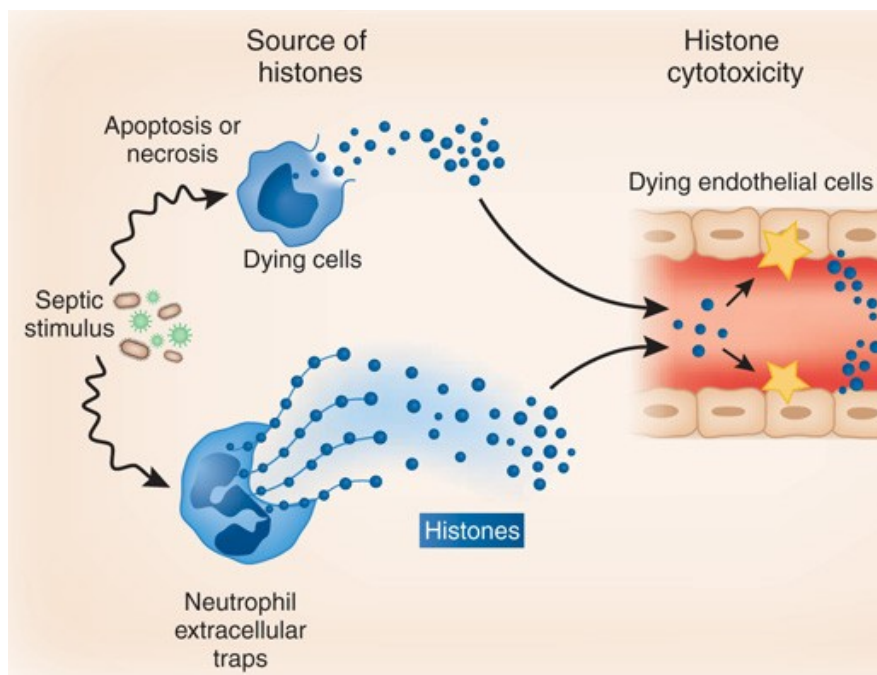
La epigenética incluye cambios en la expresión de los genes por modificaciones post-traduccionales de histonas (PTMs), cambios en la expresión de RNAs no codificantes como los RNA no codificantes largos (lncRNAs) o los microRNAs (miRNAs), entre otros, y cambios en los patrones de metilación del DNA. El presente trabajo de tesis se ha centrado en una PTM concreta: la citrulinación, puesto que es una modificación fundamental para la activación de procesos inmunológicos clave durante la respuesta innata activada durante la sepsis. Además, también se ha analizado el perfil de miRNAs, en plasma de pacientes con sepsis, ECC y PICS, y los cambios en la metilación del DNA en PBMCs en estos mismos grupos de pacientes, con el fin de hallar qué diferencias de expresión permiten discriminar estos subgrupos dentro de la sepsis, y de esta forma proponer nuevos biomarcadores que puedan predecir estos desarrollos más complejos de la enfermedad.

#### 2.4.1. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE HISTONAS: CITRULINACIÓN

La implicación de las histonas extracelulares como agentes microbianos y sus capacidad para eliminar patógenos invasores se ha investigado extensamente (137,138). Durante los últimos años se ha descubierto que las histonas extracelulares también pueden ser mediadores citotóxicos, capaces de empeorar el desarrollo de diversas enfermedades en las que las histonas han demostrado ser un mediador relevante (139,140). Estas proteínas hoy en día tienen un papel central en las enfermedades relacionadas con la inflamación y la inmunosupresión, como la sepsis (31,141,142). Sin embargo, trabajos previos de nuestro grupo demuestran que algunas PTMs en las histonas, como la acetilación, son capaces de reducir la capacidad citotóxica de las histonas extracelulares en células endoteliales (128).

Las histonas en la sepsis se han descrito como potenciales predictores del desarrollo de la enfermedad y como candidatos interesantes para terapias, puesto que se ha visto que causan daño a nivel sistémico, pero también a nivel local, habiéndose encontrado en numerosos órganos (33,34,124,143). En este sentido, nuestro grupo ha descrito cómo correlacionan los niveles de histonas circulantes con el pronóstico del paciente, siendo la histona H3 un potencial biomarcador de mal pronóstico de la enfermedad (139).

Las PTMs en las histonas se dan mayoritariamente en la cola de estas proteínas nucleares y pueden hacer que el ensamblaje de los nucleosomas cambie, contribuyendo así a la conformación de la cromatina y, por tanto, a la regulación de la expresión génica. En este sentido, el presente trabajo de Tesis se centra en la citrulinación, puesto que es una PTM necesaria para activar procesos inmunes como las trampas extracelulares (ET: Trampas Extracelulares, por sus significado en inglés *Extracellular Traps*), uno de los primeros mecanismos de defensa del organismo frente a una infección (144,145). Durante la sepsis, las histonas son liberadas al torrente sanguíneo principalmente por mecanismos inmunes conocidos como ETs, que pueden darse en células como los macrófagos (METs, Trampas Extracelulares de Macrófagos) o los neutrófilos (NETs, Trampas Extracelulares de Neutrófilos) (146,147). Durante estos eventos, las células granulosas liberan de manera activa la cromatina y todo su contenido intracelular al torrente sanguíneo, creando una red pegajosa, capaz de unirse a los patógenos invasores, que contiene proteínas altamente citotóxicas para los patógenos, contribuyendo así a su eliminación (32,148,149) (Figura 6).



**Figura 6. Fuentes de histonas circulantes.** Las fuentes de histonas circulantes pueden ser células en procesos de muerte celular (apoptosis o necrosis) o células activadas para hacer procesos de ETosis, en este

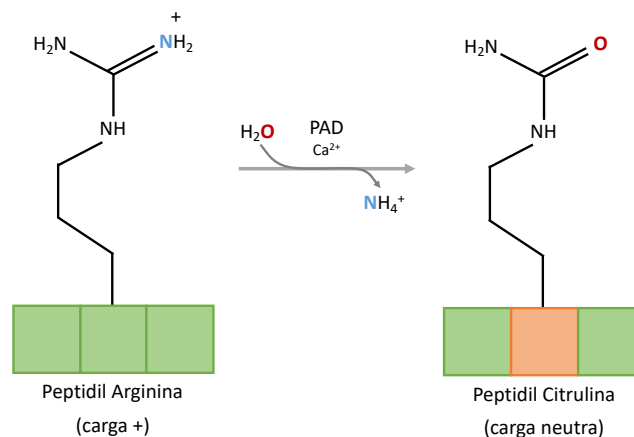
caso se representa un proceso de NETosis. Las histonas circulantes pueden dañar a las células endoteliales, contribuyendo a la fisiopatología de la sepsis y al fallo orgánico.

**Fuente:** Figura adaptada de Chaput & Zychlinsky (150).

La citrulinación de la histona H3 (H3cit) es un evento clave para que se inicien los procesos de ETosis, jugando un papel central en la modulación de la respuesta inmune innata (144,145).

En otros mecanismos de eliminación de patógenos, como la fagocitosis, los patógenos son engullidos por un fagosoma que se fusiona con los gránulos intracelulares para formar un fagolisosoma en el que los patógenos son eliminados por péptidos antimicrobianos, enzimas y el aumento de ERO (151). Sin embargo, en los mecanismos de ETosis, las células inmunitarias como los neutrófilos liberan una estructura extracelular que consiste en hebras de cromatina de un diámetro aproximado de ~15nm a la que se unen péptidos antimicrobianos, como pueden ser la catepsina G o la elastasa de neutrófilos (151,152). En este sentido, cabe destacar que tanto los macrófagos como los neutrófilos son células granulosas que pueden actuar fagocitando a los patógenos, activando mecanismos de piroptosis celular, mecanismos por los cuales además de eliminar a los patógenos desencadenan una cascada inflamatoria mediante la liberación de citoquinas piroptóticas como la IL-1 y la IL-18, además de inducir mecanismos de ETosis celular (153–155). Es interesante resaltar que la piroptosis es un proceso de muerte celular programada en el que la célula es capaz de promover una respuesta inflamatoria. Se ha descrito que los NETs son capaces de promover la piroptosis de macrófagos durante la sepsis, amplificando la respuesta inmunitaria en los sitios de infección donde hay un gran reclutamiento de leucocitos (156). De hecho, los neutrófilos y los macrófagos se movilizan rápidamente desde la médula ósea donde se generan, hasta el sitio de infección, por un incremento sistémico de los niveles de GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor*), niveles que nuestro grupo describió elevados en pacientes sépticos durante estadios tempranos de la enfermedad, posiblemente por ser la citoquina granulopoyética clave tras la infección (57,157). Además, se ha visto que el aumento de GM-CSF causa un incremento de la producción de estas células, tanto de los macrófagos como de los neutrófilos (157). Toda esta sobreproducción de neutrófilos y macrófagos causada por el incremento de los niveles sistémicos de GM-CSF, potencia la respuesta inmune del paciente frente a la sepsis, lo cual desencadena finalmente la activación de ETosis celular. Los mecanismos de ETosis son fundamentales para frenar la expansión de la infección y, se ha relacionado el inicio de estos procesos con un aumento de los niveles de ERO (158). Así mismo, el mecanismo por el que la red formada durante la ETosis es capaz de atrapar los patógenos no se ha descrito todavía, aunque se postula que está relacionada con la carga negativa que le da la cromatina (151).

Las Peptidilarginina Deiminadas (PADs), son las enzimas catalizadoras de este proceso de ETosis, siendo la isoforma 4, PAD4, la más importante en este proceso, aunque se ha descrito que la isoforma 2, PAD2, también puede intervenir en este proceso de citrulinación (159,160) (Figura 7). Además, se ha demostrado que la PAD4 es capaz de citrulinar otras histonas, como la H4, la H2A y la H1 (161–165). Por lo tanto, debido a que la citrulinación de la H3 es un evento crítico para que se active la ETosis, una respuesta inmune clave durante la sepsis, se espera que gran proporción de las histonas H3 que circulan por el torrente sanguíneo durante un episodio séptico estén citrulinadas. Además, dado que las PAD son capaces de citrulinar otras histonas y de seguir activas una vez se han liberado por procesos de ETosis, se espera que gran cantidad de histonas circulantes durante estadios tempranos de la sepsis, se encuentren también citrulinadas. Esto es una de las bases de este trabajo, puesto que, aunque hay muchos estudios realizados para entender el papel de las histonas durante el desarrollo de la sepsis, ya que éstas pueden actuar como DAMPs activando mecanismos que afecten al endotelio, contribuyendo a la progresión de la sepsis (17,142,166) (Figura 6). Sin embargo, apenas hay trabajos que expliquen si las histonas extracelulares libreadas al torrente sanguíneo y que tienen PTMs, como la citrulinación, están implicadas en el curso de la sepsis. En este sentido, trabajos previos han observado que la inhibición de la desacetilación (induciendo la acetilación como PTM) tiene efectos inmunomoduladores positivos (167), induciendo la formación de NETs, probablemente debido a que la inhibición de la desacetilación, al mismo tiempo causa un aumento de acetilación, también aumenta la citrulinación (48,168). Sin embargo, a pesar de que este tipo de estudios ponen de manifiesto la implicación de las PTMs en el desarrollo de la sepsis, no existen muchos estudios que hablen de la implicación de las PTMs en los mecanismos citotóxicos de las histonas, ni tampoco se han encontrado correlaciones entre PTMs y el transcurso de la enfermedad.



**Figura 7. Reacción de desaminación catalizada por las PAD** (Peptidilarginina Deiminadas). En esta reacción el grupo amino de la molécula Arginina se sustituye por un grupo oxígeno, neutralizando la carga positiva y dando lugar a una molécula neutra de Citrulina.

**Fuente:** Imagen adaptada del trabajo de Brentbille *et al* (169).

Por todo ello, la formación de ETs es una estrategia inmunitaria muy efectiva para eliminar patógenos, sin embargo, si su formación se desregula, los NETs pueden propagar la inflamación. Además, debido a que los NETs se liberan en el torrente sanguíneo, el primer tejido en verse afectado será el tejido endotelial, contribuyendo así a un aumento de trombosis microvascular causada por las histonas por la activación de la trombina. Así mismo, la trombosis microvascular puede derivar en DIC (125,170,171). Estos eventos moleculares pueden originar procesos de muerte celular devastadores, así como dañar las funciones tisulares y orgánicas, causando un aumento de la inflamación y acelerar la progresión de la sepsis hacia una situación crítica (172).

#### 2.4.2. RNAs REGULATORIOS EN SEPSIS: MICRORNAs

Los RNAs reguladores, también conocidos como RNAs no codificantes (nc-RNAs), han ganado gran importancia en la actualidad, ya que se han postulado como reguladores estrella de la señalización inflamatoria (173,174), y pueden ser potenciales biomarcadores ideales no sólo para la sepsis, sino también para algunas de las comorbilidades más comunes asociadas a ella (33,34).

Los lncRNA son una clase de RNA reguladores compuestos por más de 200 nucleótidos (175), capaces de remodelar la cromatina y regular la expresión génica a nivel transcricional y postranscricional en respuesta a varios estímulos (176). La desregulación de lncRNAs causa un impacto en las funciones celulares, como la proliferación celular o la resistencia a la apoptosis (176–178), que se han relacionado con la sepsis y su progresión (179). Otro tipo de RNA regulador descubierto recientemente son los RNAs circulares (circRNAs) (180), los cuales se encuentran libres en el citoplasma de las células o almacenados en exosomas, y se forman a partir de genes codificantes o no codificantes mediante procesos de *back-splicing* (181). Una de las características más importantes de este tipo de RNAs reguladores es que presentan una estabilidad y especificidad superior a otros tipos de RNAs reguladores, y además son capaces de marcar el estadio o fase de desarrollo de una enfermedad (182–184) (revisado en Osca-Verdegal *et al* (185)). A pesar de todo ello, los RNAs reguladores más estudiados hasta el momento son los microRNAs, los cuales son nc-RNAs conservados y cortos (17-25nt) que regulan la expresión de genes, incluido su silenciamiento, a nivel post-transcricional (186). Los miRNAs son biomarcadores y prometedoras dianas terapéuticas para la gran mayoría de enfermedades, dada su elevada estabilidad y por su capacidad de controlar diferentes procesos moleculares (186,187).

A pesar de que el origen de los miRNAs circulantes en la sepsis sigue sin estar claro, se postula que las células en proceso de muerte celular, bien sea por mecanismos de apoptosis, necrosis o ETosis, pueden ser las encargadas de liberarlos (188,189). Durante los últimos años se ha descrito



una amplia variedad de miRNAs relacionados con procesos inflamatorios o infecciosos, y un gran panel de los miRNAs implicados en la modulación de la respuesta inmunitaria en la sepsis (190–192). Sin embargo, todavía no se ha llegado a un consenso que determine si es mejor emplear un sólo miRNA o un conjunto de ellos (firma de miRNAs), para el diagnóstico, pronóstico o manejo clínico de la sepsis (193). En efecto, este es un área que comienza a ser explorada en la investigación en la actualidad y requiere de un mayor número de estudios con mayores cohortes de pacientes que permitan validar clínicamente el potencial uso de los miRNAs en sepsis.

Recientes estudios han descrito una serie miRNAs individuales y firmas de varios de ellos para diagnosticar la sepsis y para diferenciar estados más críticos como el shock séptico de manera temprana, así como para discriminar de otros casos críticos sin infección. Caserta *et al.* han encontrado una familia de miRNAs circulantes regulados a la baja en plasma (miR-30d-5p, miR-30a-5p, miR-192-5p, miR-26a-5p, miR-23a-5p y miR-191-5p), que permiten discriminar los casos graves de pacientes con sepsis de aquellos casos que presentan SIRS (194). Wang *et al.* han reportado niveles séricos bajos de los inflamamiRs miR-146a y miR-223 en pacientes sépticos, permitiendo distinguir a los pacientes con sepsis de aquellos con SIRS con una sensibilidad del 63% y del 80% respectivamente, y una especificidad del 100% y del 80% respectivamente (195). Sin embargo, otro estudio encontró elevados estos mismos miRNAs en una cohorte china de sepsis pediátrica al comparar SIRS y grupos de control y, específicamente, los niveles de miR-146a fueron más altos en sepsis grave (196). Otro estudio realizado en muestras de suero ha indicado altos niveles de miR-15a y miR-16 en pacientes sépticos en comparación con SIRS y sujetos sanos. Asimismo, miR-15a ha mostrado una buena sensibilidad y especificidad para distinguir la sepsis del SIRS (197). Otros estudios destacan que el miR-15a es un buen candidato para diferenciar pacientes sépticos o pacientes con SIRS de pacientes sanos. De hecho, los niveles séricos de miR-15a incrementan en pacientes de sepsis y SIRS en comparación con los controles, siendo más elevados en pacientes con SIRS que en los pacientes sépticos. Así pues, Wang *et al.*, postularon el miR-15a como un biomarcador para diagnosticar la sepsis con buena sensibilidad y especificidad, más alta todavía que las obtenidas con la PCR o la PCT (197). La importancia de este miRNA deriva de algunos estudios que han indicado que tanto miR-15a como miR-16 están regulados al alza también en pacientes con sepsis neonatal (198) y tienen una sensibilidad y especificidad elevadas, capaces de distinguir la sepsis del SIRS (197). Curiosamente, la regulación a la baja de miR-15a se ha relacionado con una respuesta inmune anormal en pacientes con otras enfermedades (199), reforzando que sería un buen candidato para identificar la sepsis.

El miR-122 es otro de los miRNAs que se ha encontrado en diferentes cohortes de pacientes con sepsis. El miR-122 se ha reportado elevado en muestras de plasma y suero tomadas de pacientes en al menos 3 estudios, excepto en el trabajo de Wang *et al.*, que describió bajos niveles de miR-

122 (200,201). Este miRNA se ha relacionado con la regulación del elemento de respuesta estimulada por el interferón, que incrementa la respuesta celular al INF- $\gamma$  (202), siendo clave para la respuesta inmune innata, por ser una citoquina proinflamatoria clave, además de regular la activación de los macrófagos y de las células NK (57).

Los casos de miRNAs descritos hasta el momento son sólo ejemplos del potencial que tiene conocer qué RNAs regulatorios, y más concretamente qué miRNAs, están elevados en cada estadio de la enfermedad. Por ello, se quiere resaltar la funcionalidad que tiene la transcriptómica, puesto que permite conocer qué transcritos y qué cantidad hay en una célula, durante una condición fisiológica específica. Observar el transcriptoma permite comprender el desarrollo de una enfermedad, puesto que permite la cuantificación del número de copias de un transcrito, incluyendo los RNAs mensajeros y nc-RNAs (203).

El desarrollo de técnicas de secuenciación del RNA (RNA-seq) enfocadas en la expresión de pequeños RNAs (smallRNA-seq), y concretamente de miRNAs (miRNA-seq) ha permitido nuevas maneras de entender, diagnosticar y tratar diferentes enfermedades (204). Por ello, la secuenciación de miRNAs, así como su validación, permite establecer los perfiles de miRNAs de cada grupo de pacientes, compararlos y encontrar miRNAs específicos de cada estadio de la enfermedad. De este modo, hallar cuáles son los miRNAs alterados en los pacientes sépticos o en grupos de pacientes con fenotipos más críticos, como son los pacientes con ECC o con PICS, especialmente en estadios tempranos de la sepsis, podría permitir clasificar a los pacientes que van a tener una peor evolución y requieren de una vigilancia mucho más estrecha en la UCI.

#### 2.4.3. METILACIÓN COMO MODIFICACIÓN EPIGENÉTICA EN SEPSIS

La metilación es un mecanismo epigenético asociado generalmente con la supresión génica, que puede darse tanto en el DNA como en las colas de histonas mediante procesos de PTMs. La metilación ocurre por la transferencia de un grupo metilo en el carbono-5 (C5) de la citosina para formar 5-metilcitosina (205). Este proceso suele darse simultáneamente en regiones que contienen muchas citosinas, conocidas como *islas CpG*, que son regiones ricas en grupos citosina y guanina, contribuyendo al silenciamiento génico. Así pues, la metilación puede actuar en la diferenciación de las células que derivan de linajes linfoides y mieloides, para regular la respuesta inmune (206,207) (Figura 8 y 9). Cabe destacar que la funcionalidad del sistema inmunitario depende de un proceso de diferenciación de células hematopoyéticas que debe estar bien regulado para formar las células inmunes diferenciadas y funcionales. Esta diferenciación está basada en programas epigenéticos concretos que pueden ser alterados durante los procesos infecciosos, como ocurre durante la sepsis (31,208–213). Por ello, el perfil de metilación va cambiando de manera controlada durante el desarrollo hematopoyético de las diferentes células inmunitarias, como

neutrófilos, macrófagos (Figura 8), linfocitos B y T (Figura 9), aunque no se han visto cambios considerables de metilación durante los procesos de diferenciación y activación de los neutrófilos ni de los macrófagos (214). Sin embargo, se conoce que la desmetilación de histonas por Jmjd promueve la polarización de los macrófagos a M2, pero no se necesita para la polarización a M1. Así mismo, la desmetilación de la H3K27me3 se necesita para la producción de citoquinas y la sobreexpresión de Arg1, Ym1 y IL1Rn en macrófagos M2 (215). Por ello, debido a que la sepsis produce cambios en las PTMs de las histonas (H3K9me3, H3K27me3 y H3K4me3), puede regular la expresión de genes proinflamatorios clave como IL-6 e IL-1 $\beta$ . Además, la actividad de DNMT1 está asociada con la liberación de citoquinas proinflamatorias en macrófagos mediante la hipermetilación de *SOCS1* en macrófagos M1 y la hipometilación del mismo gen en macrófagos M2, siendo este gen esencial también para el control de la producción de IFN- $\gamma$  durante la activación de las NKs (57,215). En este sentido, tras la exposición a LPS, los macrófagos muestran una remodelación epigenética en genes clave, como H3K9me2 e hipermetilación en regiones promotoras de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12B, NO y TNF- $\alpha$  (215).

Cabe destacar que mientras que la metilación del DNA es estable a largo plazo en las células somáticas, los patrones de metilación en las histonas pueden originarse durante el curso del ciclo celular en diferentes momentos vitales, pudiendo aparecer ocasionados por enfermedades como la sepsis (215). Así pues, algunos estudios indican que la metilación del DNA y de las histonas está conectada. De hecho, Sarraf y Stacheva han demostrado que la metilación del DNA y la metilación de las histonas se producen conjuntamente durante la replicación, para asegurar que los patrones específicos de metilación pasen a la progenie celular (216).

Por todo lo descrito anteriormente, caracterizar los cambios de metilación de los promotores de los genes implicados en la regulación de las células inmunitarias porporcionaría biomarcadores candidatos para el diagnóstico y pronóstico de la sepsis, así como un gran avance a la hora de comprender la fisiopatología de la enfermedad (217). Sin embargo, a pesar del potencial que puede tener este tipo de investigación, no se han realizado muchos estudios en este campo en pacientes con sepsis. Por ejemplo, Zemmour *et al*, analizaron los cambios de metilación en 100 pacientes sépticos, concretamente en el locus *FAM101A*, y encontraron elevados niveles de copias sin metilar en estos pacientes. Es más, observaron que una cantidad superior a diez copias por mililitro de *FAM101A* era un biomarcador altamente predictivo de un mal pronóstico en pacientes con sepsis (218).

Así mismo, otros estudios se han realizado en otras tipologías de sepsis, como es el caso de sepsis neonatal. Así, estudiar la metilación en muestras de sepsis neonatal puede permitir entender qué mecanismos celulares pueden quedar alterados en los bebés que la sufren, puesto que se ha

observado que durante la sepsis, la metilación global del DNA de las células sanguíneas aumenta en recién nacidos que padecen sepsis neonatal (219,220). En este sentido, nuestro grupo ha publicado recientemente un trabajo en el que halló aproximadamente 1051 DMRs en promotores y 119 DMRs en genes con metilación diferencial estadísticamente significativa entre neonatos prematuros con sepsis y neonatos prematuros control, de las cuales se encontraron un total de 26 promotores con una diferencias superior al 10% (220). Los principales promotores hipometilados obtenidos en este trabajo están implicados en la respuesta inmunitaria (*EGOT*, *IL10*, *CPT1B*, *PILRA*, *ELANE*, *TREMI*, *PRTN3*, *MIR145*, *SI00A8*, *CSTA*, *MS4A3*, *ATP8B4*, *CPT1B*, *CMYA5*, *LRG1* y *CD300LB*) y los principales genes hipermetilados están relacionados con la inmunidad adaptativa, concretamente con la activación de los linfocitos T (*CD3G*, *CD3D*, *LTA*, *TXK*, *UBASH3A* y *SIT*). Así mismo, Dhaset *et al.*, han estudiado los cambios de metilación del DNA en muestras de pacientes con sepsis neonatal y han hallado diferencias de metilación en 64 genes (221). Los autores destacaron las diferencias de metilación halladas en *PCDHB*, que son genes implicados en la respuesta inmune, por controlar adhesión de células leucocitarias a través de las cadherinas, y en la vía de señalización Wnt, implicada en el correcto desarrollo. Concretamente, encontraron hipermetilados en los leucocitos los genes *PCDHB5*, *PCDHB6*, *PCDHB7*, *PCDHB9*, *PCDHB11* y *PCDHB12*. Del mismo modo, Dhas *et al.*, han hallado que el gen *CCS*, relacionado con la respuesta antioxidante, está hipermetilado, y que el gen *DEGS2*, relacionado con el metabolismo de los esfingolípidos, está hipometilado (222,223).

Lorente-Sorolla *et al.* analizaron las diferencias de metilación que se dan en los monocitos de pacientes sépticos y pacientes con SIRS no infecciosa, y observaron que los genes *IL1A*, *CCL22*, *CCR2* y *STAT3* estaban hipermetilados y los genes *HLA-A*, *SOCSI*, *IL1R2* y *CD46* estaban hipometilados. Además, en este trabajo también se identificó una relación significativa entre los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10, la proinflamatoria IL-6, y los cambios de la metilación del DNA, que aumentaron de manera significativa en pacientes con sepsis (224). Lorente-Sorolla *et al.*, correlacionaron la metilación del DNA con una mayor disfunción orgánica (mayor puntuación SOFA) en los pacientes con sepsis. Lo mismo hicieron Binnie *et al.*, que correlacionaron los fenotipos clínicos con peor pronóstico, con los cambios de metilación del DNA (225). Esto lo hicieron gracias a las diferencias de metilación halladas al analizar muestras de pacientes sépticos y no sépticos con arrays de metilación *Infinium 450K* (Illumina). Entre los genes que encontraron, algunos de ellos están fuertemente relacionados con la respuesta inmunitaria durante la sepsis, entre los que destacan *MPO*, *ANGPT2*, *LPO*, *MHC* clase I A y C, *MHC* clase II isotipo DQ  $\beta$ -I e isotipo DR  $\beta$ -I, *LIPA*, *PONI*, *FCG2A*, *IL23A*, entre otros (225). Algunos de estos genes se muestran hipermetilados también en células B activas, como es el caso de *MHC-II*, *HLA-DR*, *HLA-DL* y *HLA-DQ*, induciendo fenómenos de inmunosupresión (215).

Los trabajos descritos proporcionan robustez en la idea de que los cambios en los patrones de metilación pueden ser empleados para diagnosticar la sepsis, así como para conocer en tiempos iniciales el pronóstico de los pacientes. Además, se ha visto que los genes que cambian están relacionados con la respuesta inmunitaria (Figura 8 y 9), por lo que la metilación podría explicar la inmunosupresión a largo plazo que se genera en estos pacientes, puesto que los avances en este campo han permitido comenzar a conocer qué ocurre durante el proceso fisiopatológico de la sepsis. Entre otros, ha permitido entender cómo se produce la desregulación de la respuesta inmunitaria del huésped, incluyendo la respuesta inflamatoria, ya que algunos estudios han definido cómo cambia la metilación del DNA durante la exposición de diferentes modelos celulares a LPS (Lipopolisacárido) (226–228). Los monocitos humanos son uno de los modelos que cambia los patrones de metilación del DNA cuando se expone a LPS, al tiempo que adquiere tolerancia a endotoxinas (224). Así mismo, estudiar la metilación ha permitido comprender cómo se producen los mecanismos de inmunoparálisis por reprogramación de las células inmunes, por lo que el estudio de la metilación del ADN podría ser clave para comprender los procesos que llevan a ciertos pacientes de sepsis desarrollar un proceso de PICS.

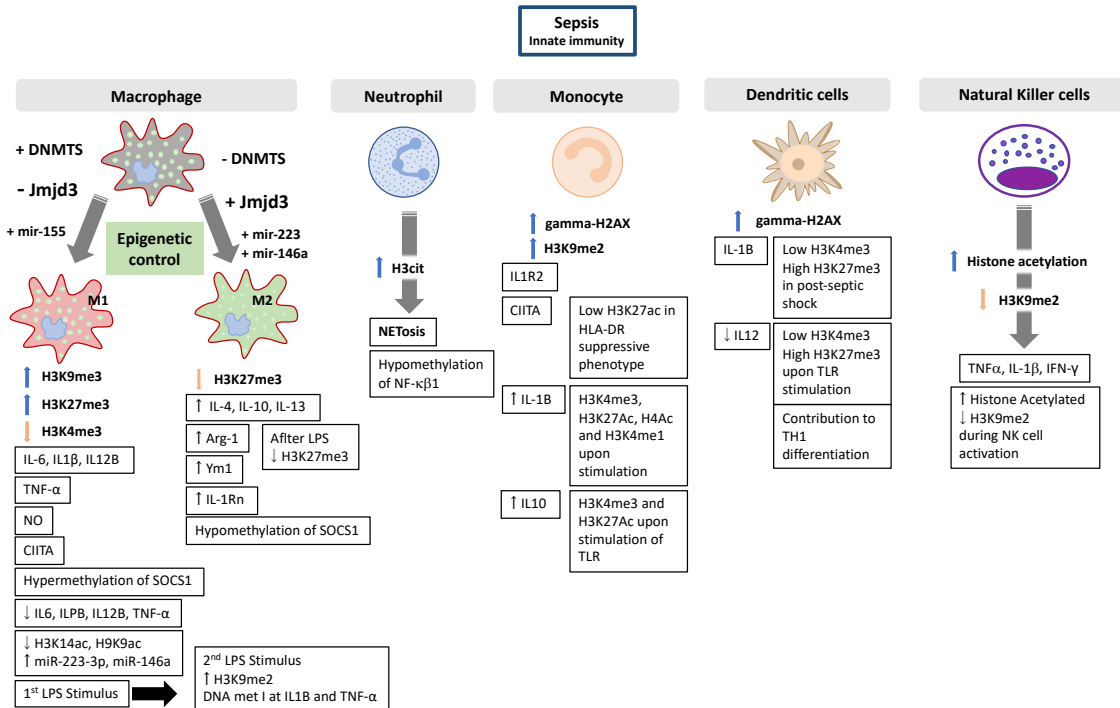
La metilación del DNA puede producirse a nivel de promotor, silenciando la expresión de los genes. Es el caso de la *IL6*, *IL* inflamatoria por excelencia, así como de la *IL8*, el factor de necrosis tumoral alfa (*TNFA*), o algunos *Toll Like Receptors* (*TLR2* y *TLR4*). No obstante, estos genes no han mostrado cambios de metilación a nivel de promotor en muestras sanguíneas de sepsis neonatal (229). Sin embargo, Tendl *et al.*, hallaron diferencias de metilación en CpGs del promotor del gen *CALCA*, implicado en la respuesta a infecciones bacterianas, ya que se ha descrito que es capaz de regular la transcripción de la PCT durante infecciones bacterianas, pudiendo emplearse como biomarcador epigenético de diagnóstico de sepsis bacterianas en neonatos prematuros (229,230).

Así mismo, la hipometilación del promotor de *FOXP3* en las células T reguladoras (Treg) en comparación con células T CD4 + vírgenes en pacientes sépticos, podría indicar el estado de la proliferación celular de los linfocitos T (231,232). Por lo tanto, conocer el estado de metilación de *FOXP3* en estas células reguladoras, podría contribuir a indicar el estado inmune de los pacientes, puesto que un incremento de Treg puede estar relacionado con la inmunosupresión a largo plazo que se observa en los pacientes sépticos, ya que inhibe la respuesta inflamatoria (233). En consecuencia, conocer el patrón de metilación de este gen, podría ayudar a predecir la inmunosupresión post-séptica.

La viabilidad y la función de los linfocitos B de memoria también están mediados por la metilación del DNA, presentando patrones diferenciales de metilación del DNA (234), por lo que

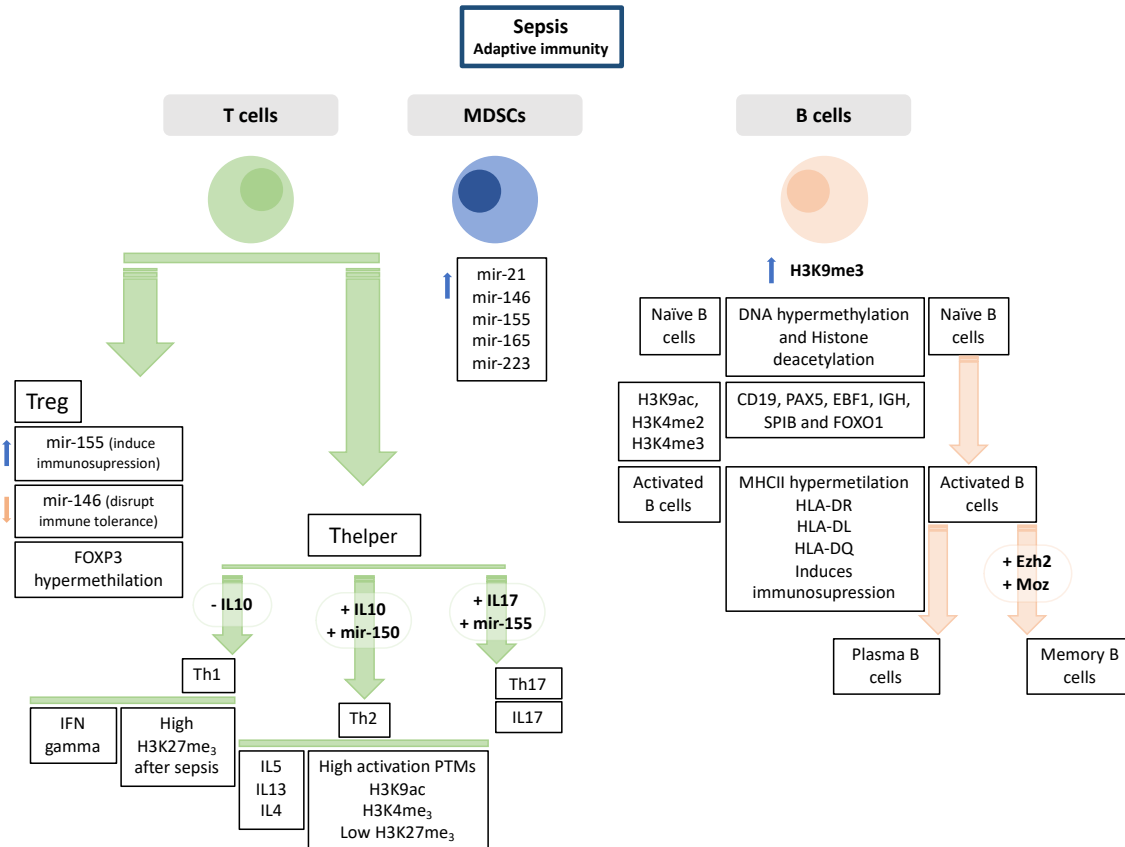
conocer los patrones de metilación del DNA específicos de la dinámica de los linfocitos B, así como la producción de células B reguladoras y su papel en la función inmunológica sería de gran ayuda para entender los fenómenos de inmunosupresión que en ocasiones se producen en la sepsis. Así pues, se ha visto que, los pacientes con SS presentan un mayor número de células Breg, Treg y células B agotadas, y una capacidad de proliferación mucho menor de las células B (235). Además, se ha visto que las MDSC son las responsables de la inmunosupresión mediada por linfocitos B, capaces de suprimir la activación de las células T CD8+ efectoras (236). Así mismo, las MDSC también pueden mediar la inhibición de los linfocitos T a través de la expresión de arginasa-1, que causa una supresión de L-arginina, necesaria para que las células T puedan desarrollar su función (237). De este modo, un estudio demostró que la hipometilación del promotor del gen *ARG1* disminuye en las MDSC mediante el uso de un cannabioide exógeno como es el 9-tetrahidrocannabinol, puesto que es un potente inductor de la función inmunosupresora de las MDSC (238).

Todo lo descrito hasta el momento deja patente la importancia que tienen los cambios de metilación en la respuesta inmunitaria y cómo estos cambios pueden explicar la inmunosupresión a largo plazo en los pacientes con sepsis, tanto neonatos como adultos.



**Figura 8. Control epigenético de la diferenciación y función de las células del sistema inmunitario innato.** En macrófagos, la desmetilación de histonas por Jmjd promueve la polarización a M2, pero no se necesita para la polarización de M1. La desmetilación de la H3K27me3 se necesita para la producción de citoquinas y la sobreexpresión de Arg1, Ym1 y IL-1Rn en macrófagos M2. Debido a que la sepsis produce una PTM de las histonas (H3K9me3, H3K27me3 y H3K4me3), puede regular la expresión de genes proinflamatorios clave como IL-6 e IL-1β. Además, la actividad de DNMT1 está asociada con la liberación de citoquinas proinflamatorias en macrófagos mediante la hipermetilación de *SOCS1* en macrófagos M1 y la hipometilación del mismo gen en macrófagos M2. Los neutrófilos son otro tipo celular importante para los estados iniciales de la sepsis. Además, tras la exposición a LPS, los macrófagos muestran una remodelación epigenética en genes clave y elevados niveles de marcas representativas, como H3K9me2 e hipermetilación en regiones promotoras de IL-1β, IL-6, IL-12B, NO y TNF-α. Una de las PTMs más importantes en este tipo celular es la citrulinación de la histona H3, que activa la NETosis y contribuye a la liberación de histonas y otras alarminas que, a su vez, contribuyen a la progresión y severidad de la sepsis. Además, las citoquinas expresadas por los neutrófilos y los monocitos son mediadores fundamentales de las funciones inmunes de estas células, por lo que el control de las PTMs en histonas como H3K27Ac, H3K4me3 y H3K4me1 parece esencial para la expresión CITA, IL-1β y la IL-10. Las células dendríticas colaboran regulando la sobreexpresión de IL-1β, cuyos niveles correlacionan con bajos niveles de H3K4me3 y elevados niveles de H3K27me3. La regulación a la baja de la IL-12 también depende de bajos niveles de H3K4me3 y elevados niveles de H3K27ac, H4ac y H3K27me3; lo cual es importante porque esta IL contribuye a la diferenciación de TH1. Finalmente, las NK están implicadas en la liberación de citoquinas como IFN-γ, en estados iniciales y otros mediadores como TNF-α, IL-1β y TRAIL, durante la progresión de la sepsis, los cuales contribuyen a su patofisiología. En consonancia con esto, la acetilación de las histonas y los niveles de H3K9me2 han demostrado estar relacionados con la expresión de estos mediadores. Además, la metilación del DNA de *SOCS1* es esencial para el control de la producción de IFN-γ durante la activación de las NKs. Abreviaturas: DNMT: DNA metiltransferasa; LPS: Lipopolisacárido, NK: célula *Natural Killer*; PTM: Modificación Post-traduccional; NETosis: Trampa Extracelular de Neutrófilos, Treg: célula T reguladores; INF: Interferon, TNF: Factor de Necrosis Tumor

**Fuente:** Figura adaptada de nuestro trabajo Osca-Verdegal *et al* (215).



**Figura 9. Control epigenético de la diferenciación y función de las células del sistema inmunitario adaptativo.** La sepsis afecta las funciones efectoras y los fenotipos de las células T y B, así como las MDSCs. La proporción de células agotadas, Tregs y células B es elevada tras la sepsis, cuando estos tipos celulares juegan un rol mayoritario en la ejecución de funciones linfocíticas. Los mecanismos epigenéticos ejercen un control clave controlando la función de estas células. Durante la sepsis, las células Treg inducen la sobreexpresión del miR-155 (el cual induce inmunosupresión) y la regulación a la baja del miR-146 (que interrumpe la tolerancia inmunológica). Además, *FOXP3*, el cual presenta un rol crítico en el desarrollo de la función de las Treg, está hipometilado en estas células. Las células Th, encargadas de activar los linfocitos Tc para destruir a las células infectadas, se diferencian en diferentes subtipos (Th1, Th2, Th17...) por la IL-10 o la IL-17. Los miRNAs también presentan una función importante en la regulación de diferenciación de las células Th. Así pues, el miR-150 y el miR-155 contribuyen a la diferenciación a Th2 y Th17 respectivamente. Las PTMs en histonas también contribuyen a la diferenciación en células Th. La Th1 se caracteriza por un elevado H3K27me<sub>3</sub> en el gen *IFNG* tras la sepsis. Las células Th2 muestran elevados niveles de H3K9ac y H3K4me<sub>3</sub>, y bajos niveles de H3K27me<sub>3</sub> en los genes *IL4*, *IL5* y *IL13*. El rol de la epigenética regulando las MDSCs durante la sepsis continúa investigándose, pero algunos autores han demostrado que durante la sepsis estas células incrementan los niveles de expresión del miR-165 y el miR-21. En relación a las células B, las células B nativas se caracterizan por una hipermetilación del DNA y desacetilación de histonas, a través de la activación de H3K9ac, H3K4me<sub>2</sub> y H3K4me<sub>3</sub> en los genes *CD19*, *PAX5*, *EBF1*, *IGH*, *SPIB* y *FOXO1*. En cambio, las células B activadas, muestran hipermetilación en *MHC-II*, *HLA-DR*, *HLA-DL* y *HLA-DQ*, induciendo a inmunosupresión. Finalmente, una vez las células B son activadas, pueden diferenciarse en células B plasmáticas o de memoria. Abreviaturas: MDSC: células supresoras derivadas de mieloides; PTM: Modificación Post-traduccional; Th: T helper cell; Treg: T reguladora.

**Fuente:** Figura adaptada de nuestro trabajo Osca-Verdegal *et al* (215).



En resumen, debido a que la sepsis es una de las principales causas de muerte en las UCI, llegando a producir una de cada cinco muertes a nivel mundial (239), es necesario reducir la alta tasa de mortalidad asociada a ella, por lo que el descubrimiento de nuevos biomarcadores que permitan la identificación temprana de la sepsis, sería de gran utilidad. Así mismo, el diagnóstico rápido y temprano ayudaría a efectuar un mejor tratamiento, evitando la evolución a peores fenotipos clínicos, como el ECC y el PICS. Por otro lado, conocer los mecanismos epigenéticos que subyacen a la reprogramación y a la función de las células inmunitarias permitiría conocer como se producen los fenómenos de inmunosupresión que contribuyen al fenotipo de PICS, e incluso establecer un perfil molecular que permita definir adecuadamente este fenotipo clínico. En este sentido, los pacientes supervivientes a episodios sépticos mostrarían menos comorbilidades, reduciendo los elevados costes económicos que esto supone para los sistemas sanitarios, no solo en nuestro país, sino a nivel mundial. Por todo ello, elucidar los mecanismos moleculares activados por las histonas extracelulares y los cambios epigenéticos que se producen en las células inmunitarias de estos pacientes una vez se ha producido la sepsis, especialmente a nivel de regulación del sistema inmunitario es de suma importancia para comprender las bases moleculares de la sepsis y los fenómenos de inmunosupresión del fenotipo de PICS, permitiendo descubrir nuevos biomarcadores de diagnóstico y pronóstico, así como desarrollar nuevas terapias más eficaces para el tratamiento de la sepsis.



## **3. HIPÓTESIS**



Una vez revisada la bibliografía y planteado el estado actual de lo que es conocido sobre los mecanismos inmunitarios que se ponen en marcha como respuesta al proceso séptico sistémico nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo: postulamos que los niveles de histonas H3 citrulinadas, secretadas al torrente sanguíneo por un mecanismo de defensa del organismo como es la NETosis, deben ser elevados durante los estadios iniciales de la sepsis, generando menor daño en comparación con las histonas que no presentan esta modificación post-traducciona. Entender los mecanismos moleculares activados o mediados por las histonas citrulinadas permitirá establecer qué papel tiene esta modificación durante la respuesta inmune innata del paciente. Así mismo, planteamos que analizar los niveles de histonas circulantes, y en particular H3 citrulinada, en los pacientes sépticos nos permitirá establecer biomarcadores de desarrollo y progresión de la enfermedad, además de plantear nuevas terapias. En el ámbito de la sepsis, otra necesidad en la clínica es identificar endotipos específicos de pacientes que puedan evolucionar a estadios más severos. Por ello, los patrones de expresión de microRNAs y los cambios de metilación en el DNA podrán servir para clasificar fenotipos clínicos y evolutivos de los pacientes con sepsis, permitiendo detectar aquellos pacientes que puedan ser clasificados como Enfermos críticos crónicos o que puedan desarrollar un síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión, estableciendo así protocolos de seguimiento adecuados para estos pacientes, con el fin de disminuir la elevada mortalidad y mejorar la calidad de vida de los pacientes sépticos que sobreviven a una sepsis.



## **4. OBJETIVOS**





El objetivo principal de esta tesis doctoral es proponer nuevos biomarcadores que sirvan para el diagnóstico y el pronóstico de los pacientes con sepsis, así como clasificar algunos fenotipos concretos de la sepsis, como son la Enfermedad Crítica Crónica (ECC) y el Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión (PICS).

Para ello se han definido los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Determinar el efecto y los mecanismos moleculares activados por las histonas extracelulares citrulinadas en un modelo *in vitro* de células endoteliales humanas, comparando la respuesta celular cuando son expuestas a histonas extracelulares nativas e histonas extracelulares citrulinadas.
- 2.- Analizar los niveles de histonas circulantes y los de histona H3 citrulinada (H3cit) en muestras de plasma de pacientes sépticos ingresados en la UCI, estableciendo un seguimiento de sus niveles a lo largo de su estancia en UCI.
- 3.- Comprender el efecto de los niveles de histonas circulantes y H3cit, sobre los fenotipos clínicos y la evolución de los pacientes durante su estancia en la UCI.
- 4.- Evaluar los cambios de expresión de los microRNAs en plasmas en diferentes grupos de pacientes sépticos, incluyendo los pacientes con ECC y PICS, además de correlacionar los resultados obtenidos con los fenotipos clínicos de estos pacientes.
- 5.- Analizar los cambios en los patrones de metilación del DNA en células mononucleares de sangre periférica obtenidas a partir de diferentes cohortes de pacientes con sepsis, incluyendo pacientes con ECC y PICS; y correlacionar los resultados obtenidos con los fenotipos clínicos de estos pacientes.



# **5. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y SELECCIÓN DE PACIENTES

### 5.1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO

Estudio observacional prospectivo longitudinal realizado en la Unidad de Cuidados Intensivos (U.C.I.) del Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV) desde diciembre de 2016 hasta enero 2020, realizado en una cohorte de pacientes ingresados en la UCI del HCUV, con diagnóstico de sepsis, SS, ECC y PICS.

### 5.1.2. COMITÉ ÉTICO DEL ESTUDIO

El estudio titulado “*Epigenetic biomarkers for sepsis. Focus on long-term immunosuppression and future comorbidities in survivors*” ha sido aprobado por el Comité ético de investigación clínica del HCUV en su reunión del 30 de junio de 2016, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información de los pacientes y el 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.

## 5.2. CULTIVOS CELULARES

En este trabajo se han empleado dos líneas celulares: una línea inmortalizada de células tumorales HeLa, para obtener las histonas purificadas que se emplearían posteriormente como tratamiento con histonas extracelulares líneas primarias de células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC), obtenidas a partir de cordones umbilicales cedidos por el HCUV, a través de una colaboración con el Grupo de Investigación en Células Endoteliales (LINCE) del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València. Las líneas de células HeLa proceden del repositorio de la Unidad de Cultivos Celulares de la Unidad Central de Investigación de Medicina de la misma universidad.

Las HUVEC se emplearon como modelo endotelial sobre el que se estudiaron los efectos de las histonas previamente purificadas y con la PTM de interés inducida.

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes implicados en este estudio.

### 5.2.1. 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 (SBF) (Invitrogen, San Diego, CA, EE.UU.) y el 1% de penicilina / estreptomina (Invitrogen, San Diego, CA, EE.UU.). Estas células se empleaban para la posterior extracción y purificación de histonas, descrito en el siguiente apartado (ver apartado 5.3) (Figura 10).

### 5.2.2. OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE VENAS UMBILICALES HUMANAS

A partir de un fragmento del cordón umbilical recogido durante el parto, se recogieron las células endoteliales empleando diferentes reactivos. En primer lugar, las venas endoteliales eran lavadas con PBS 1x, con el fin de retirar la sangre que pudiera quedar, se incubaron con colagenasa 1% (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), para obtener las células endoteliales, y éstas se cultivaron en medio de cultivo 199 con Earle's Balanced Salt Solution y L-Glutamina (Lonza, Verviers, Bélgica), suplementado con el 20% de suero bovino fetal (SBF) (Invitrogen, San Diego, CA, EE.UU.), el 1% de penicilina / anfotericina (Invitrogen, San Diego, CA, EE.UU.) y factores de crecimiento (Sigma-Aldrich, Tokio, Japón). Las HUVEC se mantenían en cultivo hasta ser utilizadas entre 3 y 6 pases.

Tanto las células HeLa como las HUVEC, fueron incubadas a 37°C en la incubadora Thermo Scientific, Heracell 150i CO<sub>2</sub> incubator (Thermo Scientific, Nueva York, NY, EE.UU.) en una atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando el cultivo fue confluyente, se hizo el pase celular y la expansión de células necesaria para cada uno de los experimentos posteriores.

## 5.3. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE HISTONAS EN CONDICIONES BASALES

Para la obtención de las histonas a partir de células HeLa (Figura 10) se utilizó una adaptación del protocolo desarrollado por Shechter, Hake y Allis (240), que consiste en dos días de protocolo:

*Primer día:*

- 1.- Lavar las células procedentes de un T175 (~18.4 x 10<sup>6</sup> células) con 1mL de PBS 1x a 4°C, resuspender con ayuda de una pipeta.
- 2.- Transferir el volumen a un tubo de 1,5mL.
- 3.- Centrifugar 5 minutos a 300xg.

- 4.- Descartar el sobrenadante.
- 5.- Resuspender los precipitados celulares en 1 mL de Tampón Hipotónico de Lisis (Tabla 1).
- 6.- Mantener en rotación durante 30 minutos a 4°C.
- 7.- Centrifugar a 700xg durante 10 minutos a 4°C.
- 8.- Descartar el sobrenadante.
- 9.- Resuspender el precipitado celular en 400µL de 0,4N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y poner la suspensión en rotación durante toda la noche a 4°C.

Nota: Las histonas son solubles en estas condiciones.

*Segundo día:*

- 1.- Centrifugar a máxima velocidad durante 10 minutos a 4°C.
- 2.- Transferir el sobrenadante a un tubo de 1,5mL nuevo.
- 3.- Añadir 132µL de Tricloroacético (TCA) 100% y mezclarlo con ayuda de una pipeta.
- 4.- Incubar en hielo durante 30 minutos.

Nota: es aconsejable invertir el tubo cada 10 minutos.

- 5.- Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad durante 10 minutos a 4°C.
- 6.- Descartar el sobrenadante.
- 7.- Lavar el precipitado celular con 0,5mL de acetona a 4°C.
- 8.- Centrifugar a máxima velocidad durante 10 minutos a 4°C.
- 9.- Descartar el sobrenadante.
- 10.- Repetir los pasos 7, 8 y 9.
- 11.- Dejar secar los precipitado celulares a temperatura ambiente.
- 12.- Resuspender el precipitado celular con 50µL de H<sub>2</sub>O.

**Tabla 1.** Receta empleada para el Tampón Hipotonico de Lisis

<b>Compuesto</b>	<b>[Final]</b>
Tris-HCl	10 mM pH= 8
KCl	1mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
Ortovanadato (Inhibidor de Fosfatasas)	10µL/mL
Inhibidor de Proteasas (Fisher Scientific, Hampton, EE.UU.)	2 µL/mL

#### 5.4. CUANTIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS PROTEÍCOS MEDIANTE EL MÉTODO DE BRADFORD

El método de Bradford es un ensayo colorimétrico que se basa en la unión del colorante hidrofóbico Coomassie Blue G-250 a las proteínas con aminoácidos aromáticos y básicos, especialmente a argininas. Cuando este colorante es diluido en agua y se encuentra en presencia de ácido fosfórico, tiene un color pardo (465nm) que vira a color azul (595nm) al encontrarse en un entorno hidrofóbico en el interior de una proteína. Cabe destacar que, a diferencia de los métodos de Lowry y BCA, este ensayo no interfiere con sustancias reductoras como el ditioneitol (DTT) o el  $\beta$ -mercaptoetanol, pero sí es relativamente sensible a la presencia de contaminantes como restos de detergente, líquidos orgánicos como el metanol, lípidos y soluciones básicas (241). Así mismo, el método de Bradford es un ensayo rápido, simple, económico y sensible, detectando entre 1 y 15 $\mu$ g (241).

Para llevar a cabo este ensayo, hay que preparar una dilución 1:5 (reactivo de Bradford: agua miliQ) en un volumen suficiente para todas las muestras, considerando que se utilizan 200 $\mu$ L por muestra, teniendo en cuenta la curva patrón y tres réplicas por muestra. Cabe destacar que el reactivo de Bradford hay que conservarlo a 4°C, y que el agua miliQ, o bidestilada, se obtiene a partir del sistema Purelab flex (Veolia Water Technologies, París, Francia).

Para elaborar la curva patrón se prepara una disolución stock de 10 mg/mL de BSA (Bovine Serum Albumina, Sigma-Aldrich), que se emplea para preparar las diferentes disoluciones que componen la recta patrón. Además, se prepara un blanco que no contiene BSA (Tabla 2).

**Tabla 2.** Cálculos para realizar la curva patrón de BSA.

Nº muestra	[ ] mg/mL	VBSA madre	V <sub>H<sub>2</sub>O</sub> mQ
1	0.125	12.5 $\mu$ L	987 $\mu$ L
2	0.25	25 $\mu$ L	975 $\mu$ L
3	0.5	50 $\mu$ L	950 $\mu$ L
4	0.75	75 $\mu$ L	925 $\mu$ L
5	1	100 $\mu$ L	900 $\mu$ L
6	1.5	150 $\mu$ L	850 $\mu$ L
7	2	200 $\mu$ L	800 $\mu$ L
8	4	400 $\mu$ L	600 $\mu$ L
9	6	600 $\mu$ L	400 $\mu$ L
10	10	1 mL	0



A continuación, se rellena la placa multipocillos de la siguiente manera, teniendo en cuenta los triplicados de cada pocillo:

- Para preparar el Blanco:
  - Añadir 195µL de Solución diluida de Bradford a cada pocillo.
  - Añadir 5µL de la solución stock de cada concentración, siguiendo la Tabla 2.
  - Resuspender con pipeta varias veces.
- Para preparar la Curva Patrón:
  - Añadir 195µL de Solución diluida de Bradford a cada pocillo.
  - Añadir 5µL de agua MiliQ.
  - Resuspender con pipeta varias veces.
- Para preparar las muestras:
  - Añadir 195µL de Solución diluida de Bradford a cada pocillo.
  - Añadir 5µL de muestra.
  - Resuspender con pipeta varias veces.

Una vez cargada la placa, debe incubarse a temperatura ambiente protegiéndola de la luz. El tiempo de incubación mínimo será de 5 minutos, pudiendo llegar a ser de 1 hora, pero nunca superar este tiempo. Finalmente, se procede a medir la absorbancia a 595nm mediante el espectrofotómetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, Canadá). Los resultados de absorbancia obtenidos en los extractos de proteínas son a continuación interpolados en la recta patrón para poder obtener los mg/mL de proteína en la muestra problema.

### **5.5. CITRULINACIÓN *IN VITRO* DE LAS HISTONAS MEDIANTE EL USO DE *PAD COCKTAIL ACTIVE*.**

La citrulinación *in vitro* de las histonas previamente purificadas (ver punto 4.3), se realizó mediante el uso de *PAD Cocktail Active* (SignalChem, Richmond, Canadá). Esta preparación comercial contiene diferentes isoformas de las enzimas responsables de catalizar la citrulinación *in vitro* de las histonas, las *Peptidilarginina Deiminasa* (PAD) (Figura 7, 10). El protocolo descrito a continuación explica cómo crear las condiciones ideales para facilitar la actividad de estas enzimas, favoreciendo la reacción de citrulinación *in vitro*.

1.- Lavar y equilibrar 40µL de *Beads* de agarosa anti-GST en 400 µL *PAD Cocktail dilution buffer* (Tabla 3). A continuación, eliminar la mayor cantidad posible del tampón ayudándose en este paso de una centrifugación a 1,000xg durante 5 minutos a 4° C.

2.- Resuspender el precipitado celular en *PAD Cocktail dilution buffer* - emplear el mismo volumen que se ha añadido en punto 1 de *beads*.

3.- Incubar 2 $\mu$ L de las *beads* de agarosa del punto 2, con 2 $\mu$ g (4 $\mu$ L) de *PAD Cocktail active* suspendidas en 8 $\mu$ L de Tampón de dilución del *PAD Cocktail* a 4°C durante 1 hora en agitación (usar una noria de la cámara fría).

$V_{\text{final}} = 2\mu\text{L beads (del paso 2)} + 4\mu\text{L PAD Cocktail active} + 8\mu\text{L de Tampón de dilución del PAD cocktail}$

4.- Preparar un *control negativo*, incubando 2  $\mu$ L de las *beads* de agarosa (del paso 2) equilibradas con 12  $\mu$ L de Tampón de dilución del *PAD Cocktail*.

5- Trascorrida 1 hora en agitación, lavar las *beads* de agarosa (vienen del punto 2 y del punto 3 “control negativo”) 3 veces en 40 $\mu$ L de tampón *PAD* (Tabla 3). Centrifugar 5 minutos a 2.500 rpm (1000xg) a 4°C.

6.- Descartar sobrenadante y resuspender en mismo volumen que en el punto 2 con tampón *PAD*.

7.- Añadir 0.5 $\mu$ g de Histonas, 0.5 $\mu$ g de *PAD Cocktail Active* y 50 $\mu$ L tampón *PAD* para la citrulinación *in vitro*. Para el control negativo añadir 0.5 $\mu$ g de Histonas, 0 $\mu$ g de *PAD Cocktail Active* y 50 $\mu$ L tampón *PAD*.

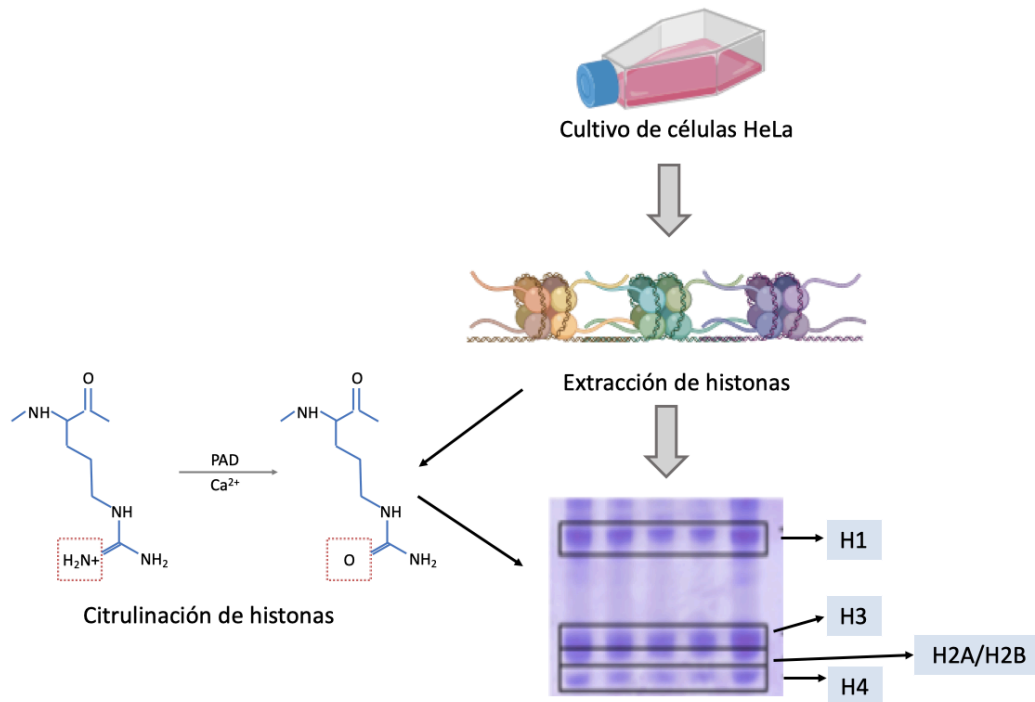
8.- Incubar durante 2 horas a 37 °C, agitando con ayuda de una pipeta cada 30 minutos.

9.- Centrifugar durante 5 minutos a 1000xg a 4°C las *beads* y recoger el sobrenadante conteniendo las proteínas citrulinadas.

10.- Guardar el sobrenadante a -80°C hasta su uso (validación de la reacción de citrulinación por WB).

Tabla 3. Tampones necesarios para la citrulinación *in vitro* de histonas

	Reactivo	[Final]
Tampón de dilución del PAD Cocktail ( <i>PAD Cocktail Dilution Buffer</i> )	Tris-HCL, pH 7,4	0.1 M
	DTT	0.25 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
Tampón PAD	Tris-HCL, pH 7,4	0.1M
	DTT	5mM
	CaCl <sub>2</sub>	10mM
	Aprotonina	10 $\mu$ g/ $\mu$ L
	Leupeptina	10 $\mu$ g/ $\mu$ L
	Pepstatina	10 $\mu$ g/ $\mu$ L



**Figura 10. Resumen del flujo de trabajo**, desde el cultivo de células HeLa, pasando por la extracción de histonas, hasta el proceso de citrulinación *in vitro* y la validación de la purificación de las histonas.

Abreviatura: PAD: Peptidilarginina deiminasa.

**Fuente:** Elaboración propia empleando recursos de Biorender

## 5.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOT

La técnica de Western Blot (WB) fue empleada para la detección de PTMs y proteínas específicas. Este ensayo permite la detección y cuantificación de proteínas concretas gracias a la reacción antígeno-anticuerpo, tras la separación de las proteínas según su peso molecular. Para ello, se realiza una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 10 % con docecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

### 5.6.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Los extractos proteicos previamente cuantificados mediante el método de Bradford (ver apartado 5.4) se prepararon con el tampón de carga descrito en la Tabla 4, dejando todas las muestras a la misma concentración ( $\sim 5\text{-}30\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). A continuación, las muestras se calentaron durante 5 minutos a  $95^\circ\text{C}$  y se procedió a cargar el gel SDS-PAGE para la separación electroforética de las proteínas. Posteriormente se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa (Nitrocellulose Transfer Membrane, Whatman GmbH, Dassel, Alemania). Estos pasos están más detallados a continuación.

Tabla 4. Receta del tampón de carga.

Reactivo	[Final]
Tris-HCl, pH= 7,4	40mM
EDTA	0,01%
azul de bromofenol	0,01%
sacarosa	40%
SDS	4%
$\beta$ -mercaptoetanol	25%

## 5.6.2. ELECTROFORESIS

Para la realización de la electroforesis, se procedió a cargar las muestras que contenían las proteínas de interés, en el gel de poliacrilamida al 15% (el porcentaje de acrilamida puede variar según el tamaño de la proteína de interés). El gel consta de dos partes: el Resolving gel (Tabla 5) y el Stacking gel (Tabla 5), y se cargó dentro de la cubeta (BioRad, Wertheim, Alemania) con Running tampón (Tabla 5) durante 1 hora a 120V.

Tabla 5. Geles y tampones necesarios para el WB. Abreviatura: TEMED: tetrametiletilendiamina

	Reactivo	Volumen
Resolving gel	Solución II (Tris-HCl 2M pH 8,8, SDS 20%)	2,08mL
	acrilamida 40%	3 mL
	agua MiliQ	2,75mL
	APS 10%	160 $\mu$ L
	TEMED	9,6 $\mu$ L
Stacking gel	Solución III (Tris-HCl 2M pH 6,8, SDS 20%)	750 $\mu$ L
	acrilamida 40%	3,5mL
	agua MiliQ	1,87mL
	APS 10%	100 $\mu$ L
	TEMED	6 $\mu$ L
Tampón Running	Tris-HCl 2M pH 8,3	25mM
	Glicina	190mM
	SDS	0,1%

## 5.6.3. ELECTROTRANSFERENCIA

Tras realizar la electroforesis en gel, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Nitrocellulose Transfer Membrane, Whatman GmbH, Dassel, Alemania), empleando un tampón de transferencia (Tabla 6) en la cubeta (BioRad, Wertheim, Alemania). La electrotransferencia se realizó empleando un voltaje de 100V durante 1 hora a 4°C.

Durante el proceso de electrotransferencia las proteínas del gel migran hacia el polo positivo y quedan atrapadas en la membrana de nitrocelulosa por interacciones hidrofóbicas.

Tabla 6. Tampón de transferencia.

Reactivo	[Final]
Tris-HCl 25mM, pH=8	25mM
Glicina, pH=8,3	192mM
Metanol	20%

## 5.6.4. TINCIÓN DEL GEL

Al terminar la electrotransferencia, se separan el gel y la membrana. El gel se tiñe con una solución de azul de Coomassie (Quick Coomassie Stain. NB-45-00078-1L. Neo Biotech, Pasadena, CA, USA), para comprobar que las proteínas no se encuentran en el gel, indicando que la transferencia de las proteínas a la membrana se ha realizado de manera adecuada.

## 5.6.5. BLOQUEO

Por otro lado, la membrana separada tras la electrotransferencia, se empleó para ver las proteínas de interés. Para ello, el primer paso es bloquear los lugares libres de unión a la membrana tras la electrotransferencia. Para realizar el bloqueo, la membrana fue sumergida en tampón de bloqueo (Tabla 7) durante 1 hora.

El bloqueo de los lugares libres de la membrana, facilita que el anticuerpo (Ab) primario se una con mayor especificidad a su antígeno concreto, reduciendo la inespecificidad de unión del anticuerpo y, por lo tanto, falsos positivos.

Tabla 7. Tampón de bloqueo. Abreviaturas: BSA, Suero Bovino Fetal

Reactivo	[Final]
BSA	0,05g/mL
Tris-HCl, pH=7,6	20mM
NaCl	137mm
Tween	0.1%

#### 5.6.6. DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Para detectar la presencia de una proteína determinada en la membrana, se emplea un anticuerpo primario específico y un anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario se encuentra unido a una enzima que cataliza una reacción colorimétrica, que puede ser fluorescente o quimioluminiscente, en presencia de un sustrato concreto. De esta manera, la unión del anticuerpo con el antígeno (la proteína) se hace visible. Para ello, hay que llevar a cabo dos pasos por separado:

##### 5.6.6.1. PRIMER PASO: USO DE ANTICUERPOS PRIMARIOS

Para la validación del grado de citrulinación inducido a las histonas extraídas de células HeLa mediante el tratamiento con PAD Cocktail, los anticuerpos empleados fueron Anti-Histone H3 (citrulline R2 + R8 + R17) y Anti-Citrulline (Tabla 8).

Los anticuerpos empleados para analizar la expresión de las proteínas antioxidantes, las implicadas en la regulación endotelial y las implicadas en la función inmune mediada por el endotelio, se encuentran listados en la Tabla 8. Para estas proteínas, la  $\beta$ -actina fue empleada como control de carga (Tabla 8).

La incubación de los anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche en la cámara fría, ayudándose de un balancín que proporcionara movimiento a las membranas.

##### 5.6.6.2. SEGUNDO PASO: USO DE ANTICUERPOS SECUNDARIOS

Tras la incubación del anticuerpo primario, la membrana se lavó tres veces durante 10 minutos empleando PBS-Tween con 0,01g/mL BSA, con el fin de eliminar el anticuerpo primario sobrante o que no se hubiera unido de manera específica a la membrana.

A continuación, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario correspondiente (listados en la Tabla 8) durante 1 hora en agitación suave, a temperatura ambiente. Cabe destacar que el

anticuerpo secundario se une de manera específica al anticuerpo primario y puede ser detectado gracias a la conjugación que presenta con peroxidasa de rábano. Además, varios anticuerpos secundarios pueden unirse al mismo anticuerpo primario, amplificando la señal de detección.

**Tabla 8.** Anticuerpos empleados en WB. En azul los anticuerpos primarios, en naranja los anticuerpos secundarios.

	<b>Anticuerpos</b>	<b>Referencia</b>
Anticuerpos primarios	H3 citrulline	Abcam, ab5103
	Citrulline	Abcam, ab240908
	GPX1	Abcam, ab22604
	Catalase	Sigma-Aldrich, c0979
	MnSOD	Abcam, ab13533
	Cu/ZnSOD	Abcam, ab13498
	PGIS	Santa Cruz Biotechnology, sc-20933
	TXAS	Santa Cruz Biotechnology, sc-79181
	eNOS	Santa Cruz Biotechnology, sc-653
	COX-1	Santa Cruz Biotechnology, sc-19998
	COX-2	Santa Cruz Biotechnology, sc-19999
Anticuerpos secundarios	$\beta$ -actin	Sigma-Aldrich, a1978
	anti-mouse	Sigma-Aldrich, NA931V
	anti-goat	Santa Cruz Biotechnology, sc2020
	anti-rabbit	Sigma-Aldrich, NA934V

### 5.6.7. DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

Tras la incubación con el anticuerpo secundario, se realizaron tres lavados durante 10 minutos empleando PBS-Tween con 0,01g/mL BSA, con el fin de eliminar el Ab secundario sobrante o que no se hubiera unido de manera específica a la membrana.

La membrana fue incubada con los reactivos del kit de revelado EC.LTM Western Blotting Detection Reagents (Amersham GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Suecia), empleando una ratio 1:1 de los reactivos que contiene dicho kit. Tras incubar 5 minutos en oscuridad la membrana, la detección de la señal quimioluminiscente se realizó empleando el sistema de captura de imagen (ImageQuant LAS-4000, General Electrics, Boston, Massachusetts).

## 5.7. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR TRAS LA EXPOSICIÓN A HISTONAS EXTRACELULARES NATIVAS Y CITRULINADAS

### 5.7.1. TEST DE MTT

El test de MTT se llama así por estar basado en la reducción de la 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, capaz de metabolizar la MTT y producir formazán, lo que conlleva un cambio de amarillo a azul. Puesto que para que la célula metabolice esta sal, debe estar viva, el cambio de color producido es directamente proporcional al número de células vivas capaces de metabolizar la sal.

La MTT (Thermo Scientific, Nueva York, NY, EE.UU.) se preparó a una concentración stock de 5mg/mL en PBS, se filtró para esterilizarla y se conservó en una botella opaca de vidrio a 4°C. Para realizar este ensayo, se diluye el stock en el medio de cultivo adecuado para las células que se estén empleando, en la proporción 1:11, es decir 1mL de MTT por cada 10mL de medio. Se incubó durante 3 horas a 37°C y se redissuelve el formazán en dimetilsulfóxido (DMSO) puro.

El protocolo de trabajo para las células HUVEC, empleadas en este trabajo, se describe a continuación:

- 1.- Sembrar una placa de 96 pocillos con HUVEC, con un recuento de 10000 a 20000 células por pocillo.
- 2.- Tratar las HUVEC con histonas extracelulares, tanto en su forma nativa (proveniente de un cultivo de células HeLa sin tratar) como citrulinadas *in vitro*. Las histonas se emplean a una concentración de 50 µg/mL. Incubar a 37°C durante 4h.



3.- Al finalizar el tratamiento:

3.1.- Vaciar el medio de los pocillos con ayuda de una pipeta multicanal.

3.2.- Realizar dos lavados con 50 $\mu$ L de PBS 1x precalentado a 37°C.

3.3.- Añadir en cada pocillo 100 $\mu$ L de la dilución 1:11 de MTT con medio de cultivo M199 (Lonza, Cultek, Barcelona, España).

3.4.- Incubar durante 3 horas a 37°C.

3.5.- Al finalizar la incubación, vaciar totalmente el contenido del pocillo (los restos de medio podrían interferir en el color final).

3.6.- Añadir 100 $\mu$ L de DMSO puro para resuspender el formazán precipitado

Nota: ayudar la resuspensión con ligeros golpes sobre la placa.

3.7.- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente y proceder a leer el color desarrollado.

3.8.- Medir la absorbancia a 590nm, mediante el espectrofotómetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, Canadá).

#### 5.7.2. CITOMETRÍA DE FLUJO

Para determinar de una manera cuantitativa el efecto citotóxico causado por las histonas extracelulares, nativas y citrulinadas, sobre las HUVEC, se empleó la técnica de citometría de flujo.

La citometría de flujo es un método analítico capaz de medir la emisión de múltiples fluorescencias y la dispersión de la luz de las células. Las células en suspensión son secuencialmente alineadas mediante una corriente líquida laminar, presentadas de manera individual y a gran velocidad ante un haz de luz láser que emite la luz a la longitud de onda adecuada. La citometría de flujo permite diferenciar las poblaciones celulares de una muestra según el tamaño relativo de las células y la complejidad de sus membranas, así como por su reactividad frente a diversos fluorocromos con especificidad frente a algún componente celular, permitiendo analizar múltiples parámetros simultáneos en las poblaciones celulares analizadas.

Este método de trabajo permite analizar de manera cuantitativa un elevado número de células en un periodo de tiempo muy corto, así pues, el número de lecturas en cada uno de los experimentos realizados fueron 10000 células por cada réplica técnica. Los datos son presentados de manera porcentual, proporcionando resultados semicuantitativos, así como un registro computarizado de los resultados.

Para analizar la viabilidad y mortalidad celular de las HUVEC expuestas a histonas nativas y citrulinadas, se empleó el kit de Annexin V-FITC (Roche, Basilea, Suiza). Las sondas que contiene permiten realizar una tinción simultánea con Anexina V y Ioduro de propidio (IP), siendo capaz de diferenciar entre células viables, células apoptóticas (en estados tempranos y tardíos) y células necróticas. El protocolo seguido para el desarrollo de esta técnica fue el propuesto por la casa comercial, descrito a continuación:

- 1.- Preparar el tampón de unión a Anexina V: 10 mM Hepes / NaOH (pH 7,4) NaCl 140 mM, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>.
- 2.- Usar un control negativo con células no incubadas y sin realizar ningún tipo de tinción. Este control negativo permite eliminar la autofluorescencia.
- 3.- Tras el tratamiento (con las histonas), recoger las células y realizar dos lavados de 5 minutos cada uno, con solución salina atemperada con tampón fosfato (PBS).
- 4.- Resuspender todas las células de cada pocillo en 1x tampón de unión a Anexina.
- 5.- Añadir 5µL de Anexina-V FITC y 5µL de PI, por cada 100µL de suspensión celular.
- 6.- Incubar las células a temperatura ambiente durante 15 min en oscuridad.
- 7.- Tras el período de incubación, añadir 400µL de 1x tampón de unión a Anexina.
- 8.- Analizar el número de células apoptóticas mediante citometría de flujo. En este trabajo se empleó un citómetro Backman EPICS XL-MCL.

La Anexina V, es una proteína con una alta afinidad por la Fosfatidilserina (PS), que es un fosfolípido de la membrana citoplasmática que, en condiciones fisiológicas, está localizada en la parte citosólica de la misma. Por ello, la Anexina V que se une a PS expuestos identifica células apoptóticas.

El Ioduro de Propidio (IP), permite diferenciar las células viables y no viables, puesto que las células viables con la membrana celular intacta son impermeables al IP, mientras que las membranas celulares dañadas sí son permeables a esta molécula fluorescente.

Por tanto, los resultados se interpretan de manera que las células positivas para Anexina V y negativas para IP están experimentando un proceso de apoptosis temprana, mientras que la apoptosis tardía (o inicio de necrosis) se da en aquellas células teñidas positivamente para Anexina V e IP (242). Así pues, las células positivas para IP y negativas para Anexina V, están sufriendo procesos de necrosis. Las células que no se tiñen con ninguna de las dos sondas, se reconocen como células viables (ver resumen Tabla 9).

**Tabla 9.** Resumen de los indicadores de citometría de flujo empleados para establecer las diferencias entre célula viva, apoptótica, temprana, apoptótica tardía y necrosis. *Abreviaturas: AV: Anexina V; IP: Ioduro de Propidio.*

Estado celular	AV	IP
Células viables	-	-
Apoptosis Temprana	+	-
Apoptosis Tardía o Apoptosis/Necrosis	+	+
Necrosis	-	+
Células viables	-	-
Apoptosis Temprana	+	-

### 5.7.3. MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

La viabilidad de las HUVEC ante la exposición a histonas extracelulares en condiciones nativas y citrulinadas fue determinada también de manera visual mediante la obtención de imágenes de microscopía óptica. Para ello, se empleó un microscopio invertido Leica BM1RB (Leica Microsystems, Manheim, Alemania).

Las HUVEC se prepararon en una cubierta de vidrio con cámara de 2cm<sup>2</sup> Lab-TeK II (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). El procedimiento seguido para la adquisición de las imágenes se describe a continuación:

- 1.- Tratar las HUVEC con histonas extracelulares en condiciones nativas y citrulinadas durante 4 horas.
- 2.- Transcurrido este tiempo, se procedió a la toma de imágenes sin realizar un lavado previo para evitar eliminar las células en procesos de apoptosis o necrosis. Se tomaron fotos de 5 campos y se realizaron 5 réplicas de cada uno.
- 3.- Una vez tomadas las fotos, se realizó el tratamiento de imágenes mediante el software ImageJ.

### 5.8. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA

Para analizar la expresión génica en un momento dado se debe realizar una extracción de RNA, que posteriormente será retrotranscrito a cDNA mediante una rt-PCR (*reverse transcription-PCR*) y cuantificado mediante una q-PCR (PCR cuantitativa o en tiempo real).

Para obtener el RNA de las HUVEC, se empleó el kit de extracción *miRNeasy Mini Kit (50)* (Qiagen). Antes de obtener el RNA, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y se crecieron hasta obtener una confluencia ~80%. En este momento, las células fueron tratadas con 50µg/mL de histonas extracelulares en condiciones nativas y citrulinadas, dejándolas incubar 4 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, el RNA celular se extrajo siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial, descrito a continuación:

- 1.1.- Añadir 700µL de Qiazol Lysis Reagent. Recoger el lisado en un tubo de microcentrifuga. Vortear deshacer posibles agregados celulares.
- 1.2.- Tripsinizar y recoger células. Añadir 700µL de Qiazol Lysis Reagent. Agitar o pipetear para mezclar.
- 2.- Incubar 5min a temperatura ambiente.
- 3.- Añadir 140µL de cloroformo. Agitar vigorosamente durante 15 segundos.
- 4.- Incubar a temperatura ambiente 2-3 min.
- 5.- Centrifugar durante 15min a 12000xg 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 700µL 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  $\geq 8000xg$  durante 15 segundos a temperatura ambiente. Eliminar el eluido.
- 8.- Repetir el paso 7 utilizando el resto de la muestra. Eliminar el eluido.
- 9.- Añadir 700µL de “Tampón RWT” a la columna. Centrifugar 15 segundos  $\geq 8000xg$  para lavar la columna. Eliminar el eluido.
- 10.- Añadir 500µL de “Tampón RPE” a la columna. Centrifugar a  $\geq 8000xg$  durante 15 segundos a temperatura ambiente. Eliminar el eluido.
- 11.- Añadir otros 500µL de “Tampón RPE” a la columna. Centrifugar a  $\geq 8000G$  durante 2 min a temperatura ambiente. Retirar la columna sin que contacte con el eluido.
- 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 30-50µL de agua libre de RNAsas directamente a la membrana de la columna. Centrifugar 1 min a  $\geq 8000xg$  para eluir el RNA.
- 14.- Si el rendimiento de RNA esperado es de más de 30µg, repetir el paso 13 con un segundo volumen de 30-50µL de agua libre de RNAsas. Eluir en el mismo “collection tube”.

Posteriormente, se cuantificó el RNA purificado empleando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, New York, NY, EE.UU.). Para ello, se empleó 1 $\mu$ L de agua libre de RNasas como blanco y, a continuación, se midió la absorbancia de 1 $\mu$ L de muestra a 260nm. Tras obtener las concentraciones, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### 5.9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Para analizar la expresión génica se empleó la técnica de RT-qPCR, consistente en dos pasos. La RT-PCR permite la retrotranscripción de la muestra de RNA a cDNA y la q-PCR permite la cuantificación de las copias de un gen.

La RT-PCR se preparó en una placa de 96 pocillos, añadiendo en cada pocillo 10 $\mu$ L de la muestra correspondiente (200ng de muestra, completando hasta un volumen final de 10 $\mu$ L con agua libre de RNasas) y 10 $\mu$ L de mix de PCR (Tabla 10). La placa de 96 pocillos debidamente preparada se introdujo en la QuantiStudio 5 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y se preparó para los siguientes ciclos: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C para que se sintetice el cDNA, y 5 minutos a 95°C para que se inactiven las enzimas.

**Tabla 10.** Receta del Mix de PCR High-Capacity cDNA Archive kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.

Reactivo	Volumen
10xRT tampón	2 $\mu$ L
25x dNTP Mix 100mM	2 $\mu$ L
10x Random primers	0,8 $\mu$ L
Multiscribe reverse transcriptase	1 $\mu$ L
agua libre de nucleasas	4,2 $\mu$ L

A continuación de la RT-PCR, se procede al análisis de cuantificación de copias del mismo mediante el ensayo de qPCR. Para ello, se emplearon ensayos prediseñados de tecnología Taqman: *Taqman Gene expression assays* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). Esta tecnología emplea sondas fluorescentes con un *quencher* unido a uno de sus extremos, y un fluoróforo unido en el otro extremo. El *quencher* evita que el fluoróforo emita la fluorescencia, liberándose gracias a la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa y permitiendo que la fluorescencia sea emitida cuando la sonda se une a la secuencia. A partir de esta señal emitida, la fluorescencia detectada permite hacer la cuantificación de las moléculas de DNA, bien de manera

absoluta por comparación con una curva estándar, o bien de manera relativa empleando genes de referencia que se expresan constitutivamente, determinando así las diferencias existentes entre estos genes y los de interés.

**Tabla 11.** Lista de sondas analizadas mediante q-PCR.

<b>Sondas</b>	<b>Referencia</b>
PGIS-2	Hs00919949_m1, Life Technologies
TBXAS	Hs01022706_m1, Life Technologies
NOS-3	Hs01574665_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-1 $\alpha$	Hs00174092_m1, Life Technologies
IL-1 $\beta$	Hs01555410_m1, Life Technologies
IL-6	Hs00174131_m1, Life Technologies
IL-18	Hs01038788_m1, Life Technologies
GAPDH	Hs02758991_g1, Life Technologies

La PCR cuantitativa se realizó añadiendo 1 $\mu$ L de la muestra de la RT-PCR, en cada pocillo correspondiente de la placa de 384 pocillos y a continuación se añadieron 3.5 $\mu$ L de agua libre de RNasas, 1 $\mu$ L TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) y 5 $\mu$ L TaqManH Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, P/N 4304437, Foster City, CA, EE.UU.) obteniendo un volumen final en cada pocillo de 10 $\mu$ L. La TaqMan® Gene Expression Assays varía con el gen a identificar, por lo que las sondas empleadas en este trabajo están descritas en la Tabla 11. Cabe destacar que cada muestra se analizó por triplicado para cada gen y la cuantificación fue realizada empleando el termociclador ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los ciclos empleados para esta PCR fueron: 10 min a 95°C para activar el enzima y 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 1 minuto a 60°C.

Una vez corrida la q-PCR se cuantificaron los valores obtenidos de manera relativa, utilizando el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Para analizarlo, se toman los valores de CT (cycle threshold) que nos da el programa, siendo el CT obtenido inversamente proporcional a la cantidad de DNA inicial,

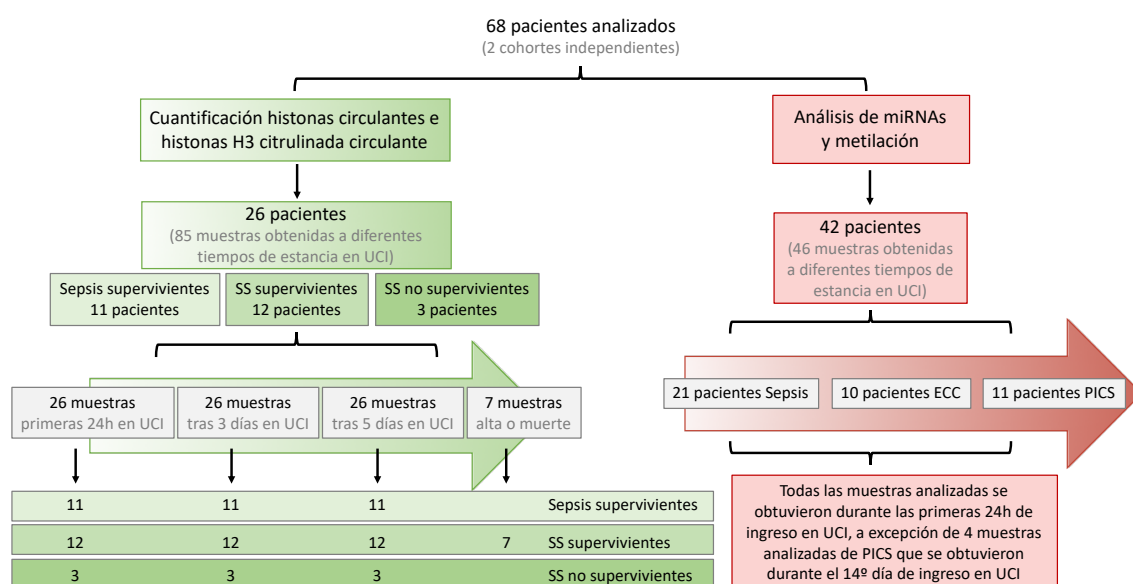
característico de cada reacción. El CT tomado corresponde al ciclo de PCR en el que la fluorescencia detectada se diferencia del ruido de fondo.

El método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  permite establecer una comparación entre el CT del gen problema con el del gen de referencia, siendo en este caso GAPDH. El cálculo realizado se presenta a continuación:

$$\Delta\Delta CT = (CT_{\text{gen interés}} - CT_{\text{GAPDH}}) - (CT_{\text{promedio gen interés}} - CT_{\text{promedio gen referencia}})$$

### 5.10. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES

Los diferentes estudios realizados durante esta tesis doctoral, emplearon dos cohortes independientes de pacientes. Por un lado, se tomaron muestras de pacientes con sepsis y shock séptico, con el fin de estudiar si las histonas circulantes y citrulinadas establecen diferencias moleculares de severidad, permitiendo diferenciar qué pacientes con sepsis tendrán una peor prognosis y evolucionarán a shock séptico. Por otro lado, se empleó una cohorte independiente de la primera, que incluía pacientes con sepsis, Enfermos Críticos Crónicos (ECC) y PICS (Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión). En estas muestras se analizaron los cambios de expresión de microRNAs (miRNAs) y el perfil de metilación del DNA de los PBMCs, con el fin de obtener patrones diferenciales de expresión de miRNAs o de metilación que permitan identificar las alteraciones del metabolismo (catabolismo) o del sistema inmunitario (inflamación persistente e inmunosupresión) que caracterizan a los pacientes con ECC y, especialmente, con PICS (Figura 11).



**Figura 11. Cohortes independientes analizadas.** Por un lado, en verde, se presentan los pacientes con sepsis y shock séptico, supervivientes y no supervivientes (Cohorte 1), sobre los que se analizaron las

histonas circulantes y citrulinadas. Por otro lado, en rojo, se presentan los pacientes con sepsis, Enfermos críticos crónicos (ECC) y con Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión (PICS) (Cohorte 2), sobre los que se analizaron el perfil de expresión de microRNAs y los cambios de metilación del DNA de leucocitos. Se analizaron un total de 68 pacientes, de los cuales 26 pertenecían a la primera cohorte, siendo 11 pacientes supervivientes de una sepsis, y 15 pacientes con shock séptico, de los cuales 12 sobrevivieron y 3 fallecieron. En esta cohorte se analizaron muestras obtenidas a diferentes tiempos: 26 muestras obtenidas durante las primeras 24h de ingreso en UCI, 11 pertenecientes a pacientes con sepsis y 15 pertenecientes a pacientes con shock séptico (12 supervivientes, 3 no supervivientes); 26 muestras, con la misma distribución, obtenidas durante el tercer día de ingreso y 26 muestras, de nuevo con la misma distribución, obtenidas durante el quinto día de ingreso. Además, se analizaron 7 muestras pertenecientes a pacientes supervivientes con shock séptico. 42 de las 68 muestras analizadas en este trabajo, pertenecieron a la segunda cohorte, la cual constaba de 21 pacientes con sepsis, 10 pacientes con ECC y 11 pacientes con PICS. Cabe destacar que, en esta segunda cohorte, se analizaron un total de 46 muestras, 42 de ellas obtenidas durante las primeras 24h de ingreso en UCI, y 4 de ellas, pertenecientes al grupo de pacientes con PICS, obtenidas durante el 14º día de ingreso en UCI.

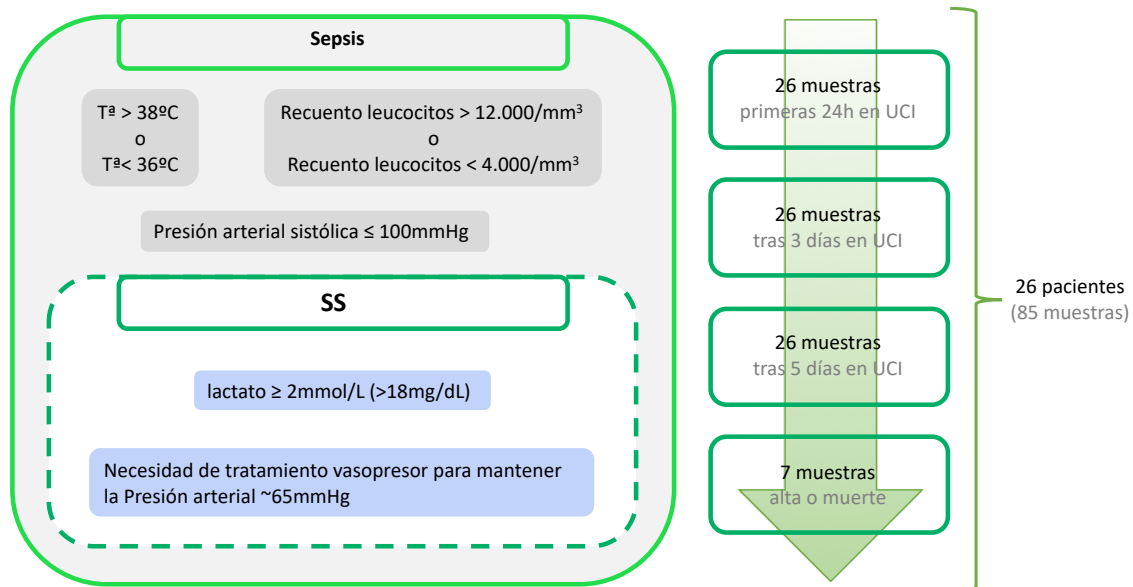
Los pacientes seleccionados para este estudio atendieron a los criterios de aleatoriedad entre hombres y mujeres, así como en la edad. Los pacientes con sepsis y shock séptico (Cohorte 1) fueron definidos con los criterios del consenso Sepsis-3 y cumplieron al menos dos de las siguientes características: presentar una temperatura superior a 38°C o inferior a 36°C, una presión arterial sistólica  $\leq 100$  mmHg y un recuento leucocitario superior a 12.000/mm<sup>3</sup> o inferior a 4.000/mm<sup>3</sup>, diferenciándose los SS por presentar además unos niveles de lactato  $\geq 2$  mmol/L ( $>18$  mg/dL) en ausencia de hipovolemia, y necesitar tratamiento vasopresor para mantener la presión arterial en 65 mmHg (1) (Figura 12, Tabla Suplementaria 1 – Anexos I).

Por otro lado, los pacientes clasificados como Enfermos Críticos Crónicos (ECC) y Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión (PICS) (Cohorte 2) fueron tomados de una cohorte independiente de los anteriores. Los pacientes con ECC fueron pacientes sépticos que estuvieron 7 días en la UCI con disfunción orgánica y necesitaron ventilación mecánica (79). Los pacientes clasificados como PICS fueron definidos en base a los criterios establecidos por Gentile *et al* (84): pacientes que además de cumplir los criterios de ECC, estuvieron 14 días o más ingresados en la UCI y cumplieron los siguientes parámetros: pérdida de peso (más de un 10% durante el tiempo de ingreso), pérdida de masa muscular por debajo de 18, albúmina por debajo de 3 mg/dL, prealbúmina por debajo de 10 mg/dL, proteína C reactiva (PCR) superior a 1,5 mg/L, y un recuento de linfocitos total inferior a 800/mm<sup>3</sup> (84) (Figura 4 y 13).

Las histonas circulantes y H3 citrulinadas se midieron sobre 85 muestras de pacientes (Cohorte 1, Figura 11 y 12), analizando un total de 26 pacientes. Estas muestras incluyeron diferentes tiempos, habiéndose analizado 26 muestras obtenidas durante las primeras 24h de ingreso en UCI, 26 muestras obtenidas tras 3 días de ingreso en UCI, 26 muestras obtenidas tras 5 días de ingreso en UCI y 7 muestras obtenidas en el momento del alta de la UCI o antes de morir (pre-alta o pre-

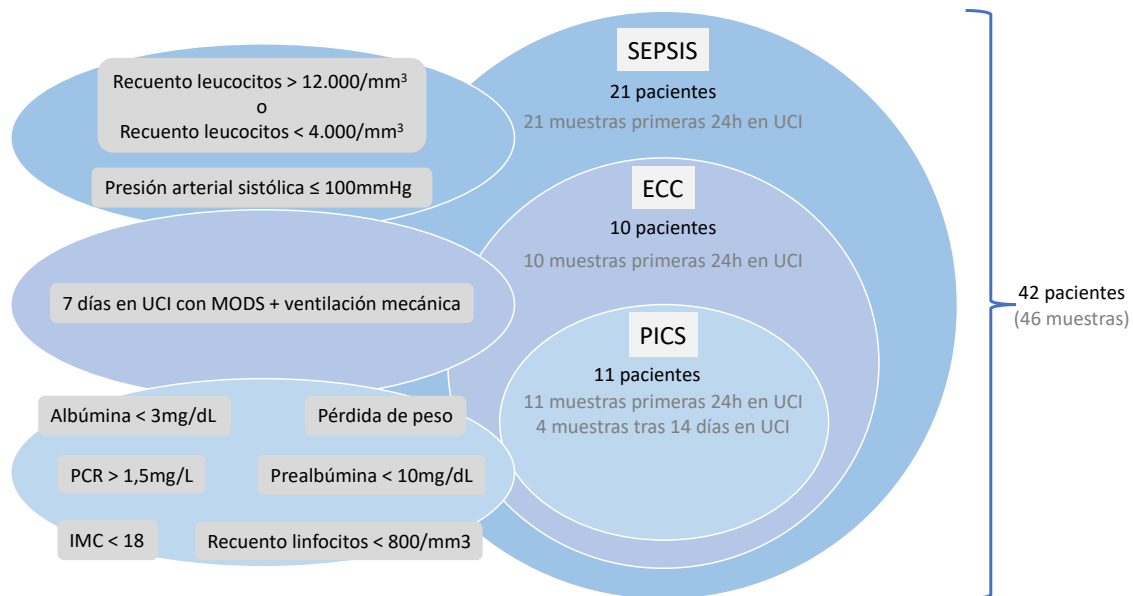


exitus). Cabe destacar que en algunos pacientes que evolucionaron más rápido, la 3ª muestra es la última, siendo esta la tomada en el momento del alta de la UCI o antes de morir, y coincidiendo con el 5º día de ingreso.



**Figura 12. Criterios de selección de los pacientes de la primera cohorte: pacientes con sepsis y shock séptico (SS).** Número de pacientes estudiados durante el análisis de histonas circulantes y H3 citrulinada.

Los estudios de microRNAs y metilación se realizaron en una cohorte independiente de pacientes (Cohorte 2, Figura 11 y 13) con el fin de conocer los patrones moleculares de los pacientes con sepsis, ECC y PICS, y así definir de manera más adecuada los pacientes de cada subconjunto, perfilando la caracterización realizada por Gentile *et al* (84). Además, este estudio nos permitiría saber qué patrones de miRNAs y metilación están alterados en cada grupo de pacientes, permitiéndonos conocer si es posible predecir a tiempos iniciales el desarrollo de fenotipos más severos y comorbilidades durante la sepsis, como ocurre en pacientes con ECC y PICS. Además, conocer los patrones moleculares de cada uno de estos grupos de pacientes, sería de gran utilidad para identificar alteraciones relacionadas con el sistema inmunitario o del metabolismo de los pacientes, características fundamentales de los pacientes con ECC y PICS. Para ello, se analizaron un total de 42 pacientes, incluyendo 46 muestras obtenidas a diferentes tiempos. De las muestras analizadas, 42 fueron tomadas durante las primeras 24h de ingreso en UCI y 4 se tomaron a día 14 de ingreso en UCI (Figura 12).



**Figura 13. Criterios de selección de la cohorte 2: pacientes con sepsis, ECC (Enfermos Críticos Crónicos) y PICS (Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión). Número de pacientes estudiados durante el análisis de microRNAs y metilación.**

### 5.11. ANÁLISIS DE LAS HISTONAS CIRCULANTES EN MUESTRAS DE PLASMA DE PACIENTES CON SEPSIS Y SHOCK SÉPTICO

#### 5.11.1. ANÁLISIS DE LAS HISTONAS CIRCULANTES MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Los niveles de histonas circulantes se midieron en muestras de pacientes con sepsis y shock séptico en muestras obtenidas a diferentes tiempos de estancia en UCI (Figura 11 y 12). Analizando a evolución de los niveles de histonas circulantes en pacientes con sepsis supervivientes (n=11), pacientes con shock séptico supervivientes (n= 12) y no supervivientes (n=3).

En primer lugar, se prepararon las muestras para ser procesadas. Para ello, se centrifugaron las muestras de plasma durante 15 min a 15.000 g para la eliminar los lípidos. A continuación, se realizó una dilución 1:5 de plasma en H<sub>2</sub>O, diluyendo 2μL de cada muestra de plasma en 8μL de H<sub>2</sub>O. Se tomaron 2μL de cada plasma diluido (25μg) y se mezclaron con 18μL de BA (bicarbonato de amonio) 50mM junto con 25fmol de péptidos HeavyMix, obteniendo un volumen final de 20μL. Los residuos de cisteína se redujeron empleando DL-Ditiotreitol (DTT) 2mM en 50mM de BA durante 3 minutos a 300W en el microondas. Finalmente, los grupos sulfhidrilo se alquilaron con yodoacetamida (IAM) 5mM, utilizando 50mM de BA en la oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo empleando una concentración final del 1% de ácido trifluoroacético (TFA).

El análisis de espectrometría de masas se realizó en la Unidad de Proteómica del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental, SCSIE, de la Universitat de València. Para realizar este análisis se empleó un espectrómetro 5500QTRAP híbrido triple cuadrupolo/lineal de masas con trampa de iones (ABSCIEX), equipado con un sistema cromatográfico Micro M3 MicroLC. Para ello, se inyectaron 10µL de digestión triptica (aproximadamente 9 g de proteína y 25 fmol de cada péptido marcado isotópicamente (Spike-In peptide)) en una columna Trap (10X0.3mm Trap Cartridge Chromxp C18CL 5um, ABSCIEX). Luego, se cargó y se separó en una columna analítica (ChromXP C18, 120A, 3µm, 150x0,3mm). Finalmente, 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 5µL/min.

El 5500 QTRAP funcionó en modo Reacción de monitorización múltiple (MRM, *Multiple Reaction Monitoring*). Los datos de MRM se adquirieron con un voltaje de pulverización de 5500V, gas de cortina: 25 psi, gas de fuente de iones: 25psi, potencial de entrada (EP): 10 y potencial de salida (EXP): 16. El potencial de reducción de potencia (DP) y la energía de colisión (CE) y se optimizaron para cada transición. Además, se realizó una cuantificación relativa de cada histona empleando las relaciones de área (ligera/pesada) para todas las transiciones, calculándolas mediante el software Skyline 4.2.1.19058 (laboratorio MacCoss). Las concentraciones de las proteínas de interés se estimaron como fmol/µL de suero inicial y convertida a ng/mL de proteína.

La Tabla 12, muestra los péptidos empleados para para la cuantificación de cada una de las histonas circulantes.

**Tabla 12.** Secuencia primaria de los péptidos pesados (*Spike-In*) marcados isotópicamente para la cuantificación de las histonas circulantes en muestras de plasma sanguíneo de pacientes con sepsis y shock séptico mediante el estudio de MRM-MS.

Proteína	Péptido
Histona H2B	LLLPGELAK
Histona H3	STELLIR
Histona H4	DNIQGITKPAIR y VFLENVIR

#### 5.11.2. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE H3 CITRULINADA

Los niveles de H3 citrulinadas se midieron en plasmas obtenidos de pacientes con sepsis y shock séptico en muestras obtenidas a diferentes tiempos de estancia en UCI (Figura 11 y 12). Analizando a evolución de los niveles de H3 citrulinadas en pacientes con sepsis supervivientes

(n=11), pacientes con shock séptico supervivientes (n= 12) y no supervivientes (n=3). Se analizaron un total de 85 muestras: 33 de pacientes con sepsis supervivientes, 43 de pacientes con shock séptico supervivientes y 9 de pacientes con shock séptico no supervivientes.

Los niveles de H3 citrulinadas en muestras de plasma de pacientes con sepsis y shock séptico fueron analizados mediante el kit *EpiQuik Histone H3 Citrullination ELISA Kit* (EpiGentek, Farmingdale, NY, USA) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Brevemente, el protocolo consistió en:

- 1.- Preparar los tampones de lavado y de trabajo, proporcionados por el kit comercial.
- 2.- Preparar la curva patrón mediante controles estándar proporcionados por el kit comercial.
- 3.- Descongelar las muestras de plasma.
- 4.- Poner 30µL de plasma + 50µL de *histone assay buffer* (proporcionado por el kit). En el caso del blanco añadir solo 50µL de *histone assay buffer*, en el caso de la curva patrón añadir 50µL de *histone assay buffer* + 1µL de disolución patrón.
- 5.- Incubar 1h a 37°C.
- 6.- Eliminar el contenido de los pocillos y lavar 4 veces con 150µL de *wash buffer* (proporcionado por el kit).
- 7.- Añadir 50µL de anticuerpo de detección (proporcionado por el kit).
- 8.- Incubar 1h a temperatura ambiente, evitando la luz.
- 9.- Eliminar el contenido de los pocillos y lavar 4 veces con 150µL de *wash buffer* (proporcionado por el kit).
- 10.- Añadir 100µL de solución reveladora (proporcionada por el kit) e incubar a temperatura ambiente hasta 10 minutos evitando la luz. Una vez se observe la aparición del color azul en los pocillos, por la presencia del producto citrulinado, añadir 100µL de solución *stop* (proporcionada por el kit).
- 11.- Tras observar un cambio de color, de azul a amarillo, debe leerse la absorbancia de la placa hasta 10 minutos después. La observancia debe medirse a 450nm.

## 5.12. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MIRNAS EN PLASMA DE PACIENTES CON SEPSIS, ECC Y PICS

### 5.12.1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MIRNAS EN PLASMA DE PACIENTES CON SEPSIS, ECC Y PICS

Para obtener el RNA a partir de plasma de pacientes, se empleó el kit de extracción *miRNeasy Serum/Plasma kit* (Qiagen) y se siguió el protocolo propuesto por la casa comercial, descrito a continuación:

- 1.- Preparar el suero o plasma, o descongelación de las muestras.
- 2.- Añadir 5 volúmenes de *Qiazol Lysis Reagent* a la muestra (por ejemplo, para 200µL de muestra, añadir 1mL de *Qiazol*). Mezclar con agitador.
- 3.- Incubar el homogenado a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 4.- Añadir cloroformo en igual cantidad que la muestra inicial y tapar el tubo (por ejemplo, para 200µL de muestra, añadir 200µL de cloroformo). Mezclar vigorosamente durante 15 segundos.
- 5.- Incubar a temperatura ambiente 2-3 minutos.
- 6.- Centrifugar durante 15min a 12000xg a 4°C.
- 7.- Transferir la fase superior a un *collection tube* evitando transferir la interfase. Añadir 1,5 volúmenes de etanol 100% (por ejemplo, para 600µL de fase acuosa, añadir 900µL de etanol). Mezclar vigorosamente con la pipeta.
- 8.- Transferir 700µL de muestra, incluyendo cualquier precipitado que se haya podido formar, en una *RNeasy Mini spin column* dentro de un “collection tube” de 2mL. Centrifugar a  $\geq 8000xg$  durante 15 segundos a temperatura ambiente. Eliminar el eluido.
- 9.- Repetir el paso 8 utilizando el resto de la muestra. Eliminar el eluido.
- 10.- Añadir 700µL de *Tampón RWT* a la columna. Centrifugar 15 segundos  $\geq 8000xg$  para lavar la columna. Eliminar el eluido.
- 11.- Añadir 500µL de *Tampón RPE* a la columna. Centrifugar a  $\geq 8000xg$  durante 15 segundos a temperatura ambiente. Eliminar el eluido.
- 12.- Añadir 500µL de etanol 80% a la columna. Centrifugar a  $\geq 8000xg$  durante 2 min a temperatura ambiente. Retirar el eluido y el “collection tube”.
- 13.- Colocar la columna en un nuevo “collection tube” de 2mL. Abrir la tapa de la columna y centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos para secar la membrana. Descartar el eluido del “collection tube”.

14.- Colocar la columna en un nuevo “collection tube” de 1.5mL. Añadir 14uL de agua libre de RNAsas directamente en el centro de la membrana de la columna. Cerrar la tapa y centrifugar durante 1 minuto a máxima velocidad para eluir el RNA.

A continuación, se cuantificó el RNA purificado empleando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Nueva York, NY, EE.UU.). Para ello, se empleó 1µL de agua libre de RNAsas como blanco y, a continuación, se midió la absorbancia de 1µL de muestra a 260nm. Tras obtener las concentraciones, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

#### 5.12.2. SECUENCIACIÓN DE LOS MIRNAS Y PROCESADO DE DATOS

El RNA extraído se secuenció, utilizando el secuenciador HiSeqX de Illumina tras enviar las muestras a la compañía Macrogen (Amsterdam, Países Bajos). Las secuencias obtenidas se analizaron mediante extremos apareados de 150 pb de longitud. Para el preprocesado, control de calidad y normalización de los datos, se utilizaron los siguientes programas implementados en pipelines de trabajo propias: FastQC1, bbdduk2, subread3, multiqc4, edgeR5, limma6 y limma-voom7. Los miRNAs presentes en las muestras de los diferentes grupos se anotaron con miRTarBase (v22) usando la versión GRCh38 del genoma humano. La normalización del número de lecturas por muestra de cada miRNA se realizó calculando TMM9 (Trimmed mean M-values).

#### 5.12.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MIRNAS ENTRE GRUPOS EXPERIMENTALES Y ENRIQUECIMIENTO KEGG/GO

Para el análisis de expresión diferencial de miRNAs entre los diferentes grupos se aplicaron 3 paquetes que realizan diferentes tests (edgeR, voom y lima-voom). Con los miRNAs significativos obtenidos, tanto sobreexpresados como infraexpresados, a partir del análisis edgeR, que es el más recomendado para este tipo de análisis, se realizó un análisis de enriquecimiento por dos metodologías distintas: ORA (*Over-Representation Analysis*) y GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*), ambos métodos implementados en el paquete clusterProfiler de R10 (243). El análisis ORA consiste en encontrar rutas moleculares en las que un conjunto de genes que participan en estas rutas moleculares se ven alterados por el efecto de los miRNAs que se han incluido en el análisis. La estrategia GSEA se basa en el análisis de conjuntos de genes para resumir datos de expresión de genes de alta dimensión en términos de conjuntos biológicamente relevantes. En particular esto se hace mediante la clasificación todos los genes en el conjunto de datos en función de la expresión diferencial. Para probar la importancia del conjunto de genes, se define una puntuación de enriquecimiento como la distancia máxima desde la mitad de la lista clasificada (244). El análisis por ORA se realizó a partir de la lista de miRNAs significativos (FDR < 0.1), siendo un análisis más laxo ya que no tiene en cuenta los parámetros estadísticos del análisis de expresión diferencial. Por el contrario, en la estrategia de análisis utilizando la

herramienta de GSEA se utilizó una lista ordenada por los valores del logaritmo de Fold Change (logFC) de los miRNAs obtenidos en el análisis de expresión diferencial.

Con esta estrategia de análisis de sobrerrepresentación ORA y de GSEA y a partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron los miRNAs en base a las rutas fisiopatológicas (KEGG o Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y rutas GO (Gene Ontology) y se buscó la intersección de los miRNAs entre ambos métodos y su papel en la regulación molecular de rutas clave que pueden estar implicadas en la fisiopatología de la sepsis.

### **5.13. ANÁLISIS GLOBAL DE LA METILACIÓN DEL DNA MEDIANTE EL ARRAY EPIC 850K**

#### **5.13.1. EXTRACCIÓN DE DNA DE PBMCS HUMANAS**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron a partir de la sangre de los pacientes reclutados en este estudio, incluyendo los pacientes con sepsis, con ECC y con PICS. La sangre se recolectó en tubos EDTA (anticoagulantes), realizando el método conocido como Ficoll-Paque. La obtención del DNA se realizó utilizando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Inc., Hilden, Alemania). Se utilizó 1µg de DNA genómico obtenido mediante este método para su conversión de bisulfito, realizada usando el kit comercial de metilación del DNA EZ-96 (Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

#### **5.13.2. PREPARACIÓN Y LECTURA DE LOS ARRAYS DE METILACIÓN 850K MEDIANTE EL SISTEMA HISCAN SQ (ILLUMINA)**

Para realizar el análisis de los niveles de metilación globales de DNA a partir de los PBMCs obtenidos previamente según se ha explicado en el paso anterior, se utilizaron las matrices Infinium Human DNA Methylation EPIC 850K BeadChip (Illumina Inc, San Diego, CA, EE.UU.), capaces de analizar > 850.000 sitios CpG, cubriendo así el 99% de los sitios CpG de todos los genes descritos hasta el momento que poseen regulación del DNA por metilación, además del 95% de las islas CpG descritas hasta la fecha, incluyendo proyectos como ENCODE y FANTOM5.

Siguiendo el protocolo del ensayo de metilación de Illumina Infinium HD, se utilizaron 4µL de DNA (500ng-1.000ng) convertido con bisulfito (kit de metilación de DNA EZ-96 (Zymo Research, Irvine, CA)). En primer lugar, se realizó la amplificación del genoma completo, con la posterior fragmentación enzimática, precipitación y resuspensión. A continuación, se hibridaron

con BeadChips 850K EPIC de metilación de DNA humano las muestras procesadas a 48°C durante 16 horas. El DNA que específicamente no se había hibridado en el array se eliminó mediante un lavado. Seguidamente, utilizando el DNA tratado con bisulfito hibridado como molde y los nucleótidos incorporados marcados con biotina (ddCTP y ddGTP) y 2,4-dinitrofenol (ddATP y ddTTP), se realizó una extensión de un solo nucleótido. Posteriormente al proceso de extensión de una sola base, se realizaron rondas consecutivas de tinción, utilizando una combinación de anticuerpos que diferenciaban el DNP y la biotina a través de fijarlos con diferentes fluoróforos. Para terminar, el BeadChip se lavó para posteriormente ser escaneado en un escáner Illumina HiScan SQ (Illumina Inc, San Diego, CA, EE.UU.) en la Unidad de Epigenómica del Instituto de Investigación Sanitaria la Fe de Valencia.

### 5.13.3. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DIFERENCIAL

Para realizar el análisis de los niveles de metilación globales se utilizaron procedimientos bioinformáticos mediante el uso del paquete estadístico de código R extraído de *MethylationArrayAnalysis: A cross-package Bioconductor workflow for analysing methylation array data* (245).

Brevemente, los archivos se leyeron utilizando el paquete `minfi` en R (246). Los archivos se obtuvieron en formato `.idat` sin procesar, a partir de la matriz EPIC de Illumina para evaluar su calidad y realizar la normalización de cuantiles, así como para la exclusión de sondas que pudiesen interferir en el análisis posterior (247). Las sondas de metilación de DNA se filtraron con el objetivo de eliminar las sondas menos relevantes ( $p$ -valor de detección  $<0,01$ ), así como las sondas que coincidían en las posiciones descritas de los SNPs, las sondas relacionadas con los cromosomas sexuales (cromosomas X e Y) y las descritas como sondas reactivas múltiples (248).

Para evaluar las regiones con metilación diferencial (DMRs) se utilizó el paquete `mCSEA` (249), que consiste en un paquete de R basado en el método GSEA para identificar DMRs obtenidos a partir de análisis realizados con Illumina Infinium 450K y datos de matriz EPIC 850K, ya que es especialmente útil para detectar diferencias sutiles de metilación en fenotipos clínicos complejos entre grupos (paciente con sepsis, con ECC y con PICS).

Así mismo, se utilizó el paquete `DMRcate` para obtener los sitios CpG metilados diferencialmente entre los pacientes de UCI, de sepsis y de shock séptico, considerando un umbral de FDR de 0,05.

Finalmente, para realizar el análisis funcional se utilizó el paquete `clusterProfiler` (250) realizando un análisis de sobrerrepresentación (ORA), aplicado a los conjuntos DMR obtenidos por ambos enfoques (`mCSEA` y `DMRcate`). Los DMR obtenidos se enriquecieron en términos GO, así como en rutas KEGG, lo que resaltó los procesos biológicos y rutas metabólicas sobrerrepresentadas.



El procedimiento seguido fue similar al previamente publicado por nuestro grupo de investigación en Lorente-Pozo S. *et al.* (220).

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., Valencia, España

#### 5.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El software Graph Pad Prism v9 (Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.) fue utilizado para el cálculo de la estadística y para la elaboración de los gráficos. Los valores se expresaron como media  $\pm$  SEM. La diferencia entre grupos calculada en los experimentos *in vitro* se realizó empleando un análisis de varianza unidireccional. Cuando se encontró una interacción, se realizaron comparaciones múltiples empleando el método Scheffé como prueba post-hoc. Para considerar significancia estadística, se observó el p-valor (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  y \*\*\*  $p \leq 0.001$ ), como se indica en cada caso.

La normalidad de las muestras clínicas obtenidas de los pacientes de la UCI del HCUV, se calculó mediante la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y se determinó que las muestras no siguen una distribución gaussiana. Para analizar las diferencias entre los grupos no apareados, se empleó la prueba de Mann-Whitney, con un nivel de significancia 0.05. La prueba de Kruskal-Wallis fue utilizada para analizar las diferencias entre las muestras de los pacientes, seguida de una prueba post hoc con la corrección de Bonferroni para  $\alpha$  (0,05/3). La prueba rho de Spearman fue la que se utilizó para el análisis de correlación entre variables.



# 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

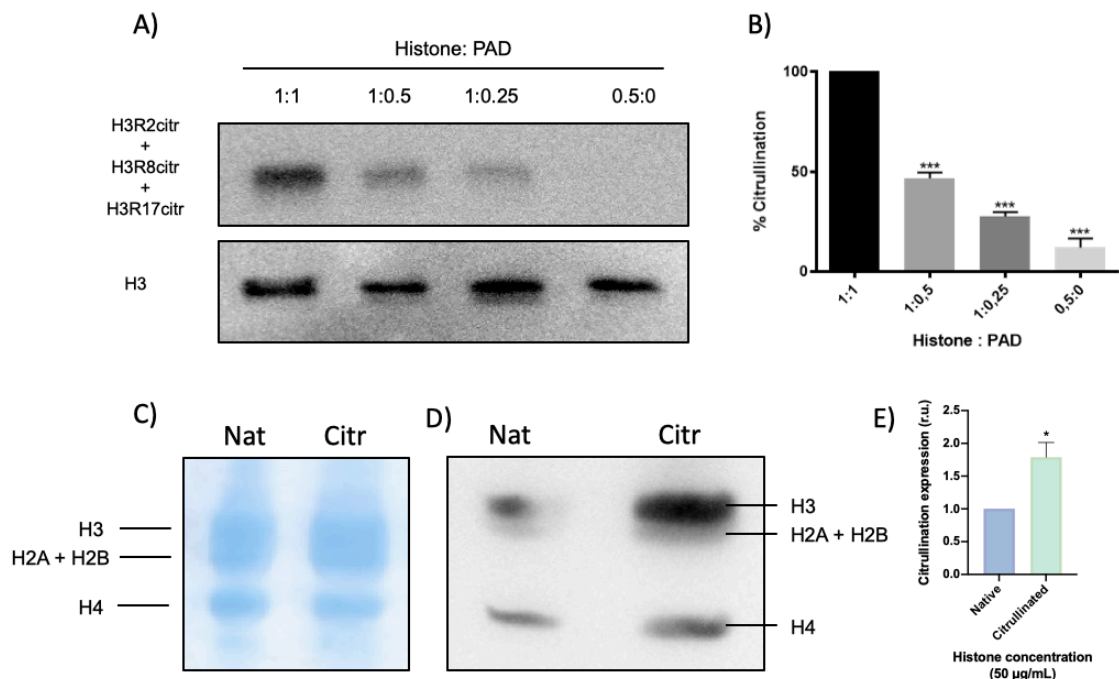


### 6.1. INDUCCIÓN DE LA CITRULINACIÓN *IN VITRO* EN HISTONAS EXTRACELULARES HUMANAS

La citrulinación de las histonas extracelulares obtenidas a partir de las células HeLa (descrito en la sección 5.3) se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.5. Para ello, se empleó el *PAD Cocktail* (SignalChem, Richmond, Canadá), el cual contiene diferentes isoformas de la enzima Peptidilarginina Deiminasa (PAD), encargada de la citrulinación de las proteínas.

Para analizar el ratio más eficiente de histonas:PAD, se emplearon diferentes cantidades de histonas y de PAD (1:1), y se determinaron los niveles de histonas citrulinadas analizando los niveles relativos por Western blot de H3R2citr, H3R8citr, H3R17citr, por ser los residuos de Arginina R2, R8 y R17, los principales residuos diana de la citrulinación (163), comparándolos con los niveles de expresión de H3 mediante Western Blot (Figura 14A). La mayor cantidad de histonas citrulinadas se encontró, de manera significativa, en la condición que empleaba la misma proporción de histonas y de PAD (Figura 14B). Por ello, se decidió que para inducir la citrulinación de las histonas en los siguientes experimentos se emplearía el ratio 1:1 (Histonas:PAD). Lo que pudimos observar fue que la cantidad de PAD disponible es directamente proporcional a la citrulinación inducida en condiciones *in vitro*.

Para cerciorarnos de que las histonas que íbamos a emplear para el tratamiento de las células endoteliales realmente estaban significativamente citrulinadas en comparación a las histonas en condiciones nativas, sin ninguna PTM inducida, se compararon los niveles de citrulinación global de todas las histonas mediante el uso de un anticuerpo anti-citrulina. Como se observa en la Figura 14C-E, la inducción de la citrulinación aumentó los niveles de citrulinación en comparación con las histonas que no fueron expuestas al PAD Cocktail y, demostró que, aunque la histona H3 es la que más se citrulinó, este cocktail de enzimas también citrulinó otras histonas, como la H2A, la H2B y la H4. Esto concuerda con literatura previamente publicada, ya que se ha descrito que la mayoría de histonas son capaces de citrulinarse por la acción de PAD (165,251,252).



**Figura 14. Citrulinación *in vitro*.** A) WB mostrando la citrulinación obtenida empleando diferentes ratios de Histona:PAD. B) Cuantificación de la citrulinación obtenida en A. C) Control de carga de la citrulinación de histonas. D) WB obtenido del análisis de la citrulinación de histonas. E) Cuantificación de la citrulinación de histonas. Los datos estadísticos son expresados como media±SEM para 3-5 ensayos independientes. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001. Abreviaturas: WB: Western Blot; PAD: Peptidilarginina Deiminasa; Nat: Histonas nativas; Citr: Histonas citrulinadas.

## 6.2. LAS HISTONAS EXTRACELULARES CITRULINADAS NO AFECTAN A LA VIABILIDAD CELULAR EN HUVEC

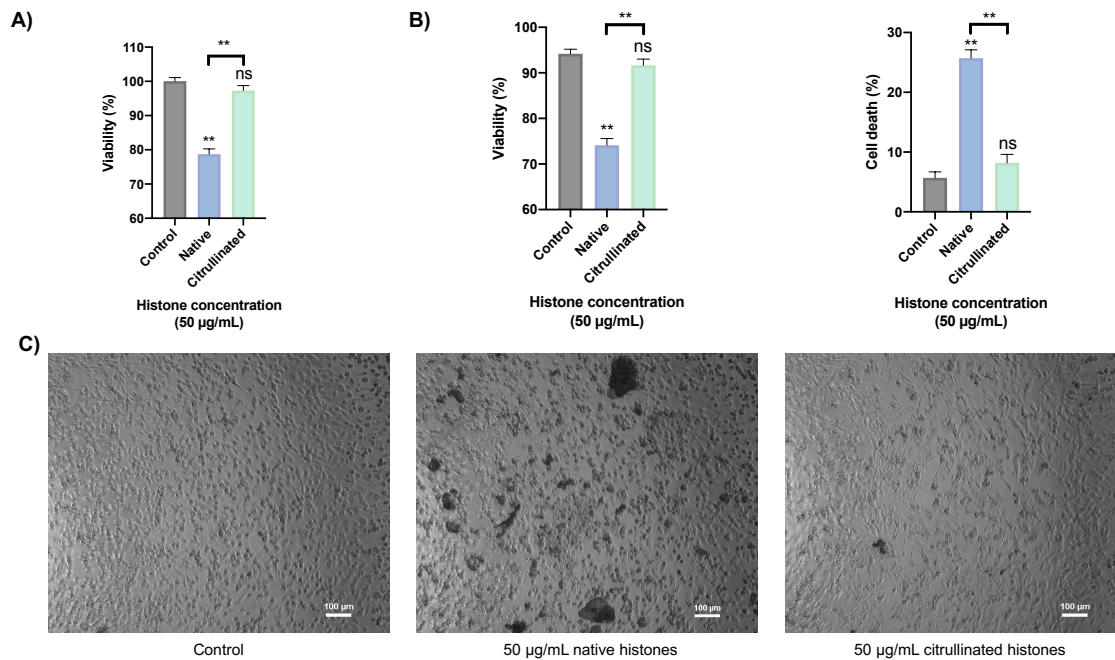
Algunos trabajos han asociado las histonas extracelulares a la activación de mecanismos relacionados con la muerte celular (123,126,253). Sin embargo, no se ha descrito que la histona H3 citrulinada (H3cit) sea capaz de causar daño celular (147). Además, cabe destacar que la citrulinación de las histonas consiste en la sustitución de un grupo amino por un grupo oxígeno, mediante un proceso de desaminación (Figura 7), lo cual no tiene un efecto importante en el peso molecular pero sí en la carga de la molécula, transformando la carga positiva inicial de un grupo  $\text{NH}_4^+$  en una carga neutra. Este efecto sobre las cargas es significativo y puede afectar a la estructura terciaria de la proteína, así como a las interacciones proteína-proteína y proteína-ácido nucleico (254). Como se ha comentado en la introducción, en los pacientes sépticos se liberan gran cantidad de histonas al torrente sanguíneo (166), entre las que postulamos que gran cantidad de ellas se liberan con residuos de Arginina citrulinados por la activación de los mecanismos inmunitarios relacionados con los eventos de ETOsis, para el cual es fundamental la citrulinación de la H3. Por este motivo, se analizaron los mecanismos moleculares activados por las histonas citrulinadas en un modelo *in vitro* de células endoteliales (HUVEC), puesto que el endotelio es el

primer tejido que entra en contacto con las histonas cuando estas son liberadas al torrente sanguíneo.

La viabilidad de las células HUVEC fue analizada mediante el ensayo de MTT, citometría de flujo y microscopía óptica (descritos en el apartado 5.7) tras ser expuestas a histonas extracelulares nativas y citrulinadas durante 4 horas.

Los resultados de MTT (Figura 15A) mostraron una viabilidad celular semejante entre el control y aquellas células expuestas a histonas citrulinadas. Estos resultados sugieren que las histonas extracelulares citrulinadas no inducen daño celular, mientras que las células expuestas a histonas nativas mostraron una viabilidad significativamente reducida. Estos resultados fueron corroborados por citometría de flujo, midiendo el porcentaje de células positivas para Anexina V y para IP, sondas que marcan muerte celular (Figura 15B). Las células con menor viabilidad y mayor mortalidad fueron las expuestas a histonas nativas, mientras que las células expuestas a histonas citrulinadas no mostraron diferencias de viabilidad ni mortalidad respecto al control. Así mismo, al analizar la viabilidad celular por microscopía óptica de campo claro, se observaron agregados capaces de causar precipitados que no se observaron en células expuestas a histonas citrulinadas (Figura 15C). Estas agregaciones pueden ser explicadas por las cargas positivas que presentan las histonas extracelulares, capaces de interactuar con un entorno más negativo como es el exterior celular debido al glicocalix (254–256). Por el contrario, y en línea con lo que acabamos de describir, dado que las histonas citrulinadas presentan una carga neutra inducida por la modificación de la citrulinación (Figura 7), no se observan estas interacciones causantes de los agregados celulares.

Los resultados obtenidos cuando se expusieron las HUVEC a histonas citrulinadas, y la carencia de daño celular asociado a esta exposición, apoya nuestra hipótesis inicial de que las histonas citrulinadas deberían de inducir un menor daño celular que las histonas en condiciones nativas (166). Esto se debe a su función en la respuesta inmune innata, ya que actúan como promotores de eventos inmunes como las ETosis, principalmente la NETosis (mediada por neutrófilos) y la METosis (mediada por macrófagos) (146,151,257).



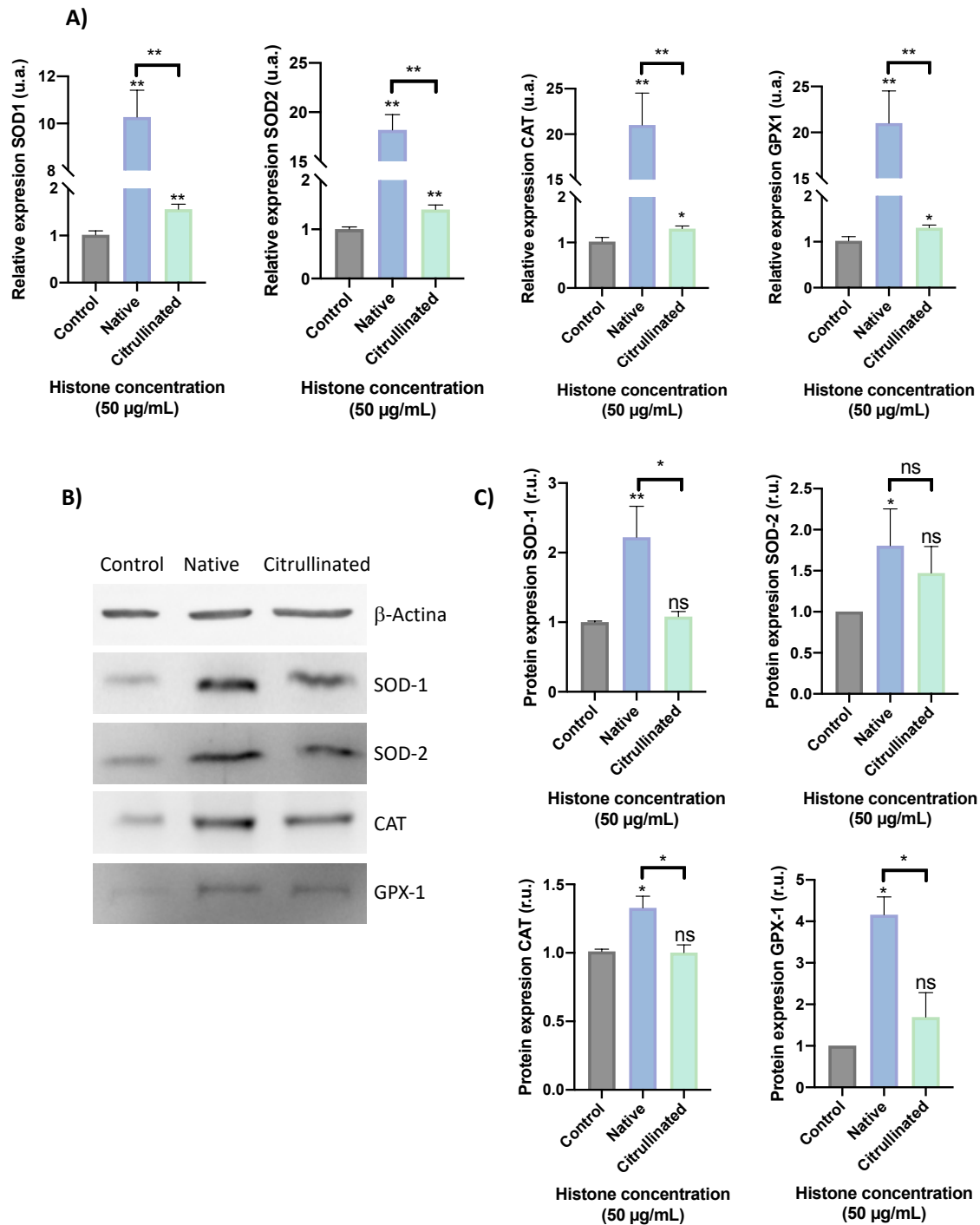
**Figura 15. Viabilidad celular.** A) Ensayo de MTT para el análisis de la viabilidad celular. B) Análisis de la viabilidad y mortalidad celular mediante Citometría de Flujo. C) Microscopía óptica para mostrar cómo responden las células HUVEC cuando son expuestas a histonas extracelulares. La escala de la microscopía óptica es de 100µm. Los datos estadísticos son expresados como media±SEM para 3-5 ensayos independientes. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 comparado con el control (concentración de histonas 0µg/mL). Las líneas en la parte superior de las columnas indica las diferencias entre las condiciones comparadas. Abreviaturas: ns: p-valor no significativo.

### 6.3. LA CITRULINACIÓN DE LAS HISTONAS DISMINUYE LA CAPACIDAD DE LAS HISTONAS EXTRACELULARES PARA PRODUCIR ESTRÉS OXIDATIVO Y LA ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE MEDIADA POR LAS HISTONAS EXTRACELULARES

Trabajos anteriores de nuestro grupo han demostrado que las histonas extracelulares inducen estrés oxidativo y desregulan la respuesta antioxidante celular (128). Puesto que las histonas citrulinadas no indujeron cambios en la viabilidad celular, analizamos la respuesta antioxidante para evaluar si las histonas citrulinadas eran capaces o no de modificar esta respuesta. Las HUVEC expuestas a histonas extracelulares nativas mostraron una sobreexpresión de las enzimas implicadas en la detoxificación de los superóxidos (SOD1 y SOD2) y del peróxido de hidrógeno (CAT y GPX1). Mientras que las HUVEC expuestas a histonas citrulinadas sólo mostraron un incremento en la expresión del mRNA, que no dio lugar a un incremento en la expresión de proteínas de las enzimas antioxidantes (Figura 16).



Los resultados obtenidos hasta el momento explicarían que las histonas citrulinadas no sólo no son citotóxicas para las células endoteliales, como sí lo son las histonas nativas, sino que además estas histonas citrulinadas no están activando respuestas celulares relacionadas con la defensa frente al daño celular, puesto que una de las primeras respuestas activadas ante un daño celular es la activación de la respuesta antioxidante ante el incremento del estrés oxidativo (258). Con los resultados obtenidos en estos experimentos *in vitro*, en los que las células endoteliales no están activando una respuesta antioxidante cuando se exponen a histonas citrulinadas, interpretamos que no están causando un daño oxidativo. Sin embargo, las células expuestas a histonas nativas necesitan activar esta respuesta antioxidante para combatir el estrés oxidativo que estarían generando.



**Figura 16. Estrés oxidativo y respuesta antioxidante en HUVEC expuestas a histonas en condiciones nativas y citrulinadas.** A) Expresión relativa de las enzimas antioxidantes implicadas en la detoxificación de los superóxidos (SOD-1 y SOD-2) y del peróxido de hidrógeno (CAT y GPX-1) evaluados por RT-qPCR. B) WB representativo de los niveles de proteína de las enzimas antioxidantes CuZnSOD (SOD-1), MnSOD (SOD-2), Catalasa (CAT) and Glutación peroxidasa 1 (Gpx-1), respectivamente. C) Densitometría de 3-5 WB de experimentos independientes, mostrando la cantidad relativa de enzimas antioxidantes en cada condición analizada. Los datos son expresados como media±SEM para 3-5 ensayos independientes. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01. Las líneas en la parte superior de las columnas indica las diferencias entre las condiciones comparadas. Abreviaturas: ns: p-valor no significativo; WB: Western Blot; SOD: Superóxido Dismutasa; CAT: Catalasa; GPX: Glutación peroxidasa.

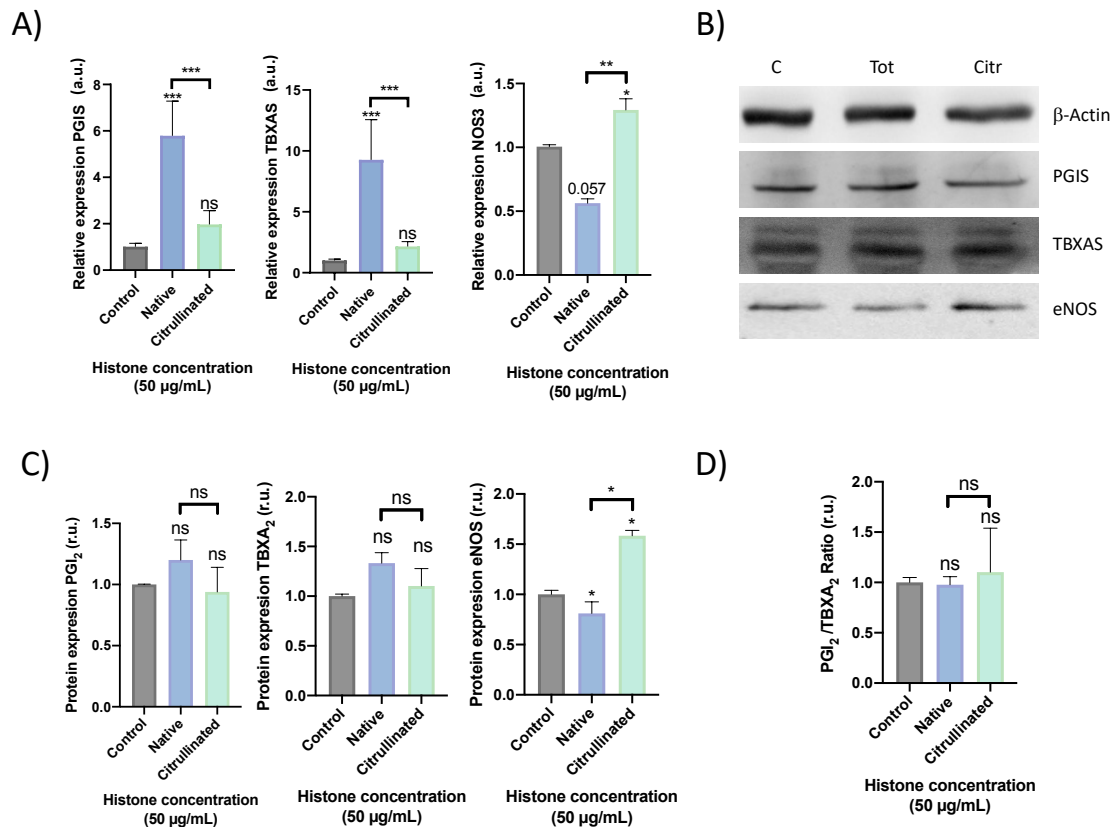
#### 6.4. LAS HISTONAS EXTRACELULARES ALTERAN LA BIOSÍNTESIS DE PROSTANOIDES EN HUVEC

Los prostanooides son moléculas producidas y liberadas por las células endoteliales, implicadas en la contracción y relajación del endotelio actuando a nivel del musculo liso (259). En este sentido, se analizó si las histonas extracelulares nativas y citrulinadas modifican la función normal del endotelio exponiendo las HUVEC a histonas extracelulares (nativas y citrulinadas) y evaluando los niveles de expresión génica y proteica de la prostaciclina sintasa (PGIS), la tromboxano sintasa (TBXAS) y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS).

Cuando las HUVEC se expusieron a histonas extracelulares nativas, tanto la PGIS como la TBXAS incrementaron dramáticamente su expresión (Figura 17A). Esta sobreexpresión no se observó en las HUVEC expuestas a histonas citrulinadas. A pesar de ello, la ratio  $PGI_2/TBXA_2$  no se vió alterada en ninguno de los dos casos (Figura 17).

Sorprendentemente, las células endoteliales expuestas a histonas nativas mostraron una reducción de los niveles de eNOS (Figura 17A y B), mientras que las expuestas a histonas citrulinadas los aumentaron. Además, los cambios de expresión génica se vieron traducidos en cambios de expresión proteica (Figura 17). El incremento de expresión de los niveles de eNOS indica que, a pesar de que las histonas citrulinadas no están induciendo un daño en las HUVEC, sí están causando un efecto sobre las mismas.

Es importante destacar que la iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) es una fuente significativa de óxido nítrico. Sin embargo, numerosos estudios demuestran que los tiempos de activación de esta enzima son superiores a 4h, tiempo de trabajo del presente estudio. En el trabajo de Kroll y Waltenberger expusieron las HUVEC a LPS durante 24h para analizar los cambios de expresión de la iNOS (260), mientras que Qi *et al* expusieron las células a cambios de glucosa durante 3 días (261). En este sentido, es importante destacar que de Asis *et al* observaron que las HUVEC pierden eficacia en la activación de la iNOS con el tiempo, advirtiendo que su activación comienza tras 12h del aislamiento de estas células del cordón umbilical, alcanzando su máximo de expresión a los 3 días y presentando niveles indetectables tras 7 días (262). Por ello, es importante subrayar que las HUVEC son un modelo *in vitro* que representan una aproximación de lo que sucede en un organismo completo, pero no replican exactamente qué sucede. En este sentido, queremos subrayar que a pesar de que los niveles de iNOS se midieron en HUVEC expuestas durante 4h a histonas (resultados no mostrados), no se detectaron cambios en los niveles de expresión de iNOS.



**Figura 17. Prostanoides y respuesta endotelial en HUVEC expuestas a histonas extracelulares nativas y citrulinadas.** **A)** Expresión relativa de las enzimas implicadas en la síntesis de prostanoides y eNOS determinadas por RT-PCR. **B)** WB representativo mostrando los niveles de proteínas de PGIS, TBXAS y eNOS. **C)** Densitometría de 3-5 WB independientes mostrando la expresión relativa de las proteínas de PGI<sub>2</sub>, TBXA<sub>2</sub> y eNOS. **D)** Ratio PGI<sub>2</sub>/TBXA<sub>2</sub>. Los datos son expresados como media±SEM para 3-5 ensayos independientes. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 comparado con el control (concentración de histonas 0 µg/mL). Las líneas en la parte superior de las columnas indica las diferencias entre las condiciones comparadas. Abreviaturas: ns: p-valor no significativo, PGIS: Prostaciclina Sintasa; TBXAS: Tromboxano Sintasa; eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial.

Se ha descrito que el aumento de estrés oxidativo causa una reducción de la biodisponibilidad de óxido nítrico, provocando una alteración sobre el tono vascular, la disregulación de las células endoteliales, inflamación, apoptosis y alteraciones en la matriz extracelular (263). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con este estudio, además de dar sentido al aumento de estrés oxidativo que causan las histonas extracelulares en condiciones nativas sobre las células HUVEC y la disminución de eNOS observada en esas células. Sin embargo, aquí es necesario indicar que los pacientes con sepsis suelen presentar una caída de la presión arterial media, y por ello, necesitan el mantenimiento de la misma con el uso de vasopresores (16,42,215), por lo que la función de la eNOS no es la única involucrada en este evento. En este sentido, la iNOS también ha sido descrita como un mediador inmune clave durante la sepsis, y se ha observado que modelos animales con sepsis inducida por punción cecal (CLP) en ratones, muestran cambios en la migración celular e hipotermia asociados con la actividad de la iNOS tras 24h (264). Por otro

lado, el trabajo de Konukoglu y Uzun explica también que el aumento de actividad de eNOS causaría una actividad antiapoptótica, lo cual explicaría los resultados que obtuvimos al exponer las células a histonas citrulinadas (265), en las cuales observamos un aumento de expresión de esta enzima y no observamos una reducción de la viabilidad celular.

La distinta modulación sufrida por la eNOS como consecuencia de la exposición de las HUVEC a histonas nativas o citrulinadas, así como los resultados obtenidos en la viabilidad celular, refuerzan la idea de que aunque la ETosis pueda estar relacionada con eventos trombóticos y daño tisular (266), las histonas citrulinadas que se liberan durante este proceso no están contribuyendo al daño asociado al mismo. De manera similar, las histonas nativas también afectan a la síntesis de prostanooides, incrementando la expresión de las ciclooxigenasas, prostaciclina y tromboxano, las cuales, junto con el óxido nítrico, afectan a la homeostasis vascular. Como consecuencia, mientras que las histonas nativas desregulan las células endoteliales, como ha demostrado previamente nuestro grupo de investigación (123,126,253), las histonas citrulinadas no alteran la función endotelial.

#### **6.5. LAS HISTONAS EXTRACELULARES ACTIVAN LAS VÍAS DE INFLAMACIÓN Y MODULAN LAS VÍAS DE LA BIOSÍNTESIS DE PROSTANOIDES EN HUVEC**

Las ciclooxigenasas (COX) son las reguladoras por excelencia de los prostanooides (267). Las diferentes isoformas de las COX (1 y 2) se consideran mediadores importantes de diferentes proteínas inflamatorias como la interleuquina (IL)-6 (268). Concretamente, la COX-1 modula la síntesis de TBXA<sub>2</sub>, mientras que la COX-2 es la responsable de la síntesis de PGI<sub>2</sub>, además de estar relacionada con fenotipos inflamatorios (268). En este sentido, la IL-6 es una de las primeras citoquinas en liberarse durante la inflamación, incluyendo la cascada hiperinflamatoria que se da durante la sepsis (269). La inflamación en el endotelio se ha relacionado con la respuesta inmune, donde la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la molécula de adhesión vascular (VCAM-1) y la Selectina endotelial (E-SEL) juegan un rol fundamental mediando el rodamiento leucocitario, donde interviene la E-SEL y la migración transendotelial, en la que participan ICAM1 y VCAM1 (270).

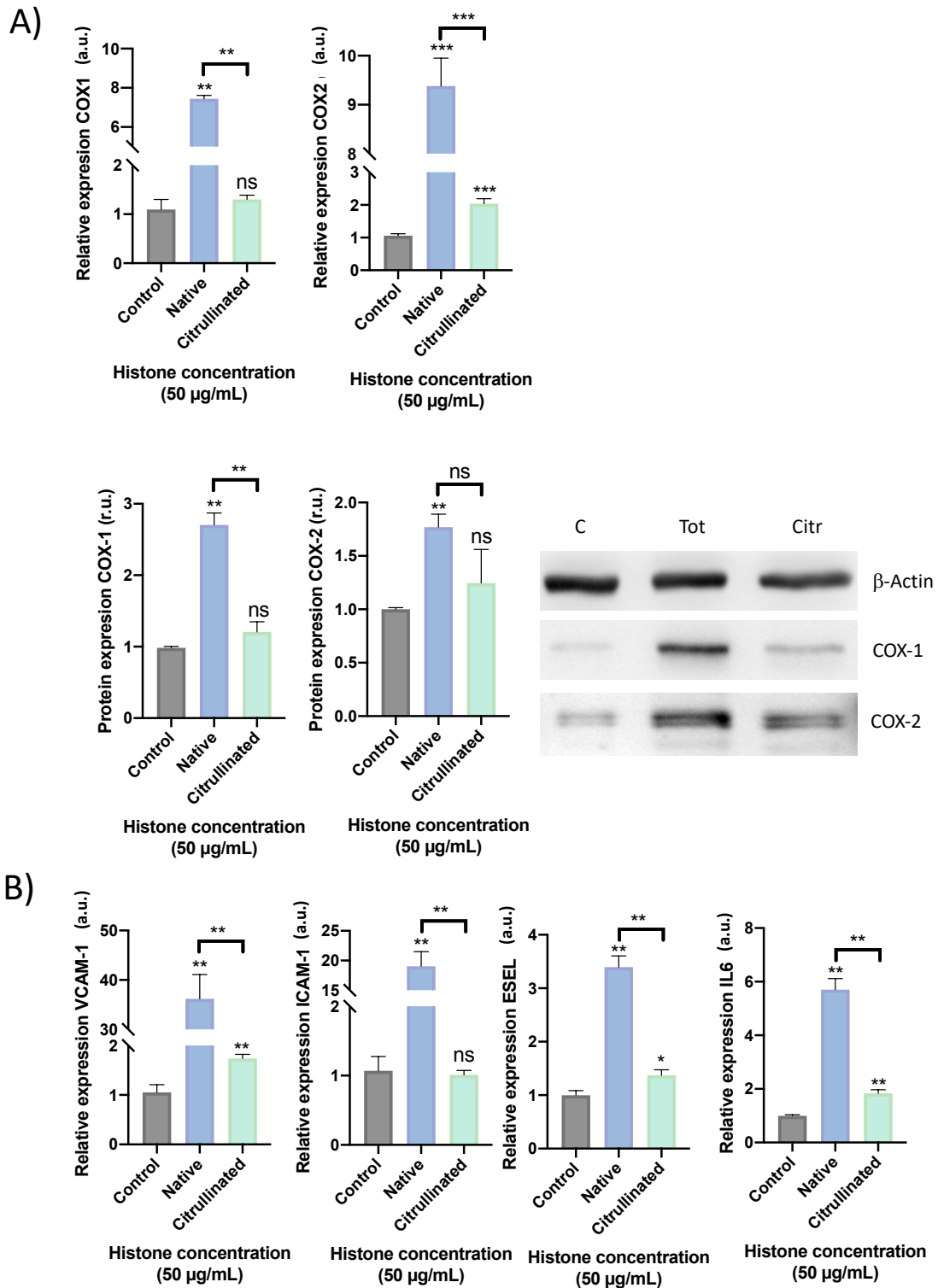
Como ahora veremos, nuestros resultados apuntan a que las HUVEC expuestas a histonas extracelulares nativas inducían la expresión de COX-1, mientras que las células expuestas a histonas citrulinadas no indujeron su expresión (Figura 18A). Estos resultados concordaron con los obtenidos anteriormente con las variaciones de los niveles de prostanooides, puesto que su

expresión estaba aumentada en las células expuestas a histonas nativas, pero no citrulinadas (Figura 17).

Los niveles de COX-2 aumentaron en las HUVEC expuestas a histonas extracelulares, tanto en su forma nativa como en las citrulinadas. Sin embargo, las células expuestas a histonas citrulinadas lo hicieron en menor medida que las expuestas a histonas nativas (Figura 18A). El aumento de COX-2 indica que las histonas extracelulares podrían ser capaces de inducir una respuesta inflamatoria, lo cual se confirmó al analizar los niveles de IL-6. Los niveles de esta citoquina se encontraron incrementados tanto en las células expuestas a histonas nativas como citrulinadas (Figura 18B), aunque en menor medida en el caso de las segundas. De manera similar, las HUVEC expuestas a histonas extracelulares nativas incrementaron los niveles de expresión de ICAM-1, VCAM-1 y E-SEL (Figura 18B), mientras que las expuestas a histonas citrulinadas incrementaron los niveles de VCAM-1 y E-SEL, pero en menor medida, y no variaron la expresión de ICAM-1 (Figura 18B). Este hecho plantea que ambos tipos de histonas extracelulares deben contribuir al reclutamiento de los leucocitos en los lugares donde hay daño tisular o inflamación con el objetivo de conseguir que en el sitio de infección se produzca la respuesta inmunitaria nativa.

Otros autores han asociado la liberación de histonas al torrente sanguíneo con la inflamación (138). En el presente trabajo se ha observado que tanto las histonas nativas como las citrulinadas fueron capaces de inducir la expresión de IL-6, aunque las histonas en condiciones nativas produjeron un mayor incremento de esta citoquina en las células endoteliales que las histonas citrulinadas. Además, VCAM-1, ICAM-1 y ESEL, implicadas en la respuesta inmunitaria mediada por el endotelio, estaban sobreexpresadas tanto en las células expuestas a histonas nativas como en las citrulinadas. Por ello, nosotros proponemos que las histonas citrulinadas tienen la habilidad de potenciar una respuesta inmune sin causar daño al organismo huésped, confirmando nuestra hipótesis de que las histonas citrulinadas son menos citotóxicas que las histonas nativas.

Con lo observado en estos resultados, podemos concluir que las histonas citrulinadas estarían mediando inflamación, así como la activación de una respuesta inmune mediada por el endotelio. La activación de una respuesta inmunitaria, sin la activación de patrones de estrés oxidativo o muerte celular, puede indicar el papel protector de la citrulinación, puesto que las histonas citrulinadas serían capaces de actuar como estímulo para mediar una respuesta inmunitaria sin inducir un daño.



**Figura 18. Respuesta inmune mediada por las HUVEC expuestas a histonas extracelulares nativas y citrulinadas.** A) Expresión relativa evaluada por RT-qPCR y por WB de los reguladores de las vías de síntesis de prostanoideos (COX-1 y COX-2). B) Expresión relativa de los mediadores de la adhesión endotelial (VCAM-1, ICAM-1, ESEL) y de la IL-6 proinflamatoria evaluados por RT-qPCR. Los datos son expresados como media $\pm$ SEM para 3-5 ensayos independientes. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 comparado con el control (concentración de histonas 0 µg/mL). Las líneas en la parte superior de las columnas indica las diferencias entre las condiciones comparadas. Abreviaturas: ns: p-valor no significativo, COX: Ciclooxygenasa; IL: Interleuquina; ICAM: Molécula de adhesión interrelular; VCAM: Molécula de adhesión vascular.

Hasta el momento hemos analizado los diferentes mecanismos moleculares que activan las histonas citrulinadas sobre las células endoteliales. La importancia de entender cómo actúa la citrulinación de las histonas recae sobre la hipótesis de que gran cantidad de las histonas liberadas al torrente sanguíneo durante el inicio de la sepsis deben estar citrulinadas, como consecuencia de la activación de diferentes ETosis, procesos de la inmunidad innata.

Los NETs, producidos por la ETosis de neutrófilos, son mediadores clave en la inducción de la piroptosis en macrófagos durante procesos sépticos, aumentando la respuesta inmunitaria en los sitios de infección donde hay un gran reclutamiento de leucocitos (156). Cabe destacar que, como describió nuestro grupo de investigación, durante estadios tempranos de la sepsis se elevan los niveles sistémicos de GM-CSF, citoquina granulopoyética clave tras la infección y encargada de incrementar los niveles sistémicos de los neutrófilos y macrófagos, y dirigirlos al lugar de infección (57,157). Debido a que las ETosis más abundantes son las de neutrófilos y macrófagos, y estas son células que aumentan su población durante la infección, en cierto modo por acción de la citoquina GM-CSF, esperábamos encontrar elevados niveles tanto de histonas circulantes como de histonas citrulinadas en muestras de plasma de pacientes. Por todo ello, se analizaron los niveles de histonas circulantes e histonas citrulinadas en muestras de plasma de pacientes a diferentes tiempos durante su estancia en UCI y se establecieron correlaciones entre los niveles obtenidos y las características clínicas de los pacientes, con el fin de corroborar si los resultados obtenidos *in vitro* podían explicar los distintos fenotipos clínicos de los pacientes.

#### **6.6. LOS NIVELES DE HISTONAS CIRCULANTES Y CITRULINADAS SON MÁS ELEVADOS EN LOS PACIENTES CON FENOTIPOS SEVEROS**

Las histonas circulantes fueron medidas mediante espectrometría de masas en 88 muestras de plasma obtenidas de los pacientes con sepsis y SS, en diferentes estadios clínicos. Las mismas 88 muestras de plasma fueron utilizadas para medir los niveles de H3cit, con el fin de comparar la evolución de los niveles de histonas circulantes (Figura 19A-B) y los niveles de H3cit circulante (Figura 19C-D), y analizar cómo variaron sus niveles a lo largo de la estancia de los pacientes en la UCI (selección de pacientes explicado en más profundidad en el apartado 5.10).

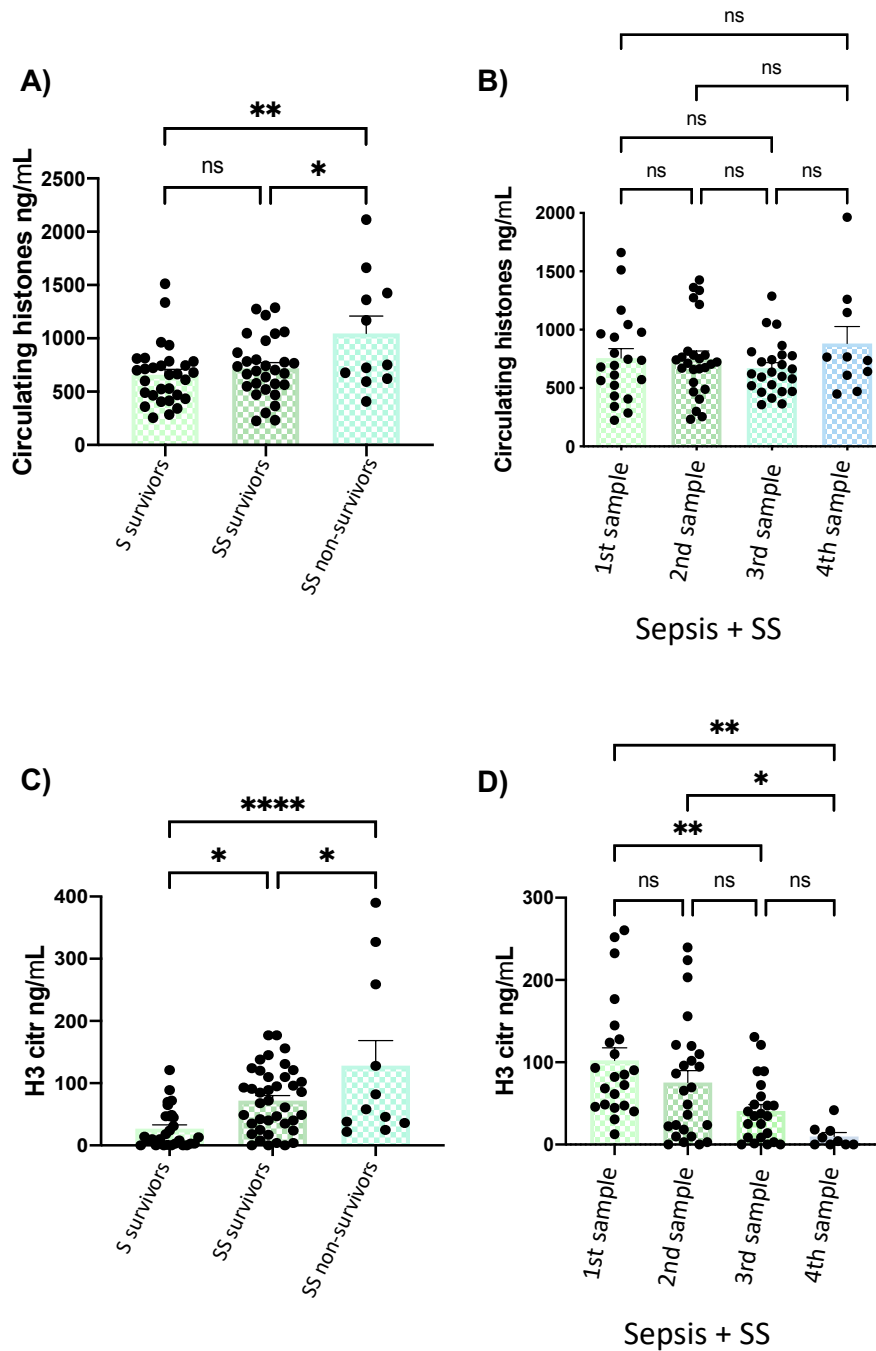
La Figura 19A expone los niveles de histonas circulantes entre los diferentes grupos analizados, encontrando los mayores niveles en los pacientes con peor fenotipo clínico (SS no supervivientes). La Figura 19B muestra la evolución de los niveles de histonas circulantes a lo largo de la estancia en UCI de los pacientes, sin observarse diferencias significativas. La Figura 19C presenta los niveles de H3cit entre los diferentes grupos analizados, mostrando diferencias



significativas entre todos ellos, especialmente entre el grupo menos afectado, supervivientes de sepsis, y el más afectado, SS no supervivientes. Cabe resaltar que los niveles de histonas H3cit incrementaron sus niveles a medida que los pacientes empeoraron, siendo el grupo de pacientes con sepsis el que menor nivel de H3cit presenta, y el grupo de SS no supervivientes el que mostró mayores niveles de H3cit. Esto podría indicar un intento de desencadenar una respuesta inmunitaria más activa para intentar salvar al paciente.

Finalmente, la Figura 19D, muestra la evolución de los niveles de H3cit a lo largo de la estancia en UCI de los pacientes, observándose una reducción significativa de los niveles de H3cit a medida que pasa el tiempo. Así pues, los niveles más elevados de H3cit se encontraron en la primera muestra, tomada durante las primeras 24h de ingreso del paciente en UCI. Esto podría ser debido a que los eventos de ETosis están asociados a la inmunidad innata, que está especialmente activa durante los primeros estadios de la infección, y a medida que se activan los mecanismos de inmunidad adaptativa, la innata reduce su actividad (ver figura Figura 3 en la introducción) (77). Todo esto estaría en consonancia con lo publicado anteriormente por nuestro grupo, donde se encontraron elevados niveles de GM-CSF en muestras de plasma de pacientes con sepsis a tiempos iniciales, siendo esta citoquina capaz de potenciar la producción y segregación de neutrófilos y macrófagos, células implicadas en mecanismos de ETosis (57).

Cabe destacar que, al comparar los niveles de las histonas circulantes con los niveles de H3cit, puede observarse que los primeros son casi diez veces superiores a los segundos (Figura 19A y C), alcanzando los niveles de histonas circulantes ~1000ng/mL y los de H3cit ~100ng/mL. Esta observación nos permite concluir que apenas una décima parte de las histonas circulantes por el torrente sanguíneo de los pacientes con sepsis, están citrulinadas. Por lo tanto, las que actúan desregulando la actividad endotelial, serán principalmente las histonas nativas, es decir, sin modificaciones postraduccionales inducidas. Esto concuerda con los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro*, anteriormente expuestos donde demostramos que las histonas que realmente inducen daño celular son las histonas nativas, las cuales presentan mayores niveles en los pacientes sépticos, y más todavía en los pacientes con SS.



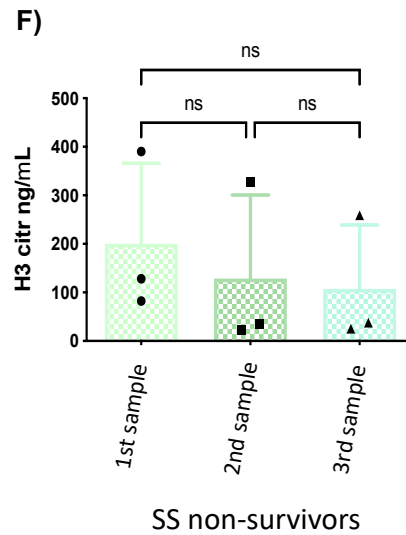
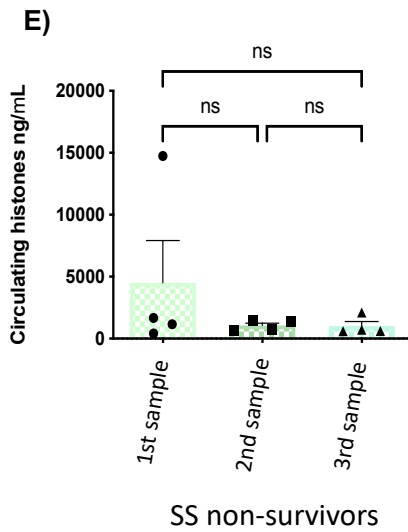
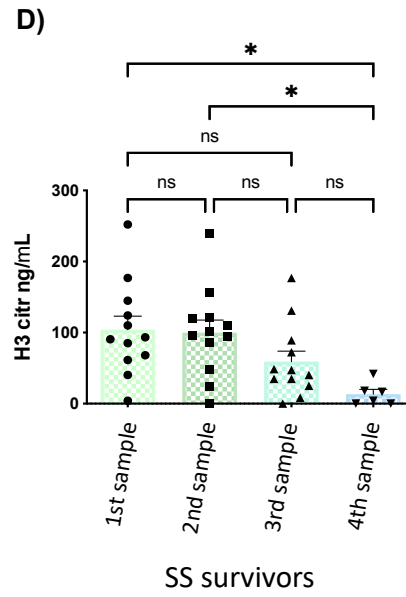
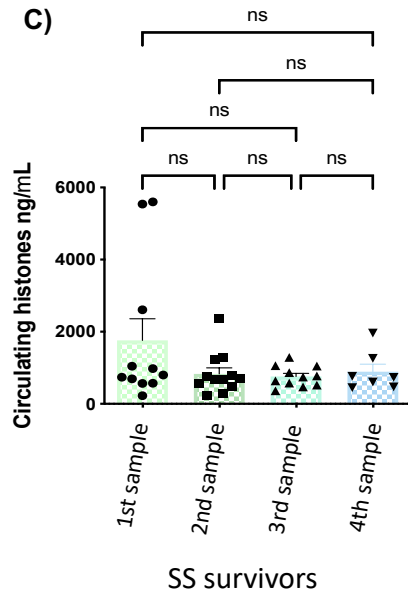
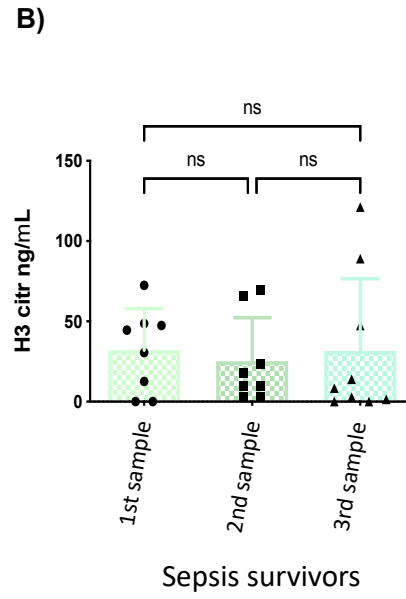
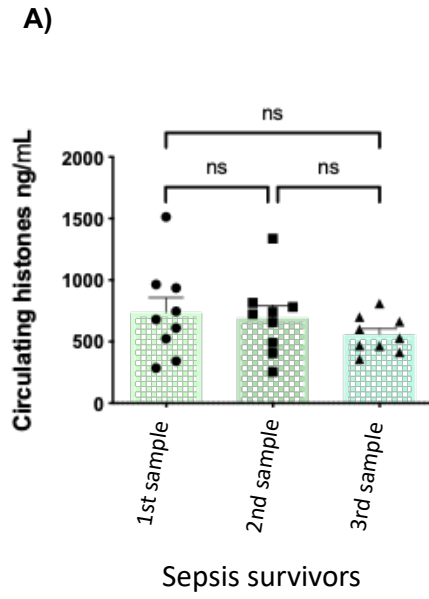
**Figura 19. Variación de los niveles de histonas circulantes y citrulinadas a lo largo de la estancia en UCI de los pacientes.** **A)** Variación de los niveles de histonas entre grupos de pacientes incluyendo todas las muestras tomadas durante los diferentes tiempos. **B)** Variación de los niveles de histonas a lo largo de la estancia en UCI de los pacientes. **C)** Niveles de histonas citrulinadas entre grupos de pacientes incluyendo todas las muestras tomadas durante los diferentes tiempos. **D)** Variación de los niveles de histonas citrulinadas a lo largo de la estancia en UCI de los pacientes. El eje de las X en las figuras B y D indica las muestras tomadas durante la estancia de los pacientes en UCI: 1ª muestra, obtenida durante las primeras 24h de la admisión del paciente en la UCI; 2ª muestra, obtenida tras 3 días; 3ª muestra, obtenida tras 5 días; 4ª muestra, obtenida antes del alta o antes de morir el paciente. Los datos son expresados como media±SEM para 3-5 ensayos independientes. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . Las líneas en la parte superior de las columnas indica las diferencias entre las condiciones comparadas. Abreviaturas: ns: p-valor no significativo; SS: Shock séptico; Citr: Citrulinada.

Cuando los niveles de histonas circulantes y citrulinadas se estudian en los diferentes grupos de pacientes para analizar cómo varían durante el tiempo que los pacientes están ingresados en la UCI, observamos que los pacientes que han sobrevivido a la sepsis, no muestran variaciones significativas de histonas circulantes ni citrulinadas entre los diferentes tiempos estudiados (Figura 20A-B). Sin embargo, los pacientes con SS sí manifestaron diferencias en sus concentraciones a lo largo de la estancia en UCI. Los que han sufrido un SS pero han sobrevivido, revelan diferencias significativas en los niveles de H3cit, mostrando una reducción de los mismos a medida que pasa el tiempo (Figura 20C-D). Los pacientes de SS que fallecieron, mostraron una tendencia similar a la de los pacientes que sobrevivieron, viéndose reducidos los niveles de H3cit a medida que progresa la enfermedad (Figura 20E-F). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en estos pacientes. Esto podría ser debido a que no se incluyeron muestras suficientes de esta cohorte para poder ver una diferencia estadística, lo que constituye una limitación del estudio.

A pesar de que los niveles de H3cit disminuyen a medida que pasa el tiempo, los niveles de histonas circulantes no se ven significativamente reducidos en ningún momento de la enfermedad. Sin embargo, cuando se comparan los niveles de histonas circulantes de cada grupo de pacientes (Figura 20), observamos que los pacientes menos afectados, es decir, los pacientes sépticos supervivientes, presentan unos niveles de histonas mucho menores (~1500ng/mL) que los pacientes más graves. Así pues, a medida que el fenotipo clínico es más grave, los niveles de histonas aumentaron, llegando a niveles de hasta ~6000ng/mL en el caso de los pacientes con SS supervivientes, y hasta ~20000ng/mL en los pacientes con SS que fallecieron (Figura 20). Por lo tanto, los niveles de histonas circulantes correlacionan con fenotipos más severos de la enfermedad (271) y podrían servir como marcador de pronóstico, puesto que mayores niveles de histonas en la primera muestra tomada, se ven relacionados con una peor evolución. Además, cabe destacar que los niveles iniciales de histonas circulantes se mantienen constantes durante todo el periodo de la estancia en UCI.

Es interesante destacar que los niveles de H3cit también son menores en los pacientes con sepsis que en los pacientes con SS, ascendiendo desde ~80ng/mL a ~300ng/mL respectivamente (Figura 20), sugiriendo que la respuesta inmunitaria activada por cada grupo de pacientes está siendo diferente. Puesto que los eventos de ETosis se activan cuando necesitan combatir una infección y el sistema inmune no está siendo capaz de combatirla con mecanismos menos agresivos (146), es esperable que estos mecanismos de defensa estén más activos en los pacientes más graves. Además, los pacientes con SS presentan un mayor daño orgánico en comparación con los pacientes sépticos sin shock, por lo que la activación de su sistema inmunitario es mayor en estos pacientes. Los niveles de H3cit circulantes, a diferencia de los que se observan en las histonas

circulantes, se vieron reducidos a medida que aumentaba el tiempo de estancia en UCI. Esta reducción puede explicarse por el decremento de la actividad de la inmunidad innata a medida que se activa la inmunidad adaptativa (96) (ver Figura 3 de la introducción), y la disminución de eventos de la inmunidad innata como las ETosis, principal causante del incremento de los niveles de H3cit. Otra hipótesis que podría explicar la disminución de los niveles de H3cit sería la reducción de las células capaces de inducir ETosis, bien porque se hayan destruido a medida que se han activado los procesos previos de ETosis, o bien porque la respuesta inmune del paciente pueda verse comprometida a medida que el paciente requiera más tiempo para superar la sepsis. Algunos autores han descrito que a medida que progresa la enfermedad, el sistema inmune de los pacientes se queda exhausto, decreciendo su actividad y llegando a producirse una inmunoparálisis (62,272,273), por lo que disminuirían estos eventos de ETosis que liberan las histonas citrulinadas.



**Figura 20. Variación de los niveles de histonas circulantes y citrulinadas a lo largo de la estancia en UCI de los diferentes grupos de pacientes.** A) Niveles de histonas circulantes en pacientes supervivientes de sepsis. B) Niveles de H3 citrulinada (H3cit) en pacientes supervivientes de sepsis. C) Niveles de histonas circulantes en pacientes supervivientes de SS D) Niveles de H3cit en pacientes supervivientes de SS. E) Niveles de histonas circulantes en pacientes no supervivientes de SS. F) Niveles de H3cit en pacientes no supervivientes de SS. El eje de las X muestra las muestras tomadas durante la estancia de los pacientes en UCI: 1ª muestra, obtenida durante las primeras 24h de la admisión del paciente en la UCI); 2ª muestra, obtenida tras 3 días; 3ª muestra, obtenida tras 5 días; 4ª muestra, obtenida antes del alta o antes de morir el paciente. Los datos son expresados como media±SEM para 3-5 ensayos independientes. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001. Las líneas en la parte superior de las columnas indica las diferencias entre las condiciones comparadas. Abreviaturas: ns: p-valor no significativo; SS: Shock séptico; Citr: Citrulinada.

### 6.7. CORRELACIONES ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y LOS NIVELES DE HISTONAS CIRCULANTES Y DE H3 CITRULINADA

Una vez estudiada la variación de los niveles de histonas circulantes y H3cit circulantes entre los distintos grupos de pacientes y a lo largo de su estancia en UCI, realizamos una serie de análisis de correlación entre los parámetros clínicos, los valores obtenidos por espectrometría de masas para las histonas circulantes y los valores obtenidos para el análisis de H3cit de cada paciente. De esta forma calculamos el coeficiente de correlación de Spearman para los parámetros clínicos en todos los casos de estudio, incluyendo los pacientes con sepsis y SS. Los valores estadísticos (coeficientes de correlación y p-valor) se muestran como mapas de calor en las Figuras 21, 22, y 23. Las tablas que presentan los valores estadísticos, incluyendo el valor de los coeficientes de correlación y el p-valor, se muestran en las tablas suplementarias S2 a S10 en la sección de anexos.

#### 6.7.1. CORRELACIONES EN LOS PACIENTES SUPERVIVIENTES A UN EPISODIO DE SEPSIS

Centrándonos en el grupo de pacientes supervivientes a un episodio de sepsis (Figura 21), se encontraron algunas correlaciones significativas (Tablas S2-S4, Anexos I) durante las primeras 24h tras la admisión en UCI de los pacientes (1ª muestra) (Figura 21A), como es el caso de la correlación entre las histonas circulantes y la H3cit circulante (Spearman  $r=0.451$ ,  $p=0.05$ ). Además, se encontró una correlación positiva moderada entre las histonas circulantes y el quick SOFA (Spearman  $r=-0.525$ ,  $p=0.021$ ), el lactato (Spearman  $r=0.668$ ,  $p=0.002$ ), los leucocitos y los PMN (células polimorfonucleares) (Spearman  $r=0.658$ ,  $p=0.002$  y Spearman  $r=0.451$ ,  $p=0.05$ , respectivamente). Las histonas circulantes también correlacionaron con la protrombina total (Prot Tot) (Spearman  $r=0.47$ ,  $p=0.042$ ), la Proteína C Activada (PCA) (Spearman  $r=-0.83$ ,  $p=0.000$ ), y la Proteína C Funcional (ProtFuncC) (Spearman  $r=-0.574$ ,  $p=0.010$ ). Así mismo, también se encontraron algunas correlaciones entre la H3cit circulante y el lactato (Spearman  $r=0.772$ ,  $p=0.000$ ), y con el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) (Spearman  $r=0.542$ ,  $p=$

0.016). Cuando se observan los mapas de calor obtenidos para las muestras 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> (correspondientes a las muestras obtenidas los días 3 y 5 en UCI) en el grupo de pacientes con sepsis (Figuras 21B y 21C), no se encontraron correlaciones para las histonas circulantes ni tampoco para las H3cit circulantes.

En las correlaciones obtenidas en el grupo de pacientes sépticos (sin shock séptico) supervivientes se observó que, a pesar de que muchas de las variables clínicas mostraron una alteración considerable en estos pacientes al inicio de la enfermedad, la mayoría de estas variables se reestablecen con el paso del tiempo (Figura 21). De hecho, en las muestras obtenida durante el tercer día de ingreso en UCI (Figura 21B), ya no se observaron correlaciones entre las histonas circulantes con los diferentes parámetros clínicos y bioquímicos medidos en los pacientes y tampoco se observaron correlaciones entre la histona H3cit circulante y estos parámetros. Sin embargo, sí que se observaron correlaciones de las histonas circulantes e histona H3cit con parámetros clínicos y marcadores bioquímicos que definen el fenotipo de un paciente séptico en la primera muestra obtenida. Algunos de estos parámetros clínicos son los niveles elevados de lactato, indicando un daño orgánico asociado a la sepsis, y las correlaciones con los leucocitos y PMN indicando la activación del sistema inmunitario para tratar de recuperar la homeostasis del organismo combatiendo a los patógenos causantes de la infección. Así mismo, se observó una correlación positiva con la Protrombina Total y una correlación negativa con la proteína PCA, indicando que existen alteraciones en la vía común de la coagulación y que la respuesta anticoagulante podría no estar correctamente activada. Sin embargo, y reforzando nuestra hipótesis sobre el papel protector que ejerce la citrulinación de las histonas, se observó una fuerte correlación positiva con la APTT, lo que podría indicar que se requiere de un mayor tiempo para la formación del trombo (Figura 21A). Todas estas observaciones se ven reforzadas por el hecho de que no se identificaron correlaciones a lo largo de la estancia en UCI de los pacientes sépticos supervivientes, probablemente debido a una mejor evolución de la enfermedad y al alta de estos pacientes tras una corta estancia en UCI.

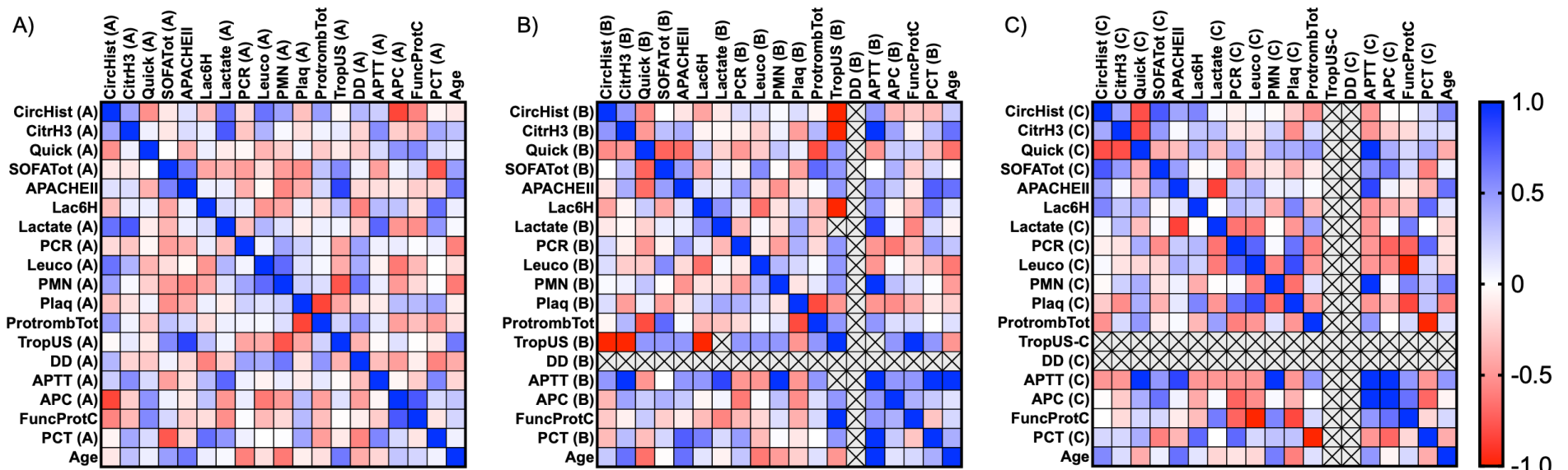


Figura 21. Mapas de calor representando los coeficientes de correlación de Spearman (de -1 a +1) del grupo de supervivientes de sepsis (n=9) entre las diferentes variables clínicas analizadas. El color rojo indica una correlación negativa y el color azul indica una correlación positiva entre los parámetros comparados. A) 1ª muestra, obtenida durante las primeras 24 horas de la admisión del paciente en la UCI. B) 2ª muestra, obtenida tras 3 días del ingreso en UCI. C) 3ª muestra, obtenida tras 5 días de ingreso en UCI. Abreviaturas: CircHist: Histonas circulantes; H3cit: H3 citrulinada; PCA: Proteína C Activada; SOFA: Evaluación secuencial del Fallo Orgánico (por sus siglas en inglés Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment); APTT: Tiempo de tromboplastina parcial activada; PCR: Proteína C Reactiva; PCT: Procalcitonina; PMNS: Células Polimorfonucleares; Plaqa: Plaquetas; Quick: SOFA rápido; DD: Dímero D; TropUS: Troponina Ultrasensible; FuncProtC: Proteína C Funcional; APACHE II: Sistema de clasificación de fisiología aguda y enfermedades crónicas II; ProtrombTot: Tromboplastina total; Lac6H: Lactato tras 6h en UCI.



### 6.7.2. CORRELACIONES EN LOS PACIENTES SUPERVIVIENTES A UN EPISODIO DE SHOCK SÉPTICO

En el grupo de supervivientes de SS (Figura 22; Tablas S5-S7, Anexos I), se estudiaron las diferentes correlaciones durante las primeras 24h tras la admisión en UCI (1ª muestra; Figura 22A). Las H3cit circulantes correlacionaron con el Lactato (Spearman  $r=0.0486$ ,  $r=0.035$ ), mientras que las histonas circulantes mostraron correlaciones con el quick SOFA (Spearman  $r=-0.777$ ,  $p=0.000$ ), el SOFA Tot (Spearman  $r=0.456$ ,  $p=0.050$ ), el Lactato (Spearman  $r=-0.465$ ,  $p=0.045$ ), la Proteína C Reactiva (PCR) (Spearman  $r=-0.505$ ,  $p=0.027$ ), las Plaquetas (Spearman  $r=-0.561$ ,  $p=0.012$ ), la Protrombina Total (Spearman  $r=0.498$ ,  $r=0.030$ ), la Troponina Ultra Sensible (TropUS) (Spearman  $r=0.716$ ,  $p=0.001$ ), el Dímero-D (DD) (Spearman  $r=0.661$ ,  $p=0.002$ ), el ATTP (Spearman  $r=0.600$ ,  $p=0.007$ ), la PCA (Spearman  $r=-0.632$ ,  $p=0.004$ ), y la Proteína C Funcional (Spearman  $r=-0.726$ ,  $p=0.000$ ). En la Figura 22B, se muestran los resultados de la 2ª muestra obtenida durante el tercer día de ingreso en UCI, las histonas circulantes correlacionaron con el APTT (Spearman  $r=-0.841$ ,  $p=0.036$ ) y la PCT (Procalcitonina) (Spearman  $r=0.714$ ,  $p=0.014$ ); y las H3cit circulantes correlacionaron sólo con la Protrombina total (Spearman  $r=-0.663$ ,  $p=0.0226$ ). En la 3ª muestra (obtenida durante el 5º día de ingreso en UCI) (Figura 22C) las histonas circulantes correlacionaron con la PCR (Spearman  $r=0.745$ ,  $p=0.017$ ) y con los Leucocitos (Spearman  $r=0.758$ ,  $p=0.015$ ), mientras que la H3cit correlacionó con la Protrombina Total (Spearman  $r=-0.611$ ,  $p=0.049$ ).

Estos pacientes pertenecen al grupo con el fenotipo más severo de la sepsis, el SS, pero que sobrevivieron al choque séptico. Sin embargo, es importante destacar que la sepsis se ha asociado frecuentemente con comorbilidades a largo plazo y, de hecho, un gran porcentaje de supervivientes sépticos presentan un elevado riesgo de muerte durante los dos años siguientes a sufrir el episodio séptico (274,275). Algunas de las correlaciones halladas podrían explicar estos desenlaces.

Entre las correlaciones observadas en los pacientes con SS supervivientes destacaron todos los parámetros relacionados con la coagulación, puesto que se encontraron correlaciones positivas para todos los factores implicados en la coagulación (Protrombina total, DD y APTT) y correlaciones negativas con los factores anticoagulantes (PCA y Prot C funcional). Esto es especialmente interesante porque numerosos autores han relacionado las histonas con coagulopatías, especialmente la histona H3, así como con un incremento del riesgo de muerte (276,277). Además, se observó que la APTT correlacionaba negativamente con la segunda muestra, contribuyendo, probablemente, al desarrollo de DIC (Coagulación Intravascular Diseminada). Algunos autores han asociado el DIC con la sepsis, llegando a afectar al 35% de los

pacientes (278), y esta puede ser la razón de las correlaciones observadas, especialmente porque se ha vinculado con bajos niveles de plaquetas (observamos una correlación negativa con las histonas circulantes), elevados niveles de trombina, así como un estado de hipercoagulación (278,279).

La histona H3cit mostró una correlación con la Protrombina Total que se mantuvo a lo largo del tiempo en UCI de los pacientes, un factor altamente relacionado con la coagulación. Sin embargo, la H3cit no presentó correlaciones significativas con otros factores relacionados con este proceso. Además, se observó una tendencia de correlaciones negativas con los factores indicativos de coagulación y, puesto que se observó que los niveles de H3cit disminuyeron con el paso del tiempo (Figura 20), sospechamos que menores niveles de H3cit se correlacionaron con un estado procoagulante, corroborando nuestra hipótesis de que la citrulinación de las histonas podría tener un papel protector, puesto que su disminución se observó en aquellos pacientes que mostraron un empeoramiento clínico. Además, puesto que los niveles de H3cit disminuyeron en aquellos pacientes con mayores niveles de factores relacionados con la coagulación, pensamos que a pesar de que las “trampas extracelulares” liberadas por diferentes células pueden causar problemas de coagulación, no son las histonas H3cit las que causan el daño (280,281).

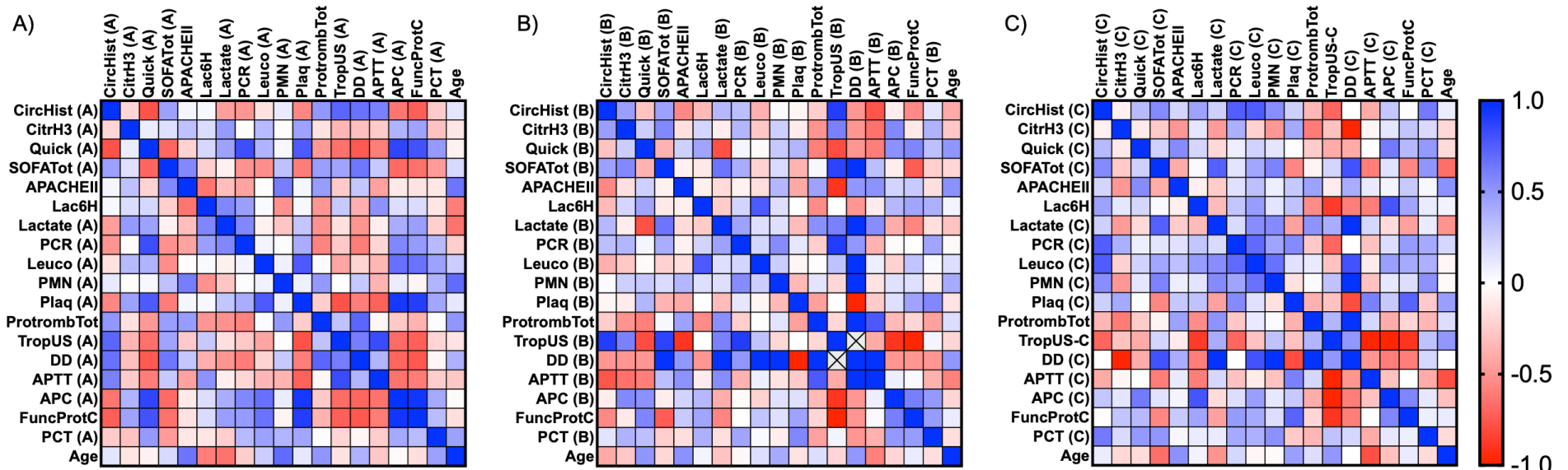


Figura 22. Mapas de calor representando los coeficientes de correlación de Spearman (de -1 a +1) del grupo de supervivientes de SS (n=11) entre las diferentes variables clínicas analizadas. El color rojo indica una correlación negativa y el color azul indica una correlación positiva entre los parámetros comparados. A) 1ª muestra, obtenida durante las primeras 24 horas de la admisión del paciente en la UCI. B) 2ª muestra, obtenida tras 3 días del ingreso en UCI. C) 3ª muestra, obtenida tras 5 días de ingreso en UCI. Abreviaturas: CircHist: Histonas circulantes; H3cit: H3 citrulinada; PCA: Proteína C Activada; SOFA: Evaluación secuencial del Fallo Orgánico (por sus siglas en inglés Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment); APTT: Tiempo de tromboplastina parcial activada; PCR: Proteína C Reactiva; PCT: Procalcitonina; PMNS: Células Polimorfonucleares; Plaqa: Plaquetas; Quick: SOFA rápido; DD: Dímero D; TropUS: Troponina Ultrasensible; FuncProtC: Proteína C Funcional; APACHE II: Sistema de clasificación de fisiología aguda y enfermedades crónicas II; ProtrombTot: Tromboplastina total; Lac6H: Lactato tras 6h en UCI.

### 6.7.3. CORRELACIONES EN LOS PACIENTES NO SUPERVIVIENTES AL SHOCK SÉPTICO

El grupo de pacientes clínicamente más grave estudiado en la presente tesis doctoral estaba formado por aquellos enfermos con diagnóstico de SS que fallecieron (Figura 23; Tablas S8-S10 - Anexos I). Este grupo de pacientes mostró correlaciones en todos los tiempos estudiados. Durante las primeras 24h tras ingresar en la UCI (1ª muestra; Figura 23A) se observó una correlación muy elevada entre las histonas circulantes y la H3cit (Spearman  $r=0.914$ ,  $p=0.000$ ), resultado que sugiere que en estos pacientes se están activando procesos de ETosis, responsables de liberar gran cantidad de H3cit, y otros mecanismos de muerte celular, como la apoptosis (123), autofagia (126) o piroptosis (253), que producen la liberación de gran cantidad de histonas al torrente sanguíneo. Además, observamos correlaciones entre las histonas circulantes y la escala quick SOFA (Spearman  $r=-0.614$ ,  $p=0.005$ ), el Lactato tras 6 horas del ingreso en UCI (Lac6H) (Spearman  $r=0.542$ ,  $p=0.017$ ), el Lactato (Spearman  $r=0.851$ ,  $p=0.000$ ), los Leucocitos (Spearman  $r=0.803$ ,  $p=0.000$ ), los PMN (Células polimorfonucleares) (Spearman  $r=-0.619$ ,  $p=0.005$ ) y la edad (Spearman  $r=-0.865$ ,  $p=0.000$ ). En estas mismas muestras, se encontraron correlaciones entre la H3cit circulante y el quick SOFA (Spearman  $r=-0.489$ ,  $p=0.034$ ), el Lac6H (Spearman  $r=0.473$ ,  $p=0.041$ ), el Lactato (Spearman  $r=0.696$ ,  $p=0.001$ ), los Leucocitos (Spearman  $r=0.629$ ,  $p=0.004$ ), las PMN (Spearman  $r=-0.572$ ,  $p=0.011$ ) y la edad (Spearman  $r=-0.954$ ,  $p=0.000$ ). En la 2ª muestra, tomada a los 3 días de ingreso en la UCI (Figura 23B), las histonas circulantes también correlacionaron con la H3cit (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ), con la TropUS (Spearman  $r=-1$ ,  $p=0.022$ ) y con la Protrombina total (Spearman  $r=1$ ,  $p=0.022$ ). A este mismo tiempo, también se observó una correlación positiva elevada entre la H3cit circulante y los Leucocitos (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ) y correlaciones negativas altas entre la H3cit y la TropUS (Spearman  $r=-1$ ,  $p=0.022$ ), la PCT (Spearman  $r=-0.8$ ,  $p=0.038$ ) y la edad (Spearman  $r=-0.8$ ,  $p=0.038$ ). Finalmente, en la 3ª muestra (Figura 23C), tomada tras 5 días de ingreso en la UCI, las histonas circulantes correlacionaron positivamente con la escala APACHE II (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ), la PCR (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ), los Leucocitos (Spearman  $r=1$ ,  $p=0.001$ ), las Plaquetas (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ), el ATTP (Spearman  $r=1$ ,  $p=0.022$ ), la ProtFuncC (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ) y con la edad (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ); mientras que la H3cit correlacionó positivamente con la escala SOFA Tot (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ), el Lac6H (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ), el Lactato (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ), el APTT (Spearman  $r=1$ ,  $p=0.022$ ), y negativamente con la PCA (Spearman  $r=-0.8$ ,  $p=0.038$ ) y la PCT (Spearman  $r=-0.8$ ,  $p=0.038$ ).

La correlación entre histonas circulantes y H3cit dejó de ser significativa a lo largo de la estancia en UCI del paciente. Esto es interesante porque la H3cit podría ser un potente biomarcador de pronóstico de los pacientes sépticos. Además, cabe destacar que los niveles más elevados de histonas circulantes y H3cit se encontraron en este grupo de pacientes. En este sentido, la literatura ha relacionado elevados niveles de histonas en plasma con la severidad de la sepsis debido a la capacidad que presentan las histonas extracelulares de causar daño celular e inflamación (139,143,282), llevando finalmente al fallo orgánico. Estos resultados están en línea con todos los resultados obtenidos hasta el momento en los experimentos *in vitro* en el presente trabajo, pero también con los resultados observados en muestras de los pacientes con sepsis y SS con distinto pronóstico, puesto que las histonas circulantes mostraron correlaciones positivas con marcadores de daño orgánico y severidad como son el lactato y la escala clínica APACHE II.

Conviene resaltar que en el grupo de pacientes con SS no supervivientes se encontraron numerosas correlaciones entre las histonas circulantes y los factores relacionados con la coagulación, destacando que la desregulación y la disfunción endotelial juegan un papel fundamental en este ámbito. Nuestro grupo describió previamente cómo las histonas causan disfunción endotelial a través de mecanismos de apoptosis (123), autofagia (126) y, más recientemente, piroptosis (253), contribuyendo a procesos inflamatorios y de muerte endotelial (128). Además, algunos autores han relacionado los eventos de NETosis con la aparición de trombos (283), lo cual concuerda con las correlaciones encontradas, así como con los elevados niveles de H3cit hallados en este grupo de pacientes. Sin embargo, la H3cit no correlacionó con marcadores de coagulación sugiriendo que el factor inductor de coagulopatías durante los procesos de ETosis estaría causado por otras proteínas diferentes a la H3cit. A pesar de que se ha descrito que las propias redes causadas por los procesos de ETosis pueden servir como andamio para que se produzcan los trombos durante la coagulación (284). Proteínas como las PAD, necesarias para que se inicien los procesos de ETosis, también han sido descritas como causantes de fenómenos trombóticos (285–291). Además, nuestros resultados *in vitro* demostraron que la citrulinación de las histonas posee un papel protector, especialmente en comparación con las histonas nativas, por lo que todo parece indicar que las histonas H3cit liberadas durante los procesos de ETosis no serían las causantes de eventos relacionados con la coagulación.

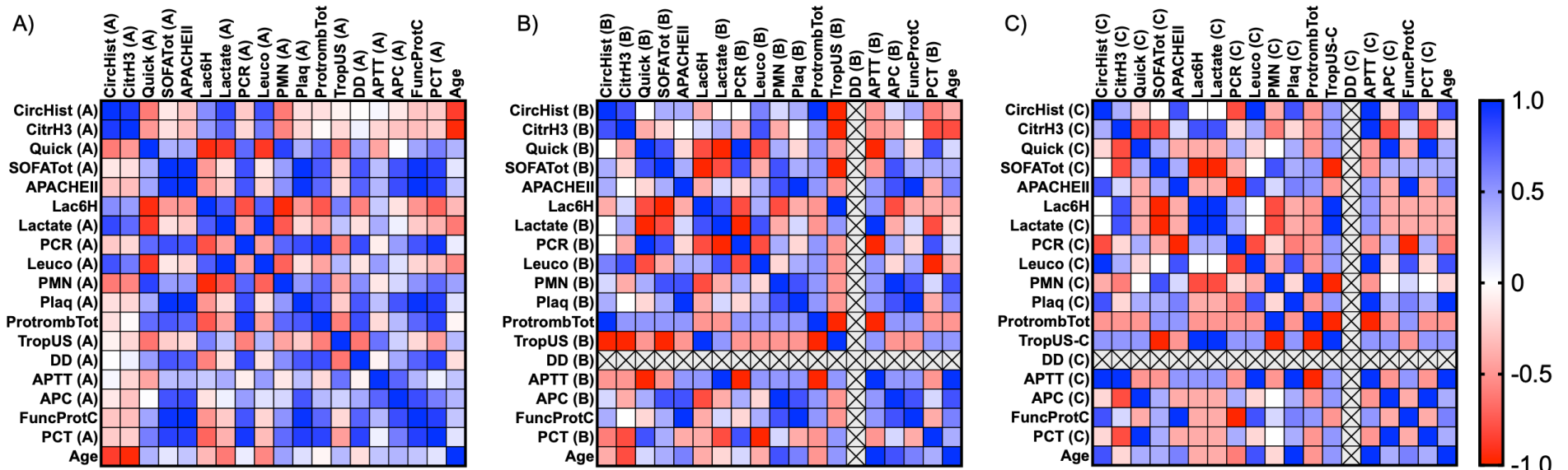


Figura 23. Mapas de calor representando los coeficientes de correlación de Spearman (de -1 a +1) del grupo de SS fallecidos (n=4) entre las diferentes variables clínicas analizadas. El color rojo indica una correlación negativa y el color azul indica una correlación positiva entre los parámetros comparados. A) 1ª muestra, obtenida durante las primeras 24 horas de la admisión del paciente en la UCI. B) 2ª muestra, obtenida tras 3 días del ingreso en UCI. C) 3ª muestra, obtenida tras 5 días de ingreso en UCI. Abreviaturas: CircHist: Histonas circulantes; H3cit: H3 citrulinada; PCA: Proteína C Activada; SOFA: Evaluación secuencial del Fallo Orgánico (por sus siglas en inglés Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment); APTT: Tiempo de tromboplastina parcial activada; PCR: Proteína C Reactiva; PCT: Procalcitonina; PMNS: Células Polimorfonucleares; Plaqa: Plaquetas; Quick: SOFA rápido; DD: Dímero D; TropUS: Troponina Ultrasensible; FuncProtC: Proteína C Funcional; APACHE II: Sistema de clasificación de fisiología aguda y enfermedades crónicas II; ProtrombTot: Tromboplastina total; Lac6H: Lactato tras 6h en UCI.

Es interesante resaltar que las histonas circulantes y las H3cit, en el grupo de pacientes de SS no supervivientes, presentaron una correlación negativa con los PMN, grupo celular que engloba a los neutrófilos y mastocitos entre otros, por ser células polimorfonucleares. Algunos de los tipos celulares englobados en los PMN pueden sufrir ETosis (257), y debido a que los mayores niveles de H3cit se encontraron en este grupo de pacientes, concretamente en la primera muestra tomada, la correlación negativa podría deberse a una disminución de estos tipos celulares en el plasma de los pacientes sépticos, como consecuencia del aumento de los eventos de ETosis que producen la rotura celular. Esto concuerda, además, con una mayor activación del sistema inmunitario innato durante el inicio de la enfermedad (57). Así pues, las correlaciones obtenidas en los pacientes sépticos supervivientes también correlacionaron las histonas, los leucocitos y los PMN, siendo en todos los casos correlaciones positivas. En consonancia con lo que acabamos de describir y teniendo en cuenta que la ETosis se activa especialmente cuando el sistema inmunitario necesita actuar de manera más potente contra un patógeno, y que los menores niveles de H3cit se encontraron en el grupo de pacientes sépticos supervivientes, proponemos que estos pacientes están activando en mucha menor medida los mecanismos de ETosis para contrarrestar la infección, lo que indicaría que los pacientes con peor evolución clínica podrían tener en los primeros momentos de la infección una respuesta inmunitaria exacerbada y descontrolada (292).





### 6.8. DIFERENCIAS EN LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES SÉPTICOS Y LOS SUBTIPOS CLÍNICOS ECC Y PICS.

Los pacientes con sepsis, especialmente los mayores de 65 años pueden evolucionar a diferentes subtipos clínicos, incluyendo Enfermos Críticos Crónicos (ECC) y pacientes con Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión (PICS). Recordemos que un paciente se clasifica como sepsis, de acuerdo a los criterios del Consenso Sepsis-3, cuando cumple al menos dos de las siguientes características: presentar una temperatura superior a 38°C o inferior a 36°C, una presión arterial sistólica  $\leq 100$  mmHg y un recuento leucocitario superior a 12.000/mm<sup>3</sup> o inferior a 4.000/mm<sup>3</sup> (1). Los pacientes con sepsis que permanecen durante 7 días en la UCI, con disfunción orgánica, y requieren ventilación mecánica son clasificados como ECC (79). Finalmente, siguiendo los criterios establecidos por Gentile *et al* (84), los pacientes con ECC que permanecen 14 días o más ingresados en la UCI, y cumplen los siguientes parámetros: pérdida de peso (más de un 10% durante el tiempo de ingreso), pérdida de masa muscular por debajo de 18, albúmina por debajo de 3mg/dL, prealbúmina por debajo de 10mg/dL, proteína C reactiva (PCR) superior a 1,5mg/L, y un recuento de linfocitos total inferior a 800/mm<sup>3</sup> (84); serían clasificados clínicamente como pacientes con PICS (Figura 4 en la introducción y 13 en material y métodos).

Los pacientes clasificados como sepsis, ECC y PICS que seguidamente presentamos (ver tabla 13) pertenecieron a una cohorte independiente de los analizados en los apartados anteriores (Figura 11 en material y métodos). Esta cohorte (ver descripción en detalle en el apartado 5.10 de material y métodos) estaba compuesta por 42 pacientes pertenecientes a los siguientes fenotipos clínicos: 21 pacientes sépticos, 10 pacientes con ECC y 11 pacientes con PICS (Figura 11). Estos pacientes se emplearon para analizar los cambios de expresión de los miRNAs y el perfil de metilación del DNA de los leucocitos, con el fin de obtener patrones diferenciales de expresión que permitan identificar las alteraciones del metabolismo (catabolismo) o del sistema inmunitario (inflamación persistente e inmunosupresión) que caracterizan a los pacientes con ECC y, esencialmente, con PICS (Figura 13).

La media de estancia en UCI fue mayor en el fenotipo PICS vs séptico no complicado: 22.2±7.8 vs 3.3±1.6 días ( $p < 0.0001$ ). Así mismo, el fallo orgánico de los pacientes, y por lo tanto la severidad, también fue significativamente superior en los pacientes con PICS vs séptico no complicado; puntuación SOFA: 11.8 ± 4.6 vs 6.9 ± 3.2 ( $p < 0.0001$ ).

**Tabla 13. Datos clínicos de los pacientes de UCI con Sepsis, Enfermos críticos crónicos (ECC) y con Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión (PICS).** Se presentan los datos tomados durante el día de ingreso en UCI y tras 14 días, momento en que un paciente puede ser caracterizado como PICS. Para más información puede consultarse la Tabla Suplementaria 1 en la sección de Anexos I.

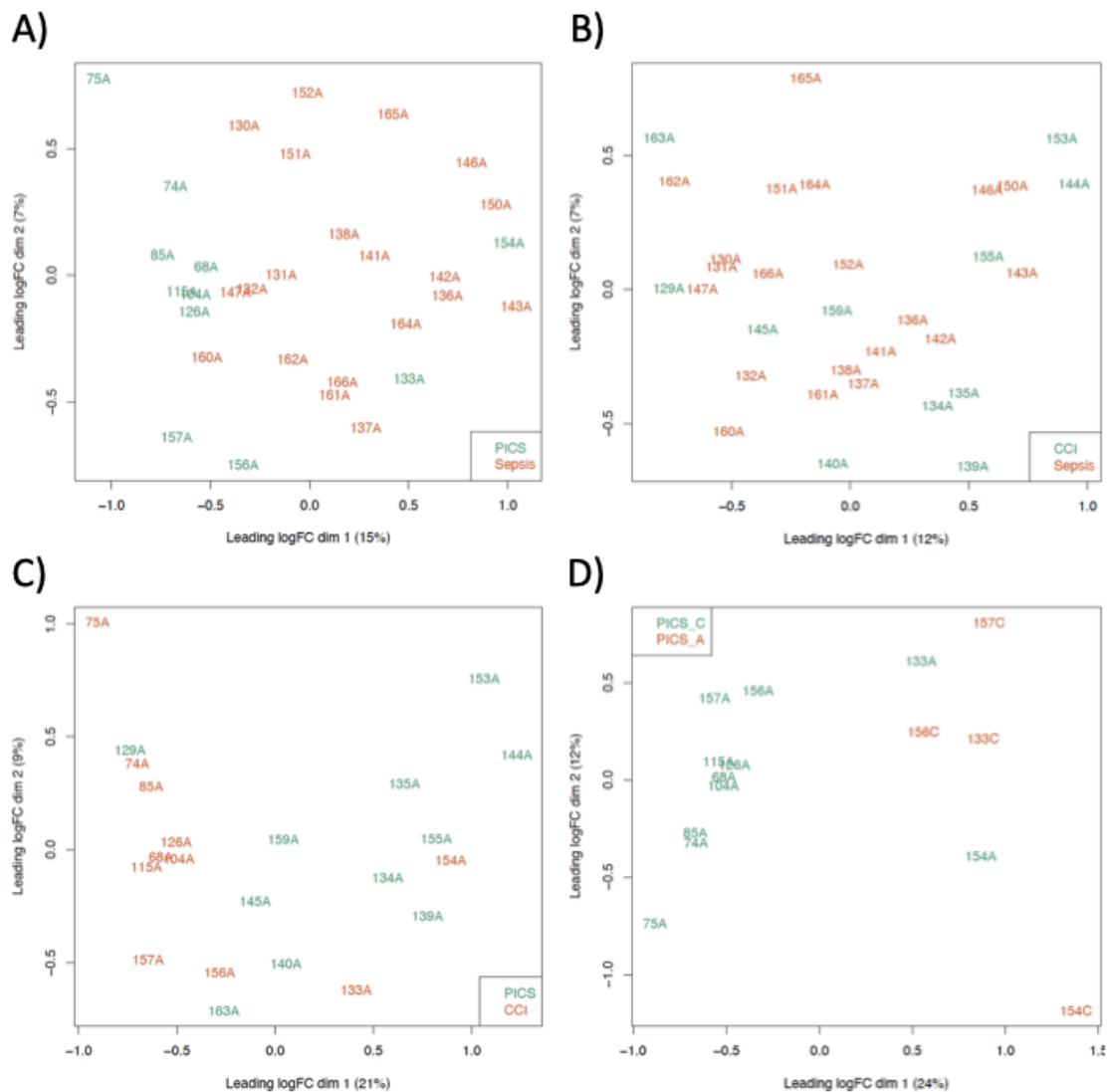
	Sepsis n=23	ECC n=10	PICS n=11	p-valor
<b>Días UCI</b> (media ± SD)	3.3 ± 1.6	8.8 ± 1.5	22.2 ± 7.8	< 0.0001
<b>SOFA</b> (media ± SD)	6.9 ± 3.2	8.8 ± 4	11.8 ± 4.6	< 0.0001
<b>PCR &gt; 15 (d0)</b> (media ± SD)	262.9 ± 139.3	98.5 ± 78.8	56.7 ± 46.6	< 0.0001
<b>Linfocitos &lt; 800 (d0)</b> (media ± SD)	742.2 ± 43.8	1263.8 ± 986.8	715.5 ± 365.6	ns
<b>Albúmina &lt; 3 (d0)</b> (media ± SD)	2.8 ± 0.4	2.4 ± 0.4	2.7 ± 0.5	ns
<b>PCR &gt; 15 (d14)</b> (media ± SD)	32.4 ± 25.1	100.3 ± 124.6	74.6 ± 66.4	ns
<b>Linfocitos &lt; 800 (d14)</b> (media ± SD)	1562.2 ± 971.3	1981.3 ± 1440.9	625.7 ± 344.6	0.0071
<b>Albúmina &lt; 3 (d14)</b> (media ± SD)	3.2 ± 1.7	1.3 ± 0.9	2.8 ± 0.3	0.0010

### 6.9. LOS PACIENTES SÉPTICOS, CON ECC Y PICS PRESENTAN DIFERENTES PATRONES DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS

Conocer qué cambios se dan en relación con la expresión de los miRNAs y en los patrones de metilación de estos pacientes, especialmente a tiempos iniciales, podría ayudarnos a establecer protocolos de seguimiento adecuados para estos pacientes, con el fin de disminuir la elevada mortalidad y mejorar la calidad de vida de los pacientes sépticos que sobreviven a una sepsis.

El análisis del miRNoma circulante se analizó en muestras de pacientes ingresados en la UCI, categorizados como pacientes con sepsis, ECC y PICS. Las muestras empleadas para el análisis de los patrones de miRNAs fueron: 21 muestras de pacientes con sepsis, 10 muestras de pacientes con ECC y 11 muestras de pacientes con PICS, todas ellas obtenidas durante el primer día de ingreso en la UCI. Además, 4 de los pacientes con PICS analizados a tiempos iniciales, se analizaron también tras 14 días de ingreso en UCI (4 muestras de PICS obtenidas tras 14 días de ingreso en UCI), con el fin de monitorizar los cambios de expresión de los miRNAs.

Tras procesar los datos, normalizarlos, filtrarlos y eliminar los *outliers*, se anotaron las lecturas de los miRNAs incluidos en la base de datos miRbase. Todos los miRNAs que no presentaron al menos 16 cuentas por millón en, al menos, el 20% de las muestras del grupo de menor tamaño muestral fueron eliminados, obteniéndose 196 miRNAs significativos para continuar con el estudio. Al representar los datos en los gráficos MDS (de ordenamiento multidimensional) normalizados (Figura 24), se observó que la distribución de los puntos agrupa los pacientes de PICS y a los de Sepsis (Figura 24A), con la excepción de los casos 133 y 154. Así mismo, también se observó una agrupación de las muestras correspondientes a los pacientes con PICS y ECC en la comparación de estos dos grupos (Figura 24C), con la excepción de estos mismos pacientes (133 y 154). Esto podría indicar que estos pacientes inicialmente sufren una menor alteración en los patrones de expresión de los miRNAs circulantes, en comparación con los otros pacientes de PICS. Así mismo, cuando se comparan las muestras de PICS obtenidas a diferentes tiempos (Figura 24D), sí observamos una buena agrupación, aunque los pacientes 133 y 154, a tiempos iniciales, parecen no estar tan separados como los demás. Los gráficos MDS normalizados de los pacientes con ECC vs Sepsis, no separaron los grupos entre sí (Figura 24B).



**Figura 24. Gráficos MDS: comparaciones entre grupos.** A) Comparación PICS (verde) vs Sepsis (naranja). B) Comparación EEC (verde) vs Sepsis (naranja). C) Comparación PICS (verde) vs ECC (naranja). D) Comparación PICS tiempo C (naranja), es decir, muestras tomadas tras 14 días de ingreso en UCI, vs PICS tiempo A (verde), es decir, muestras tomadas durante las primeras 24h de ingreso del paciente en UCI. Abreviaturas: CCI es el equivalente a ECC: Enfermedad Crónica Crónica; PICS: Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión.

A continuación, se realizó el análisis bioinformático edgeR para obtener la expresión diferencial de cada miRNA. En este punto, cabe destacar que, para establecer el corte de significancia establecido, se consideraron los valores de FDR (*false discovery rate*) menores a 0.1, lo que implicó un 90% de confianza y un 10% de error asumido. En la Tabla 14 se describen el número de miRNAs significativos en cada caso, siendo la comparación a lo largo del tiempo del grupo de PICS la que más miRNAs significativos mostró ([https://n9.cl/anexosphd\\_rov](https://n9.cl/anexosphd_rov)).

Tabla 14. Número de miRNAs significativos con  $FDR < 0,1$  en el test bioinformático edgeR.

Comparación	Nº miRNAs significativos
ECC (n=12) vs Sepsis (n=21)	5
PICS (n=15) vs Sepsis (n=21)	7
PICS (n=15) vs ECC (n=10)	5
PICS C (n=4) vs PICS A (n=11)	40

### 6.9.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL Y CONTEXTUALIZACIÓN BIOLÓGICA ENTRE ECC Y SEPSIS

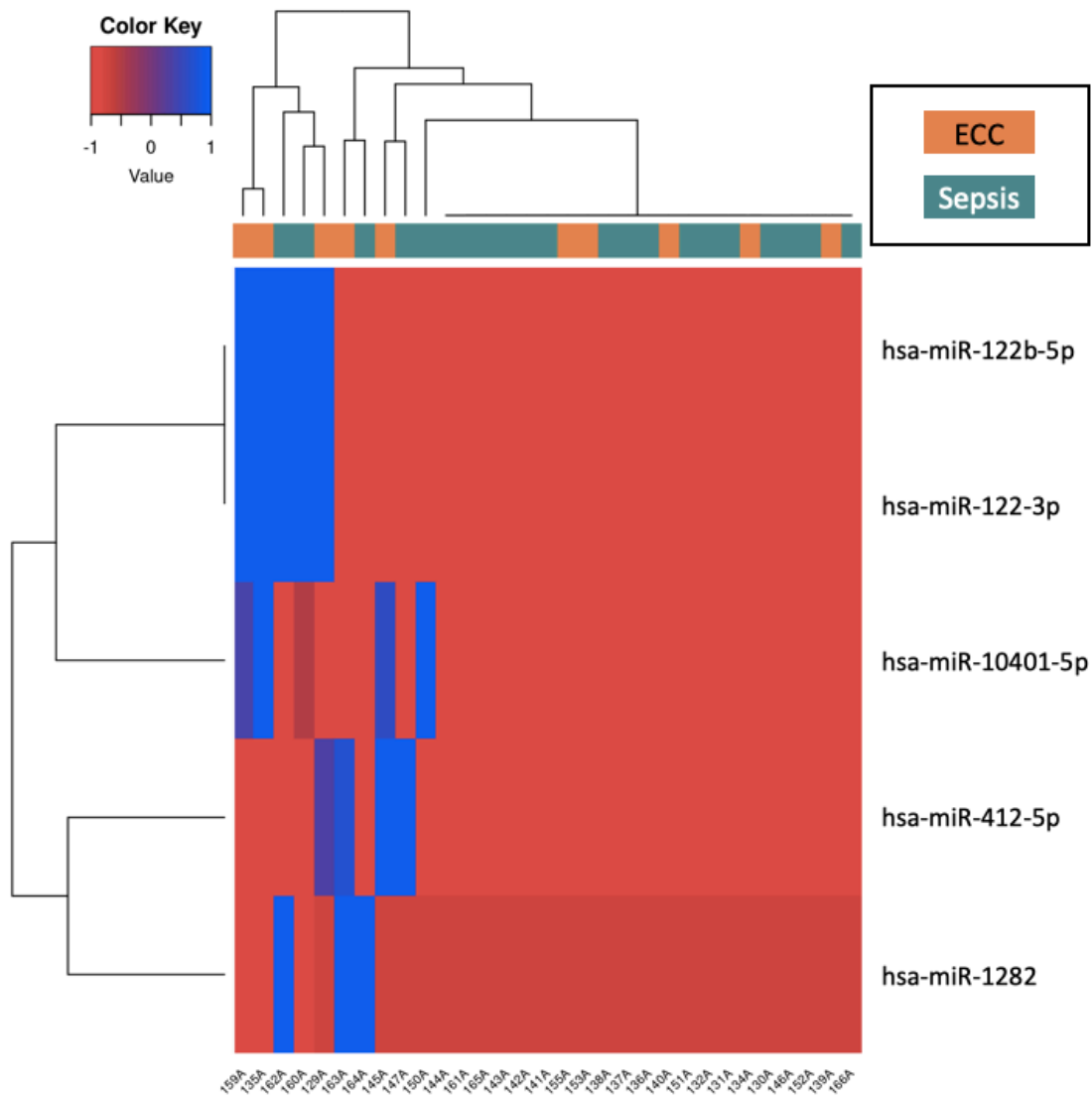
#### 6.9.1.1. DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN DE MIRNAS ENTRE ECC Y SEPSIS

Al realizar la comparación entre los grupos de pacientes con ECC (pacientes sépticos ingresados al menos 7 días en UCI y con necesidad de ventilación mecánica (79)) y pacientes con sepsis sin complicaciones, se encontraron 5 miRNAs regulados diferencialmente y de manera significativa con un  $FDR < 0,1$ . Las muestras comparadas fueron obtenidas durante las primeras 24h de ingreso en UCI (ver Figura 11 en material y métodos). En la siguiente tabla (Tabla 15) se muestran los miRNAs hallados, cuyos valores positivos para  $\log FC$  indican que están sobreexpresados en los casos de ECC respecto a los pacientes de sepsis.

Tabla 15. miRNAs expresados diferencialmente de manera significativa ( $FDR < 0,1$ ) en la comparativa ECC vs Sepsis.

miRNA	$\log FC$	FDR	p-valor
hsa-miR-412-5p	3,614888	0,006606	2,71E-05
hsa-miR-1282	4,912874	0,012821	0,000111
hsa-miR-122-3p	4,121043	0,012821	0,00021
hsa-miR-122b-5p	4,121043	0,012821	0,00021
hsa-miR-10401-5p	4,704065	0,069619	0,001427

Al representar los diferentes miRNAs con expresión diferencial significativa obtenidos en esta comparación en forma de mapa de calor (Figura 25), se observa que en estos miRNAs no se produjo una separación clara entre los dos grupos comparados, puesto que la jerarquización de la parte superior no es capaz de agrupar a los pacientes según sean Sepsis o ECC.



**Figura 25.** Mapa de calor de la comparación de pacientes ECC vs Sepsis. Los miRNAs mostrados son los mismos que se presentan en la tabla 15. El color rojo indica una correlación negativa entre ambos grupos comparados, mientras que el color azul muestra una correlación positiva.

Entre los miRNAs obtenidos en la comparación de los pacientes con ECC y los pacientes con Sepsis se encontró el miR-122-5p, el cual ha sido previamente descrito en la sepsis por ser capaz de regular la coagulación y la inflamación (293), problemas que pueden verse agudizados por la ETosis activada en estos pacientes, y por la liberación de histonas. De hecho, algunos autores como Wang *et al.*, describieron que este miRNA presenta bajos niveles de expresión en aquellos pacientes sépticos clasificados con DIC, además es capaz de regular a la baja los niveles de IL-6 e IL-1 $\beta$ , controlando así la inflamación sistémica (293).

Otro miRNA encontrado es el miR-1282, el cual se ha descrito como posible biomarcador para monitorizar la evolución de pacientes con SIRS (294). Sin embargo, el miR-10401-5p no se ha

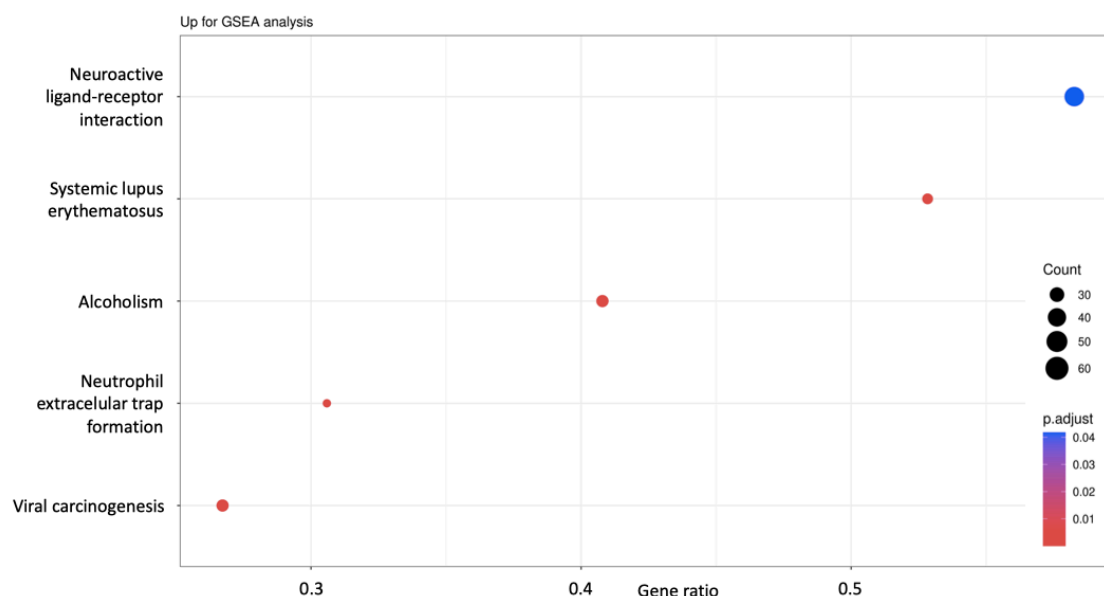
relacionado hasta el momento con pacientes con Sepsis o con enfermedad crítica crónica, al igual que el miR-412-5p, que aunque no se ha relacionado directamente con sepsis, se ha visto en muestras de plasma en pacientes con infección por SARS-CoV-2 (295).

#### 6.9.1.2. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL CON LOS MIRNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ENTRE ECC Y SEPSIS

Para los miRNAs expresados de manera diferencial se buscaron los genes diana en la base de datos miRTarBase, realizando dos análisis de enriquecimiento para obtener las rutas KEGG y los términos GO enriquecidos a partir del listado obtenido de miRNAs con expresión diferencial. El p-valor ajustado aplicado fue de 0,1.

Al comparar entre los pacientes con ECC y Sepsis, no se obtuvieron rutas KEGG ni términos GO con los miRNAs significativos obtenidos con el análisis ORA. No obstante, cuando se realizó un análisis más amplio, empleando un análisis bioestadístico basado en GSEA, que es menos restrictivo, sí se encontraron rutas KEGG y términos GO (Figuras 26 y 27, respectivamente).

En el análisis de enriquecimiento mediante GSEA mostrado en la Figura 26, cabe destacar la identificación de la ruta KEGG relacionada con la formación de NETs.



**Figura 26. Principales términos KEGG obtenidos del análisis GSEA.** Gene ratio: número de genes diana para los miRNA significativos obtenidos, respecto al número total de genes que conforman el término en cuestión. Count: número de genes de cada término. p.adjust: p-valor ajustado del test realizado en ORA.

La Figura 27 muestra la sobreexpresión de los miRNAs implicados en la señalización celular, tanto a nivel transmembrana como a nivel de receptores celulares. Además, también se ven

mecanismos relacionados con la matriz extracelular, lo cual puede estar relacionado con el glicocalix, el cual también se ha descrito alterado en la sepsis (296,297), así como mecanismos relacionados con la formación y organización de los nucleosomas.

Los receptores celulares inmunitarios son los encargados de reconocer los PAMPs y los DAMPs que inician la respuesta celular e inmunitaria contra los procesos de infección, por lo que una alteración de los receptores puede resultar muy problemática a la hora de defender al organismo frente a un agente patógeno durante una infección (298). Es ampliamente conocido que la activación de receptores Toll-Like (TLRs) induce la expresión de ciertos miRNAs y regula a través de ellos distintas respuestas celulares (299). Sin embargo, un hallazgo reciente ha mostrado que los miRNAs pueden actuar a nivel de los TLRs, no solo mediante la regulación de la expresión de los propios TLRs sino también interaccionando como ligandos directamente con estos receptores, iniciando una cascada de señalización que controla la respuesta inmunitaria (300–302). En este sentido, una sobreexpresión de los miRNAs capaces de controlar la activación de los TLRs, podría causar una reducción de la respuesta celular contra la infección, contribuyendo a su propagación y comprometiendo la evolución clínica de los pacientes (300).

En cuanto a la matriz extracelular, se sabe que los monocitos y los macrófagos son capaces de unirse a la matriz extracelular a través de las integrinas expresadas en su superficie celular, y migrar hasta los sitios de infección. Para ello, se ha visto que el glicocáliz de las células endoteliales juega un papel importante en la regulación del movimiento de las células inmunitarias sobre la superficie de las células endoteliales (procesos de contacto, rodamiento, adhesión y migración) (296). La alteración de los receptores que permiten el desarrollo de la respuesta inmunitaria, así como de la membrana plasmática y su relación con la migración y el rodamiento de las células inmunitarias hasta los sitios de infección, puede ser una de las alteraciones clave que contribuyen al mal pronóstico de los pacientes sépticos.

La formación y organización de los nucleosomas, formados por distintas isoformas de histonas, también es otro de los mecanismos que se han identificado alterados como consecuencia de la expresión diferencial de los miRNAs en esta comparativa de pacientes. Este hecho es interesante porque los nucleosomas circulantes se han descrito como predictores de la progresión de la sepsis, por su relación directa con la disfunción orgánica en los pacientes críticos y la inflamación sistémica (303,304).



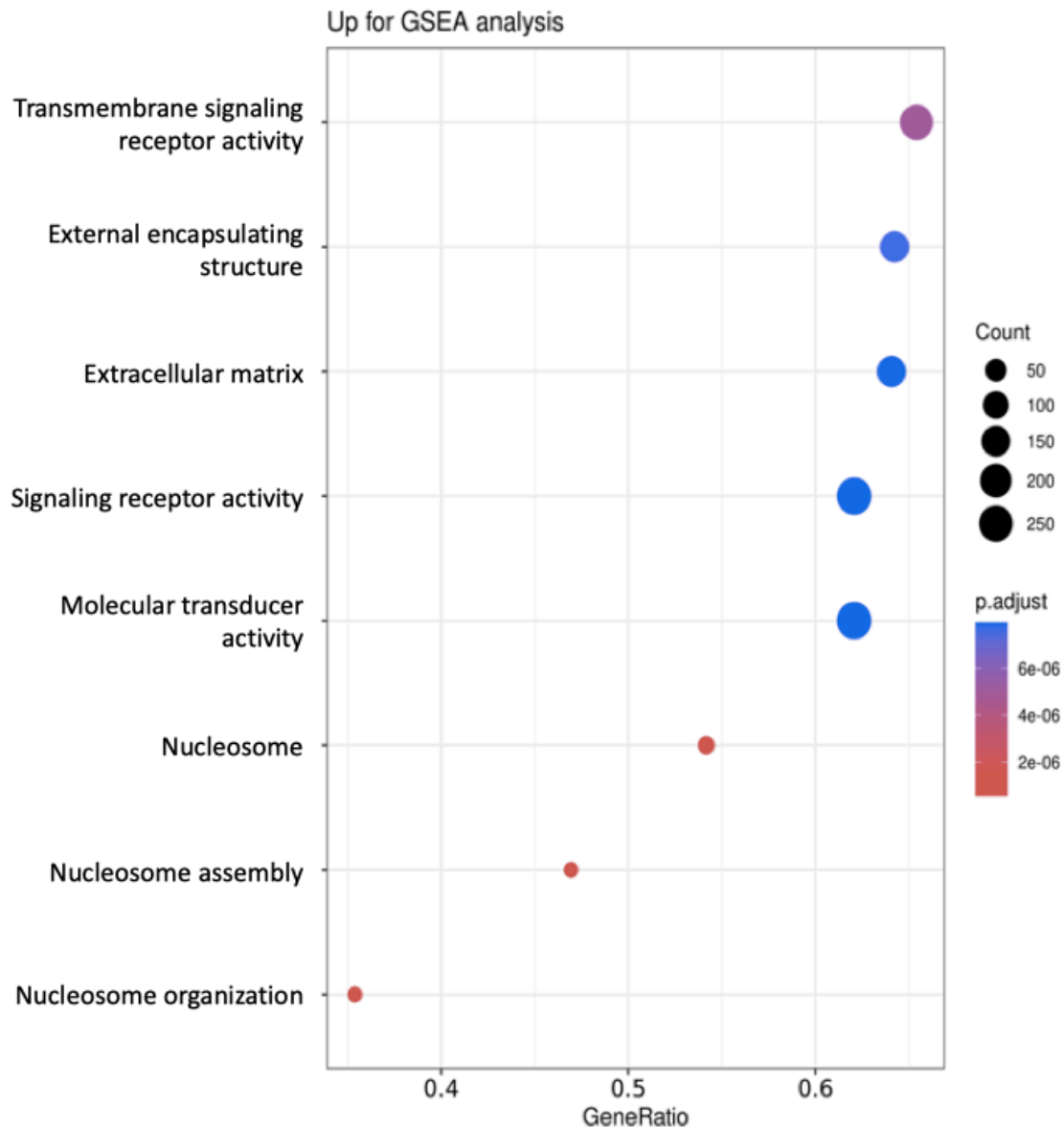


Figura 27. Principales términos GO obtenidos del análisis GSEA. Gene ratio: número de genes diana para los miRNA significativos obtenidos, respecto al número total de genes que conforman el término en cuestión. Count: número de genes de cada término. p.adjust: p-valor ajustado del test realizado en ORA.

#### 6.9.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL Y CONTEXTUALIZACIÓN BIOLÓGICA ENTRE PICS Y SEPSIS

##### 6.9.2.1. DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN DE MIRNAS ENTRE PICS Y SEPSIS

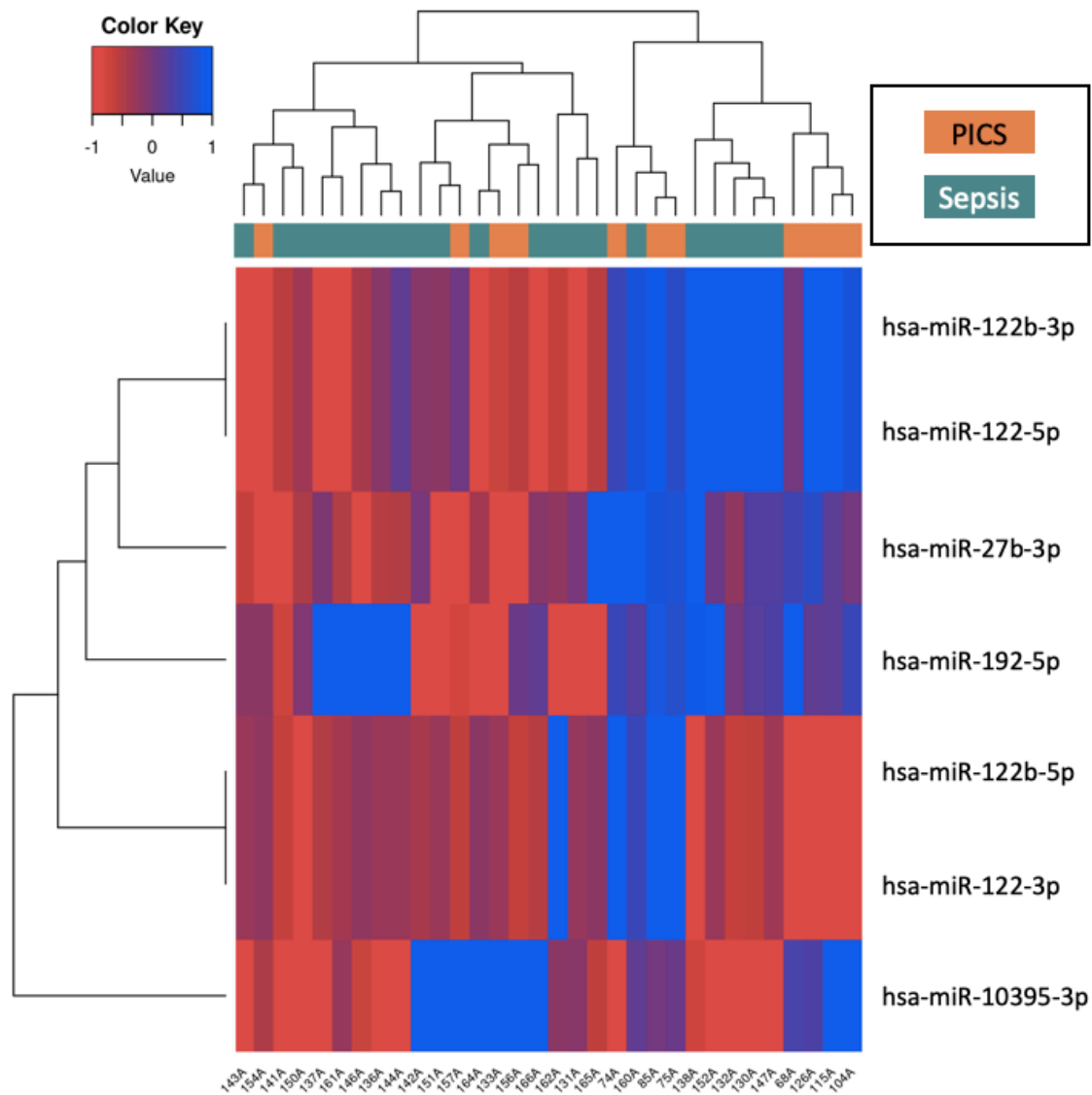
Al realizar la comparación de muestras obtenidas durante las primeras 24h de ingreso en UCI entre el grupo de pacientes con PICS (pacientes con sepsis ingresados al menos 14 días en UCI y que cumplen características inmunitarias y metabólicas concretas (84)) vs los pacientes con Sepsis sin complicaciones (ver figura 13), se encontraron 7 miRNAs expresados diferencialmente y de manera significativa, con un  $FDR < 0,1$ . Los valores obtenidos para el  $\log_{2}FC$  fueron positivos,

significando una sobreexpresión de estos miRNAs en los pacientes con PICS en comparación con los pacientes de sepsis sin complicaciones a lo largo de su estancia en UCI (Tabla 16).

**Tabla 16. miRNAs expresados diferencialmente de manera significativa (FDR<0,1) en la comparativa PICS vs Sepsis.**

<b>miRNA</b>	<b>logFC</b>	<b>FDR</b>	<b>p-valor</b>
hsa-miR-27b-3p	1,780179	0,03079	0,000265
hsa-miR-122-5p	2,975578	0,03079	0,000435
hsa-miR-122b-3p	2,975578	0,03079	0,000435
hsa-miR-122-3p	3,677281	0,03079	0,000631
hsa-miR-122b-5p	3,677281	0,03079	0,000631
hsa-miR-10395-3p	3,613926	0,08064	0,001983
hsa-miR-192-5p	1,430825	0,094431	0,002709

Al representar los diferentes miRNAs con expresión diferencial obtenidos en esta comparación en forma de mapa de calor (Figura 28), observamos que había miRNAs que correlacionaban de forma positiva (color azul) entre los casos (pacientes con PICS) y el grupo de referencia (pacientes con sepsis). Por el contrario, otros miRNAs correlacionaban negativamente (color rojo) en los casos en comparación con el grupo de referencia. Además, en la Figura 28 también podemos observar que la jerarquización superior permitió discernir dos grupos, clasificando la mayoría de los pacientes de PICS a la derecha de la figura, mientras que la mayoría de los pacientes sépticos se encontraban distribuidos en la parte izquierda del mapa de jerarquización.



**Figura 28.** Mapa de calor de la comparación PICS vs Sepsis. Los miRNAs mostrados son los mismos que se presentan en la tabla 16. El color rojo indica una correlación negativa entre ambos grupos comparados, mientras que el color azul muestra una correlación positiva.

En este análisis de expresión diferencial, en el que se comparó los pacientes de PICS con los pacientes de Sepsis, se obtuvieron 7 miRNAs con expresión diferencial, implicados en rutas moleculares relevantes (Tabla 16), entre los que se incluyen varias isoformas del miR-122, obtenido también previamente en la comparación de pacientes con ECC vs Sepsis. Recordemos que la literatura lo propone como un miRNA con capacidad de estratificar los pacientes con sepsis con peor riesgo evolutivo, además se han relacionado elevados niveles del miR-122 con una mortalidad temprana de los pacientes (201,293,305–307). Puesto que nuestros resultados mostraron elevados niveles de este miRNA, tanto en los pacientes con ECC como en los pacientes con PICS, en la muestra de plasma tomada durante las primeras 24h tras el ingreso en UCI, y se ha establecido que ambos grupos de pacientes presentan una mortalidad a corto plazo elevada

(308), podría contribuir al seguimiento clínico de estos pacientes y monitorizar una mayor probabilidad de complicaciones clínicas como el ECC o PICS.

El miR-10395-3p también se ha encontrado sobreexpresado en la cohorte de pacientes con PICS en comparación con los pacientes sépticos no complicados. Actualmente no hay mucha información sobre este miRNA, aunque se han observado niveles elevados de este miRNA en aquellos pacientes con mayor puntuación SOFA (309). De hecho, en la cohorte de pacientes empleada para este trabajo se observó que los pacientes con PICS, con mayor expresión de este miRNA, presentaban un 25% más de puntuación SOFA que los pacientes con sepsis (Tabla 13), validando los resultados obtenidos por Meidert *et al* (309).

Se ha descrito que el miRNA-27b-3p es capaz de regular la “Jumonji domain-containing protein D3” (JMJD3) que es una demetilasa 6B específica de lisina (KDM6B), y la citoquina NF- $\kappa$ B a nivel de promotor, reduciendo su expresión. Además, es importante destacar que el gen *JMJD* es un importante regulador epigenético perteneciente a la familia de las histona demetilinas de la Lys27 en la histona H3, que participa en la diferenciación de los monocitos a macrófagos M2 (215). Los macrófagos M2 son esenciales en la liberación de mediadores implicados en la atenuación de la respuesta inflamatoria y en la reparación de los tejidos dañados (310). Por lo tanto, el haber encontrado sobreexpresado el miR-27b en los pacientes de PICS podría explicar la desregulación en la respuesta inflamatoria y la limitación en estos pacientes para poder reparar los tejidos dañados durante la fase hiperinflamatoria.

Finalmente, el miR-192-5p ha sido relacionado con daño cardíaco, siendo relacionado con el pronóstico de diferentes enfermedades (311) pero no de manera específica en la sepsis.

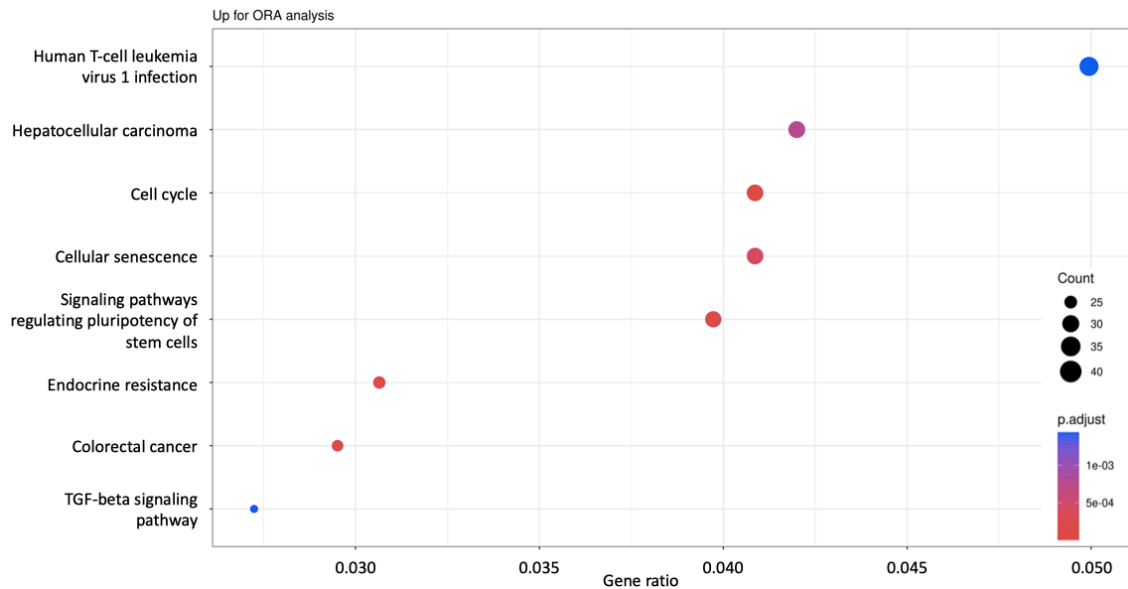
Estos resultados sugieren que incluir el miR-10395-3p junto al miR-122 en una firma de miRNAs podría ayudar al diagnóstico diferencial de los pacientes que tendrán una peor evolución, e incluso identificar en el momento del ingreso los pacientes que desarrollarán PICS. Además, incluir en esta firma de miRNAs el miR-27b, podría ayudar a discernir si los pacientes que desarrollen PICS sufrirán una inmunosupresión a largo plazo.

#### 6.9.2.2. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL CON LOS MIRNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ENTRE PICS Y SEPSIS.

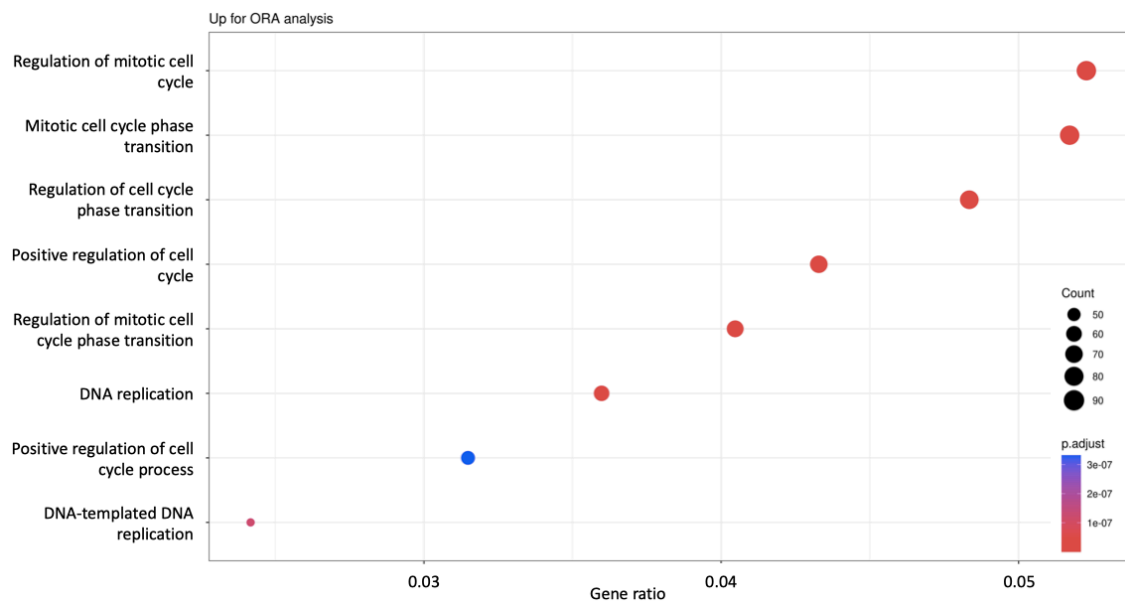
Con los miRNAs expresados diferencialmente de manera significativa, se buscaron los genes diana en la base de datos miRTarBase, realizando dos análisis de enriquecimiento para obtener las rutas KEGG y los términos GO enriquecidos. El p-valor ajustado aplicado fue de 0,1.

En las Figuras 29 y 30 se observan los principales términos KEGG y GO, respectivamente, obtenidos a partir del análisis ORA. Se identifican algunos miRNAs relacionados con la función del ciclo celular, la senescencia celular y la vía de señalización del TGF- $\beta$ , factores que previamente se han relacionado con la sepsis. Yang Q-h *et al.*, describieron en un modelo de ratones que, al inducirles sepsis mediante CLP, aparecía daño renal, un daño común asociado a la sepsis, y este daño se asoció con la detención del ciclo celular en fase G1, a través del aumento de p53 y p21. Sin embargo, observaron que tras 48h de la CLP, la función renal se recuperaba y esto se relacionó con la progresión del ciclo celular (312). Esto podría indicar que los pacientes que padecen un daño renal asociado a la sepsis tendrán un desarrollo más complicado de la enfermedad por frenar el ciclo celular durante un periodo de tiempo. Curiosamente, se ha descrito que la mitocondria también está relacionada con la regulación del ciclo celular y que actúa induciendo la detención del ciclo celular como mecanismo protector (313). Además, se sabe que durante las diferentes fases de la mitosis (otra de las rutas que aparecen relacionadas con los miRNAs descritos en esta comparación (Figura 30)) la célula tiene puntos de control específicos para cerciorarse de que es capaz de proceder a la siguiente fase. El punto de control G1-S parece ser importante desde el punto de vista energético, puesto que es la etapa en que las mitocondrias se unen para aportar la energía que la célula necesita para la replicación del DNA durante la fase G2 (314,315).

Otra de las rutas sobreexpresada entre las rutas KEGG encontradas (Figura 29) fue la senescencia celular. Esta ruta ha sido relacionada con el SS. Tanto la senescencia tanto celular como la de los orgánulos celulares, especialmente de la mitocondria, pueden causar un aumento de especies reactivas de oxígeno mucho mayor en pacientes con edad avanzada del que se daría en pacientes jóvenes, contribuyendo a un desarrollo más acelerado de la enfermedad (316). Hay que resaltar que la hiperinflamación crónica, una característica de los pacientes PICS, está estrechamente relacionada con la senescencia celular en todos los tejidos (317) y que por lo tanto la desregulación de esta ruta de senescencia celular puede estar relacionada con los pacientes con PICS. Por otro lado, el TGF- $\beta$  es una citoquina cuyo papel se ha relacionado con la cicatrización de las heridas, la angiogénesis y la inmunoregulación (318). De hecho, se ha relacionado con la modulación negativa de la respuesta mediada por las células T en sepsis (319).



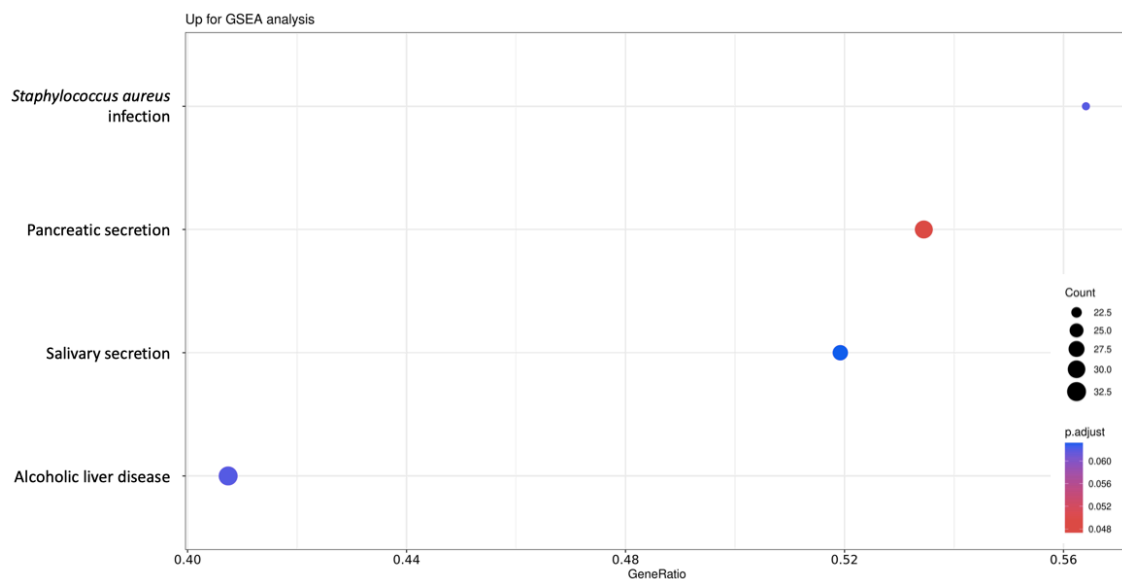
**Figura 29. Principales términos KEGG obtenidos del análisis ORA.** Gene ratio: número de genes diana para los miRNA significativos obtenidos, respecto al número total de genes que conforman el término en cuestión. Count: número de genes de cada término. p.adjust: p-valor ajustado del test realizado en ORA.



**Figura 30. Principales términos GO obtenidos del análisis ORA.** Gene ratio: número de genes diana para los miRNA significativos obtenidos, respecto al número total de genes que conforman el término en cuestión. Count: número de genes de cada término. p.adjust: p-valor ajustado del test realizado en ORA.

En la Figura 31, se describen los principales términos KEGG obtenidos del análisis GSEA, la única ruta directamente relacionada con la sepsis fue la ruta que conlleva la alteración de genes por infección con *Staphylococcus aureus*, organismo capaz de causar infecciones en el organismo que puedan originar una sepsis. De hecho, en un estudio desarrollado hace unos años en modelos

murinos en los que se les inyectaba *S. aureus* para determinar los parámetros que se veían tras la infección, se observó que marcadores inflamatorios como el TNF- $\alpha$ , la IL-6 o la proteína C reactiva estaban incrementados. Además, en este estudio, los autores encontraron también niveles elevados de procalcitonina en el plasma de los ratones a los que se había inyectado *S. aureus*, indicando que los ratones habían generado una sepsis (320). En este estudio también observaron que la infección por *S. aureus* causaba un incremento de la población de monocitos y neutrófilos, que se veía reducida a las 96h de la infección (320).



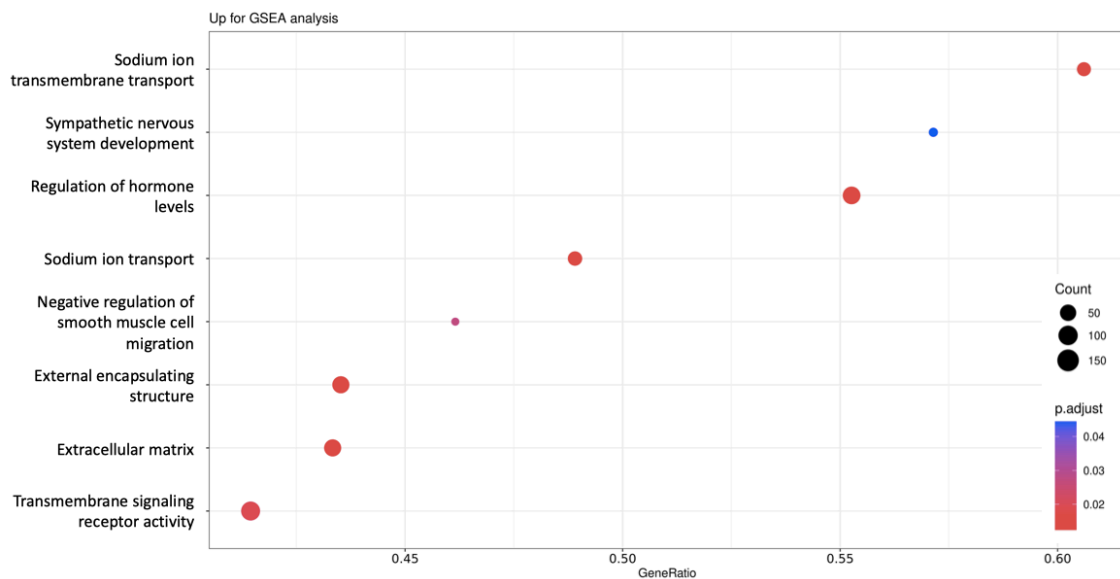
**Figura 31. Principales términos KEGG obtenidos del análisis GSEA.** Gene ratio: número de genes diana para los miRNA significativos obtenidos, respecto al número total de genes que conforman el término en cuestión. Count: número de genes de cada término. p.adjust: p-valor ajustado del test realizado en ORA.

En la Figura 32, donde se presentan los principales términos GO obtenidos del análisis GSEA, podemos observar varias rutas implicadas en el transporte del ion sodio, fundamental para el buen funcionamiento del corazón y del cerebro, órganos afectados en los pacientes tras sufrir un episodio de sepsis, especialmente el corazón (34,321).

Se ha descrito ampliamente el papel del sodio en la fisiología cardiaca, puesto que es un ion esencial para mantener un adecuado volumen y presión sanguínea pero, al mismo tiempo, elevadas concentraciones de sodio plasmático se han asociado con un incremento de expresión de la proteína  $\beta$ -miosina en la cadena pesada, un aumento del factor potenciador de miocitos 2/factor nuclear de la actividad transcripcional de las células T activadas y un aumento de la expresión de la quinasa 1, conduciendo a una alteración del rendimiento mecánico del miocardio, lo cual puede llegar a producir el fallo cardíaco (322). Además, elevados niveles de sodio intracelular también han sido asociados con la alteración de varias proteínas responsables de la

homeostasis del calcio en la contracción miocárdica (322). Con respecto a la sepsis, se ha descrito que el fallo cardíaco que se observa en estos pacientes podría ser evitado inhibiendo la función de la bomba Na/H, como demostró Sikes *et al.*, en modelos animales de ratón hace unos años (321).

Por otro lado, se ha descrito que los pacientes con sepsis, en el momento del ingreso, suelen padecer hipernatremia (323,324). Elevadas concentraciones de sodio en sangre pueden servir como mecanismo de defensa inmunológica en estados inflamatorios como los que se dan durante una infección o durante el desarrollo de la sepsis. De hecho, el sodio se ha relacionado con la capacidad de potenciar la función de los macrófagos y los linfocitos T (323,325,326). Sin embargo, hay que tener en cuenta que una situación catabólica prolongada puede conducir a la hipernatremia a través de la diuresis osmótica inducida por la urea. De hecho, recientemente Rugg *et al.*, han relacionado la hipernatremia con el desarrollo de PICS (327). Este hallazgo puede resultar en una reatrolimentación positiva, puesto que la hipernatremia puede conducir a la inflamación y el catabolismo a través del estrés por hiperosmolaridad. Lo que queda de manifiesto en el trabajo de Rugg *et al.*, es que la hipernatremia adquirida en UCI está asociada al PICS (327).



**Figura 32. Principales términos GO obtenidos del análisis GSEA.** Gene ratio: número de genes diana para los miRNA significativos obtenidos, respecto al número total de genes que conforman el término en cuestión. Count: número de genes de cada término. p.adjust: p-valor ajustado del test realizado en ORA.



### 6.9.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL Y CONTEXTUALIZACIÓN BIOLÓGICA ENTRE PICS Y ECC

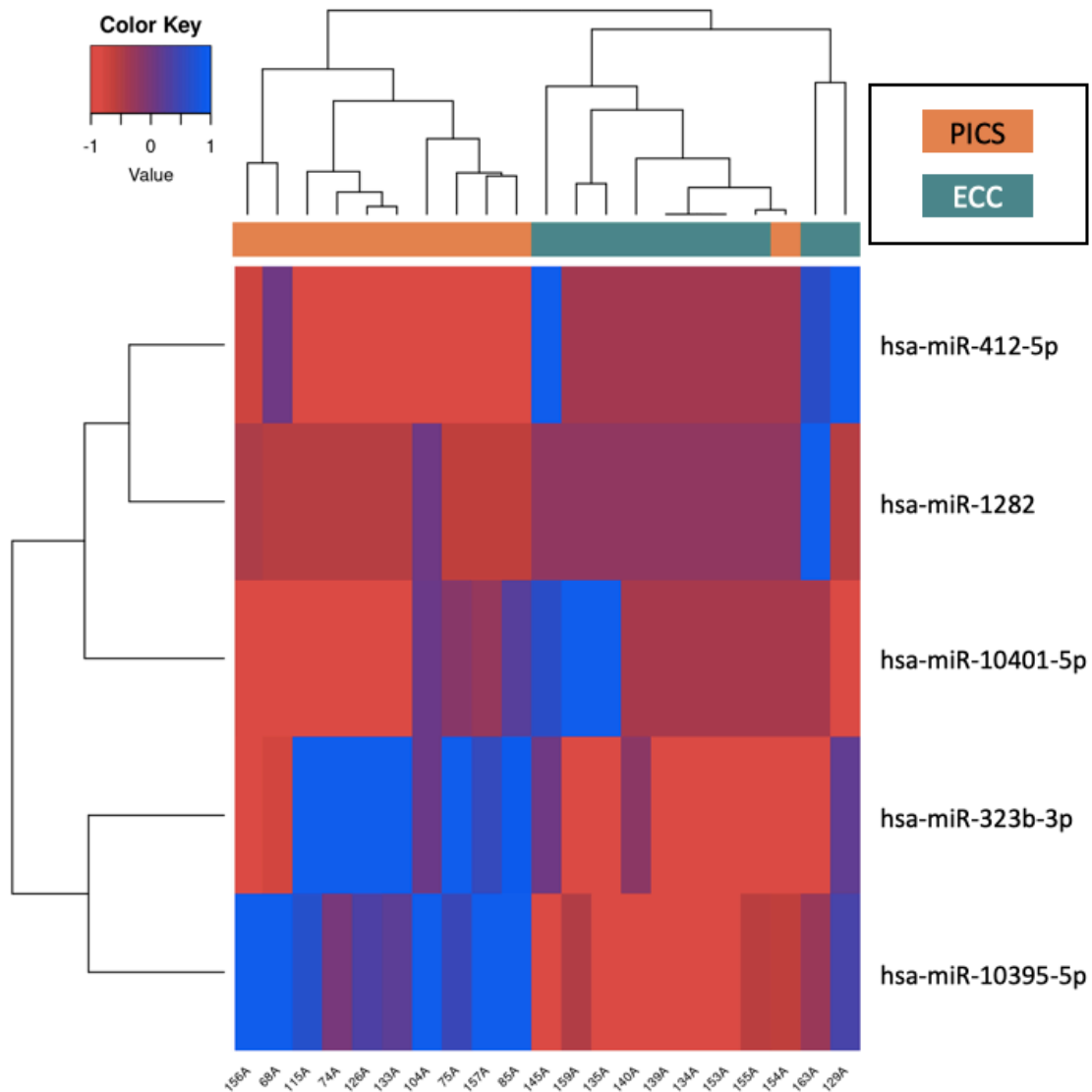
#### 6.9.3.1. DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN DE MIARNAS ENTRE PICS Y ECC

Al realizar la comparación de muestras obtenidas durante las primeras 24h de ingreso en UCI, entre los grupos de pacientes PICS (pacientes con sepsis ingresados al menos 14 días en UCI y que cumplen las características descritas por Gentile *et al.* (84)) y ECC (pacientes sépticos ingresados al menos 7 días en UCI y con necesidad de ventilación mecánica (79)), se encontraron 5 miRNAs regulados diferencialmente y de manera significativa con un FDR<0,1 (Tabla 17). Los valores positivos de logFC, indicaron una sobreexpresión de los miRNA en los casos de PICS respecto a los pacientes de ECC. Por el contrario, los valores negativos de logFC indican una infraexpresión del miRNA en los casos de PICS respecto a los casos ECC.

Tabla 17. miRNAs expresados diferencialmente de manera significativa (FDR<0,1) en la comparativa PICS vs ECC.

miRNA	logFC	FDR	p-valor
hsa-miR-1282	-6,12691	0,024606	0,000171
hsa-miR-10401-5p	-6,71278	0,024606	0,000303
hsa-miR-412-5p	-3,77282	0,046203	0,000757
hsa-miR-10395-5p	6,680054	0,024606	0,000213
hsa-miR-323b-3p	3,594907	0,088606	0,001816

Al representar los diferentes miRNAs con expresión diferencial obtenidos en esta comparación en forma de mapa de calor (Figura 33), se observó una separación muy clara de los dos grupos comparados, mostrándose a la izquierda todos los pacientes con PICS y a la derecha todos los ECC, con la excepción de un único caso de PICS que quedó clasificado en el grupo de pacientes con ECC. Así mismo, en la jerarquización presentada a la izquierda de la Figura 33 se muestran dos grupos bien separados, quedando en la parte superior los miRNAs infraexpresados y en la inferior los sobreexpresados.



**Figura 33. Mapa de calor de la comparación PICS vs ECC.** Los miRNAs mostrados son los mismos que se presentan en la tabla 17. El color rojo indica una correlación negativa entre ambos grupos comparados, mientras que el color azul muestra una correlación positiva.

Algunos de los miRNAs que aparecieron en esta comparación entre PICS y ECC, se vieron también desregulados en la comparación entre ECC y Sepsis, como es el caso del miR-412, miR-1281 o el miR-10401. Estos miRNAs no han sido directamente relacionados con sepsis, aunque el miR-412 se ha visto en muestras de plasma en pacientes con infección por SARS-CoV-2 (295) y el miR-1282 ha sido descrito como posible biomarcador para monitorizar la evolución de pacientes con SIRS (294). Así mismo, el miR-10395-5p aparece con expresión diferencial en la comparativa PICS vs Sepsis. Como se comentó anteriormente, a pesar de que actualmente no hay mucha información sobre este miRNA, se han observado niveles elevados de este miRNA en aquellos pacientes con mayor puntuación SOFA (309). Lo cual concuerda con los resultados observados en este trabajo, puesto que se observó que los pacientes con PICS, los cuales

presentaron mayor expresión de este miRNA en ambas comparaciones, presentaban una mayor puntuación SOFA que los otros grupos de pacientes (Tabla 13).

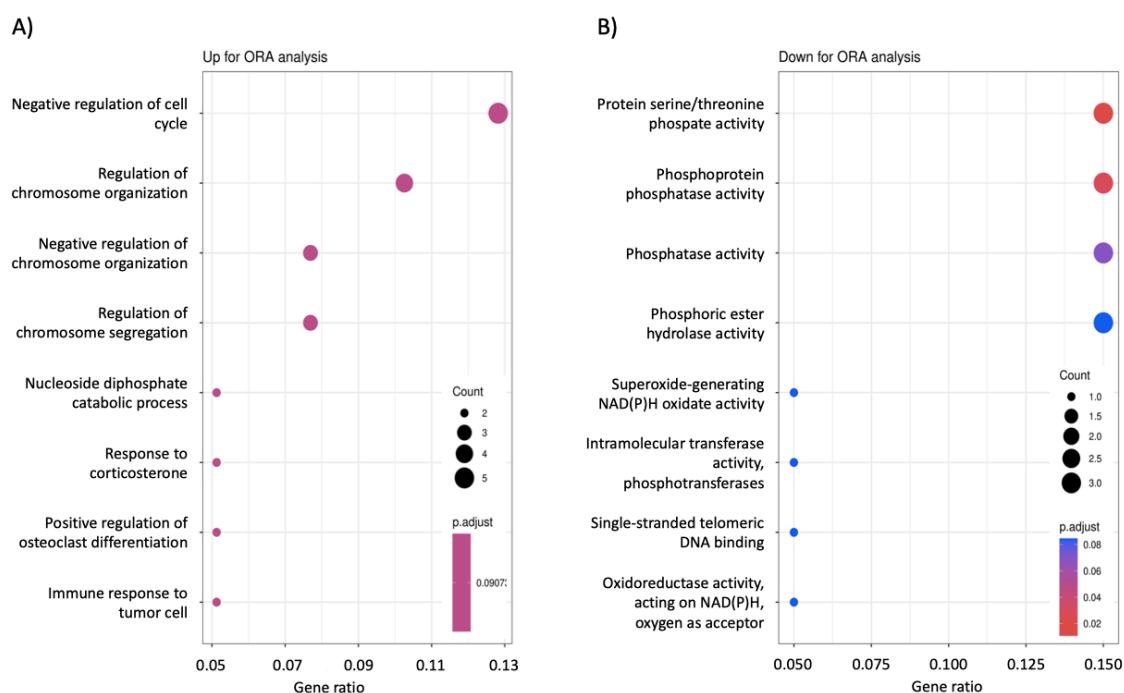
#### *6.9.3.2. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL CON LOS MIRNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ENTRE PICS Y ECC*

Para los miRNAs que se encontraron en esta comparativa expresados de manera diferencial y significativa se buscaron los genes diana en la base de datos miRTarBase, realizando dos análisis de enriquecimiento para obtener las rutas KEGG y los términos GO enriquecidos a partir del listado obtenido. El p-valor ajustado aplicado fue de 0,1.

En esta comparación entre PICS y ECC, no se obtuvieron rutas KEGG significativas en el análisis ORA realizado, pero sí se obtuvieron rutas para los términos GO (Figura 34).

En la Figura 34A, podemos observar rutas implicadas en la regulación del ciclo celular y la organización de los cromosomas. Es importante destacar que esta figura muestra las rutas implicadas en la sobreexpresión de los miRNAs, lo cual implica generalmente una reducción del evento que regulan, de forma que muchas de las rutas que aparecen tienen que ver con una regulación negativa, por lo que estarían mediando una sobreexpresión de esta ruta.

Por el contrario, los miRNAs que se encontraron infraexpresados (Figura 34B) mostraron algunas rutas relacionadas con la generación de especies reactivas de oxígeno, como la ruta de generación del radical superóxido a través de la actividad NAD(P)H oxidasa. En consonancia con esto, nuestro grupo ha descrito previamente que las histonas extracelulares son capaces de producir estrés oxidativo celular a nivel endotelial (128). Así mismo, otros trabajos han descrito que la generación de los radicales libres es importante en la respuesta del huésped frente a una infección (328), la regulación del tono vascular y en la modificación de las adhesiones celulares (329), procesos alterados durante la sepsis. De hecho, se ha descrito que durante la sepsis se produce un aumento de los niveles de las especies reactivas del oxígeno, entre las que se encuentran el superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los radicales hidroxilo (HO) (330,331).

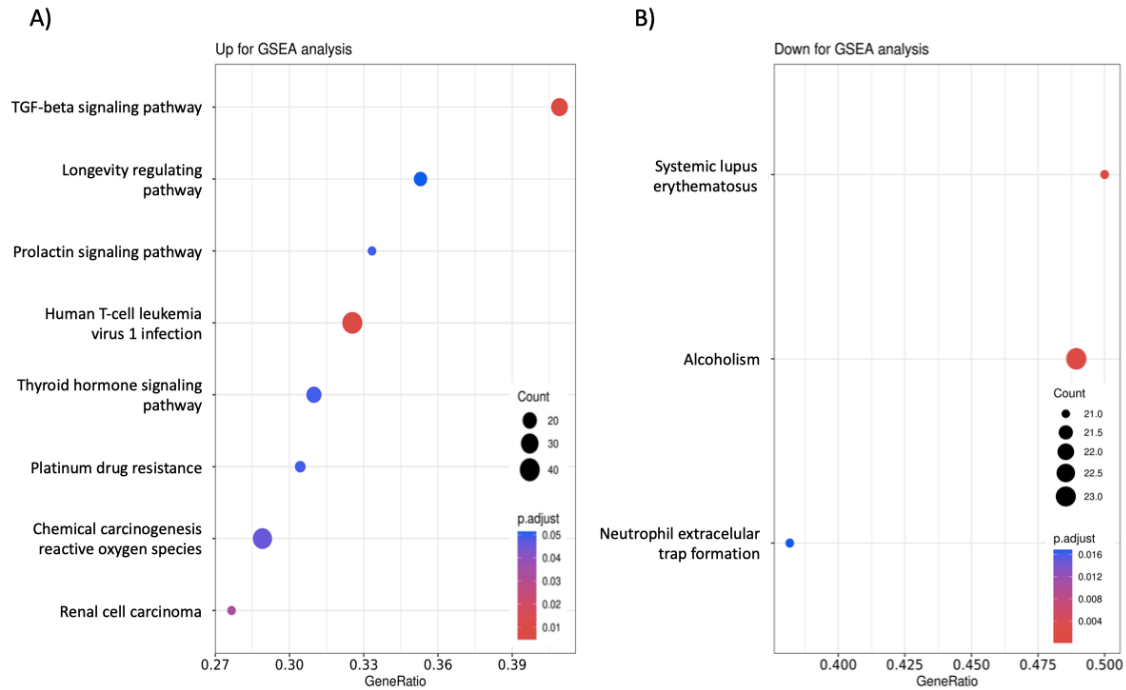


**Figura 34. Principales términos GO obtenidos del análisis ORA para los miRNA sobreexpresados (A) e infraexpresados (B).** Gene ratio: número de genes diana para los miRNA significativos obtenidos, respecto al número total de genes que conforman el término en cuestión. Count: número de genes de cada término. p.adjust: p-valor ajustado del test realizado en ORA.

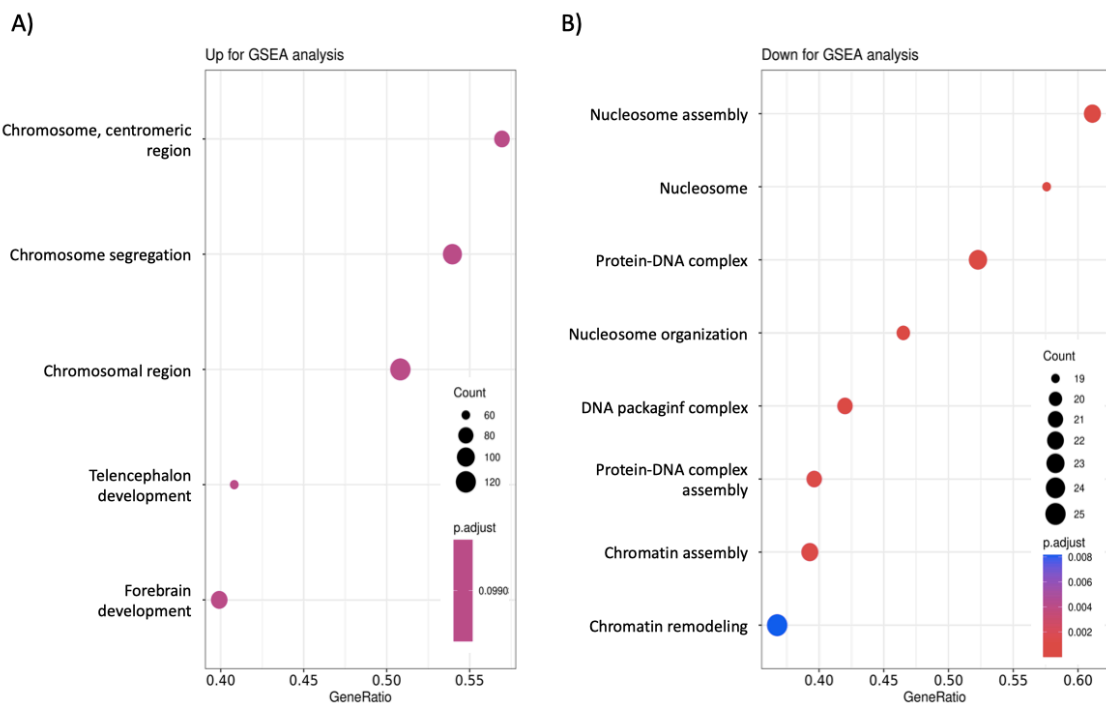
En el análisis GSEA se encontraron 24 rutas KEGG (Figura 35) y 14 términos GO (Figura 36). Este análisis reveló que los pacientes con PICS mostraron la ruta del TGF- $\beta$  reducida, por estar asociada con la sobreexpresión de los miRNAs reguladores de la misma (Figura 35A). Debido a que el TGF- $\beta$  es una citoquina relacionada con la inmunosupresión, capaz de controlar los linfocitos T, estos resultados sugieren una relación entre la desregulación de los miRNAs y la desregulación del sistema inmunitario. En este sentido, Zou *et al.*, corrigieron los fenómenos de inmunosupresión en un modelo de ratas con sepsis a través de la inhibición de TGF- $\beta$  (332). Sin embargo, Bae *et al.*, asociaron el TGF- $\beta$  a un incremento del daño vascular severo durante la respuesta inflamatoria, como es el caso de la sepsis (333).

Es interesante destacar que, entre las rutas reguladas por la infraexpresión de los miRNAs (Figura 35B), de nuevo aparece la formación de NETs, indicando que esta ruta estaría favorecida en los pacientes con PICS durante los estadios iniciales de la sepsis.

Al observar las rutas que aparecen al realizar el análisis de términos GO, vemos que los principales términos obtenidos para los miRNAs infraexpresados (Figura 36B) están relacionados con la formación de nucleosomas y su organización, lo cual concuerda con resultados anteriores como el de la formación de NETs. Entre las rutas que aparecen se encuentra la remodelación de la cromatina, donde las PTMs de las histonas tienen un papel fundamental, siendo uno de los pilares principales de este trabajo.



**Figura 35. Principales términos KEGG obtenidos del análisis GSEA para los miRNA sobreexpresados (A) e infraexpresados (B).** Gene ratio: número de genes diana para los miRNA significativos obtenidos, respecto al número total de genes que conforman el término en cuestión. Count: número de genes de cada término. p.adjust: p-valor ajustado del test realizado en GSEA.



**Figura 36. Principales términos GO obtenidos del análisis GSEA para los miRNA sobreexpresados (A) e infraexpresados (B).** Gene ratio: número de genes diana para los miRNA significativos obtenidos, respecto al número total de genes que conforman el término en cuestión. Count: número de genes de cada término. p.adjust: p-valor ajustado del test realizado en ORA.

#### 6.9.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL Y CONTEXTUALIZACIÓN BIOLÓGICA ENTRE PACIENTES CON PICS A LAS 24H DE INGRESO (PICS-A) Y LOS PACIENTES CON PICS A LOS 14 DÍAS DE INGRESO EN UCI (PICS-C)

##### 6.9.4.1. DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN DE MIRNAS ENTRE PICS-C Y PICS-A

La última comparación en busca de diferencias de expresión de miRNAs se realizó con muestras obtenidas a diferentes tiempos en pacientes del mismo grupo. Los pacientes comparados fueron pacientes con PICS (pacientes con sepsis ingresados al menos 14 días en UCI y que cumplen características inmunitarias y metabólicas concretas (84)). Los tiempos comparados fueron el tiempo “C”, correspondiente a la muestra tomada el 14º día de ingreso en UCI, y el tiempo “A”, correspondiente a la muestra tomada durante las primeras 24h tras el ingreso del mismo paciente.

Al comparar los grupos de PICS se obtuvieron 40 miRNAs expresados diferencialmente con un  $FDR < 0,1$ . Entre los miRNAs hallados, 18 presentaron valores positivos para el  $logFC$ , indicando sobreexpresión (Tabla 19), mientras que 22 de los miRNAs obtenidos mostraron valores negativos para la misma variable, indicando infraexpresión (Tabla 18). Así mismo, se realizó un análisis más restrictivo con el fin de encontrar aquellos miRNAs con mayor variación, aplicando un  $FDR < 0,05$ , donde se obtuvieron 28 miRNAs significativos (Tablas 18 y 19).

Al representar los miRNAs en un mapa de calor (Figura 37), puede observarse una separación muy clara entre ambos grupos de pacientes, quedando agrupados en el lado izquierdo las muestras obtenidas durante la evolución de los pacientes (PICS-C), y en el lado derecho las muestras obtenidas en los tiempos iniciales (PICS-A), en las primeras 24h tras el ingreso en UCI. El perfil de expresión del paciente 133 fue muy similar tanto para la muestra tomada a las 24h como a la muestra tomada a los 14 días. Así mismo, cabe destacar, como se muestra en la jerarquización de la izquierda de la Figura 37, que los grupos quedan claramente separados en dos poblaciones a través de la clasificación otorgada por los miRNAs con expresión diferencial: en la parte superior se agrupan aquellos que están infraexpresados, y en la parte inferior los que se encontraron sobreexpresados.

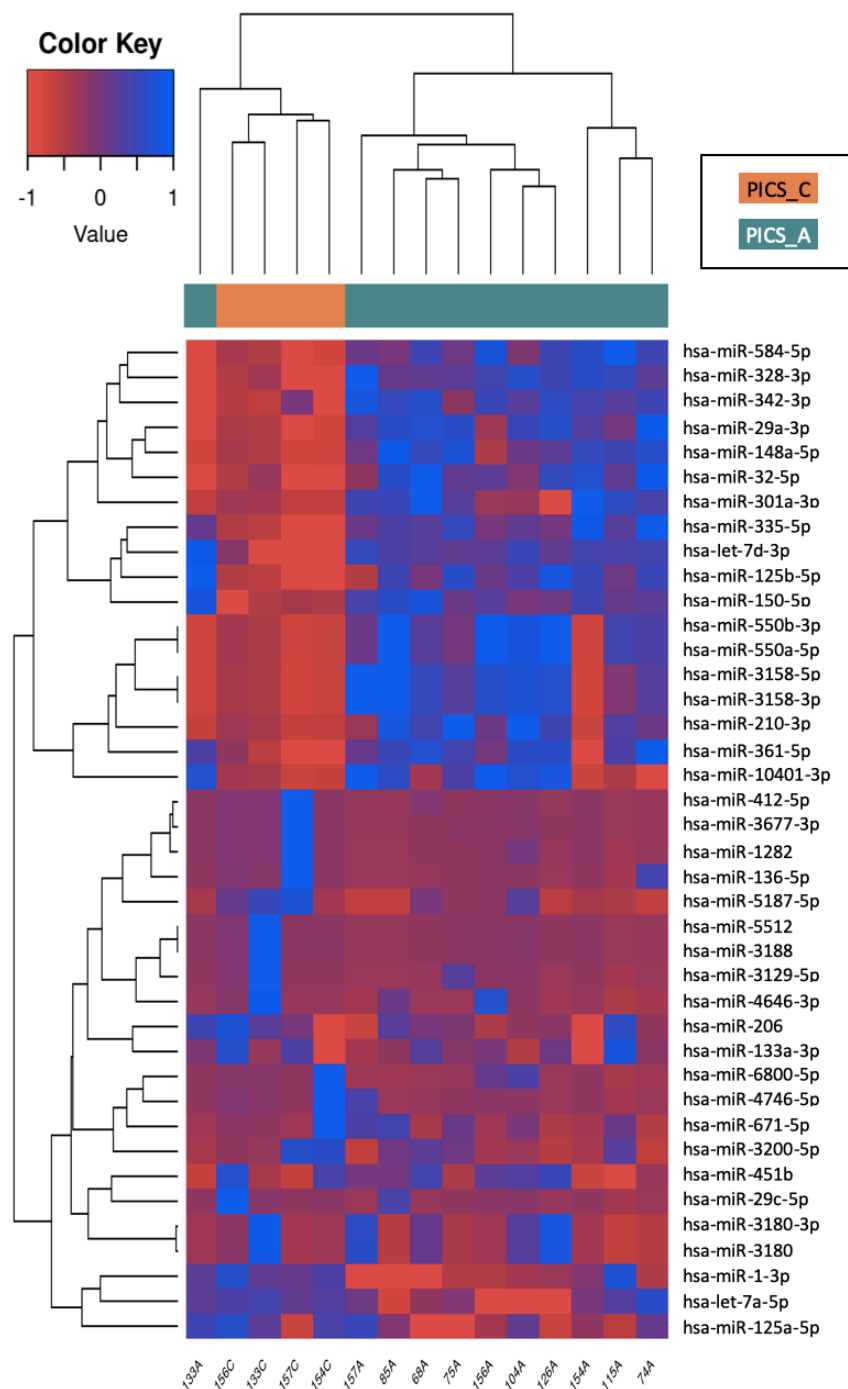
**Tabla 18.** miRNAs infraexpresados diferencialmente de manera significativa en la comparativa PICS-C vs PICS-A.

<b>miRNA</b>	<b>logFC</b>	<b>FDR</b>	<b>p-valor</b>
hsa-miR-125b-5p	-9,79424	0,013822	0,000293
hsa-miR-335-5p	-9,61072	0,013822	0,000528
hsa-let-7d-3p	-3,22354	0,013822	0,000566
hsa-miR-150-5p	-3,59837	0,013953	0,00077
hsa-miR-29a-3p	-9,25563	0,01762	0,001218
hsa-miR-328-3p	-5,2679	0,024731	0,002225
hsa-miR-148a-5p	-8,34161	0,037558	0,003694
hsa-miR-361-5p	-4,78385	0,049318	0,005507
hsa-miR-10401-3p	-9,49141	0,049318	0,005659
hsa-miR-584-5p	-7,26715	0,060917	0,00749
hsa-miR-210-3p	-8,39632	0,075079	0,009954
hsa-miR-3158-3p	-7,18966	0,075079	0,010462
hsa-miR-3158-5p	-7,18966	0,075079	0,010462
hsa-miR-550a-5p	-7,26745	0,077187	0,011388
hsa-miR-550b-3p	-7,26745	0,077187	0,011388
hsa-miR-342-3p	-4,24015	0,084493	0,013165
hsa-miR-32-5p	-4,19342	0,084493	0,013505
hsa-miR-301a-3p	-7,49687	0,098485	0,016145

**Tabla 19.** miRNAs sobrepresados diferencialmente de manera significativa en la comparativa PICS-C vs PICS-A.

<b>miRNA</b>	<b>logFC</b>	<b>FDR</b>	<b>p-valor</b>
hsa-miR-412-5p	8,14366	0,002947	1,21E-05
hsa-miR-6800-5p	8,054765	0,005654	4,63E-05
hsa-miR-4746-5p	6,995205	0,012608	0,000155
hsa-miR-3129-5p	6,09094	0,013822	0,000359
hsa-miR-3188	7,882603	0,013822	0,000397
hsa-miR-29c-5p	5,89062	0,013822	0,000451
hsa-miR-136-5p	6,38581	0,013822	0,000558
hsa-miR-671-5p	5,402376	0,013953	0,000707
hsa-miR-3677-3p	9,390921	0,013953	0,000739
hsa-miR-3200-5p	5,266929	0,013953	0,000801
hsa-miR-4512	6,796412	0,015287	0,00094
hsa-miR-206	5,390267	0,01762	0,001228
hsa-miR-1282	5,689019	0,018188	0,001342
hsa-miR-5187-5p	4,55594	0,023983	0,001868
hsa-miR-1-3p	4,456958	0,024731	0,00204
hsa-miR-3180-3p	5,526073	0,024731	0,00223
hsa-miR-3180	5,49765	0,024941	0,002351
hsa-miR-451b	3,583903	0,044637	0,004573
hsa-miR-4646-3p	4,589426	0,046024	0,004904
hsa-miR-133a-3p	4,529687	0,059005	0,007013
hsa-miR-125a-5p	1,732109	0,068441	0,008695
hsa-let-7a-5p	1,005203	0,084493	0,013178

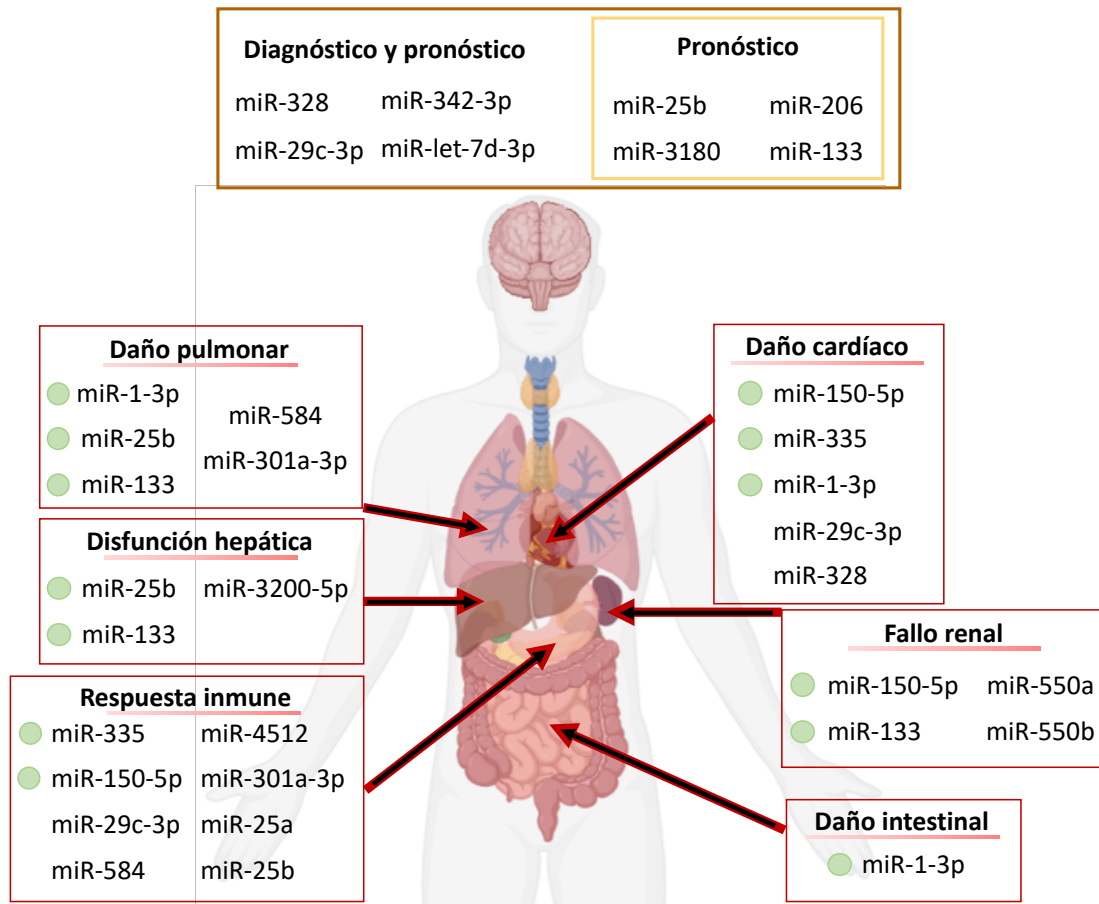




**Figura 37. Mapa de calor de la comparación PICS-C vs PICS-A.** Los miRNAs mostrados son los mismos que se presentan en las Tablas 18 y 19. El color rojo indica una correlación negativa entre ambos grupos comparados, mientras que el color azul muestra una correlación positiva.

Entre los miRNAs que se han encontrado en este análisis, algunos miRNAs no descritos en sepsis coinciden con las comparaciones anteriores entre los distintos grupos de pacientes estudiados, como es el caso del miR-412-5p o el miR-1282 que estaban desregulados en las comparaciones PICS vs ECC y ECC vs Sepsis (Tabla 17). Otros de los miRNAs que aparecen en esta comparación entre el grupo de PICS a los 14 días y el grupo de PICS tras el ingreso en UCI han

sido previamente descritos en sepsis, bien por su capacidad para ser biomarcadores de diagnóstico (miR-328, miR-29c-3p, miR-342-3p, miR-let-7d-3p) o pronóstico en la sepsis (miR-25b, miR-3180, miR-206, miR-133), o bien por el papel que ejercen sobre el sistema inmune (miR-335, miR-150-5p, miR-29c-3p, miR-584, miR-25b, miR-25a, miR-301a-3p, miR-4512) u órganos afectados durante el transcurso de la enfermedad (e.g. miR-1-3p, miR-25b, miR-133, miR-584, miR-301a-3p, miR-3200-5p, miR-150-5p, miR-550a, miR-550b). La función de estos miRNAs se describe con más detalle en los siguientes apartados (Figura 38).



**Figura 38. miRNAs hallados en el análisis de miRseq, clasificados según el órgano en el que han sido descritos.** Algunos de los miRNAs encontrados se postularon como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de la sepsis, otros se postularon como biomarcadores de pronóstico. El punto verde indica que la literatura los ha considerado como candidatos para posibles terapias.

**6.9.4.1.1. POTENCIALES MIARNAS BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO**

Entre los distintos miRNAs con expresión diferencial hallados en esta comparación resaltan algunos que se han asociado con un valor diagnóstico clínico (el miR-let-7d-3p), así como con severidad clínica (miR-3180, el miR-206 o el miR-133). El haber encontrado miRNAs alterados

que han sido previamente descritos por otros autores valida nuestros estudios y refuerza la idea del valor diagnóstico y pronóstico de los nuevos miRNAs encontrados.

El miR-let-7d-3p y el miR-let7a-5p se han visto elevados en pacientes con sepsis en comparación con controles sanos, postulándose como biomarcadores tempranos de la sepsis (334). Los resultados obtenidos en esta tesis también identificaron alterados los miR-let-7d-3p y miR-let7a-5p en los pacientes con PICS tras 14 días ingresados en UCI, respecto a la muestra tomada en el momento de ingreso. Por ello, postulamos que además de ser un biomarcador temprano de la sepsis, podría ser empleado como biomarcador de pronóstico. Especialmente el miR-let-7a-5p, el cual se encontró alterado en pacientes con sepsis (334) y se encontró aumentado en el grupo de pacientes que desarrollaron PICS.

La literatura muestra que el miR-29c-3p está sobreexpresado en pacientes con sepsis (335), lo cual concuerda con nuestros resultados, pues nosotros lo encontramos sobreexpresado en pacientes con una sepsis más avanzada (PICS ingresados durante 14 días en UCI). Así pues, Zhang *et al.* mostraron en un modelo de ratones con sepsis, que este miRNA podría ser empleado para el diagnóstico de la sepsis, y que modular los niveles de expresión del miR-29c-3p reduce la respuesta inflamatoria y la disfunción cardíaca inducida por la sepsis en ratones sépticos (335).

El miR-3180 no ha sido directamente relacionado con pacientes sépticos, pero ha sido descrito en pacientes con COVID-19. El miR-3180 se ha asociado con un mal pronóstico evolutivo de la enfermedad y con una probabilidad disminuida de supervivencia a los 90 días de su detección (295). Debido a que se ha descrito que los pacientes con COVID-19 desarrollaron en muchos casos sepsis de origen vírico (336), postulamos que el hallazgo de este miRNA en plasma de pacientes sépticos podría relacionarse con un mal pronóstico evolutivo. En nuestros resultados lo hemos encontrado sobreexpresado en aquellos pacientes con PICS que llevan más tiempo en UCI, en comparación con la muestra tomada al inicio de su estancia hospitalaria, lo que podría indicar una elevada mortalidad a corto plazo en estos pacientes. Así mismo, el miR-133a se ha descrito elevado en sepsis, lo que concuerda con nuestros resultados, y se ha relacionado con la predicción de mortalidad en pacientes críticos (337). Además, el miR-133a se ha relacionado con el agravamiento de las respuestas inflamatorias en sepsis a través de *SIRT1*, y el bloqueo de este miRNA inhibe el daño pulmonar, renal y hepático inducido por la sepsis en modelos animales de ratón con sepsis inducida por CLP (338).

Otro de los miRNAs relevantes encontrados en nuestra comparación de pacientes con PICS a diferentes tiempos (14 días vs inicial) es el miR-206. Liang *et al.*, encontraron sobreexpresado el miR-206 en pacientes con sepsis en comparación con una población control, además de correlacionar positivamente con la puntuación SOFA de dichos pacientes (339). Este miRNA

podría ser empleado como biomarcador de diagnóstico y pronóstico en sepsis. En nuestro estudio, encontramos niveles muy elevados del miR-206 al comparar los pacientes con PICS a los 14 días respecto a estos mismos pacientes a tiempo inicial, lo que confirma su potencial como biomarcador de severidad y la evolución de la sepsis. Además, los pacientes con PICS mostraron una mayor puntuación SOFA que los otros grupos de pacientes comparados en este trabajo (ECC y sepsis; Tabla 13), lo cual apoyaría la capacidad de este miRNA para indicar severidad y pronosis en sepsis.

Por último, el miR-328 además de haberse postulado como biomarcador de diagnóstico, también se ha relacionado con la inflamación y el el daño cardíaco (340). Sirviendo como nexo de unión entre las funciones de los miRNAs descritos hasta ahora y los que se describirán a continuación. Sun *et al.*, demostraron que el miR-328 podía ser empleado para el diagnóstico de la sepsis con una sensibilidad y especificidad del 87.6% y 86.36%, respectivamente (341) y relacionaron los niveles elevados del miR-328 con el incremento de la inflamación y la disfunción cardíaca en ratones sépticos (341). Además, otro trabajo relacionó el miR-328 con el desarrollo de fibrosis miocárdica a través de una regulación paracrina de los cardiomiocitos (340) y por la estimulación de la ruta del TGF- $\beta$  que promueve la producción de colágeno (342).

#### 6.9.4.1.2. MIRNAS CON FUNCIÓN SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO

Entre todos los miRNAs identificados en esta comparación de pacientes con PICS a diferentes tiempos, aquí se resaltan aquellos que tienen una función sobre el sistema inmunitario, por ser una de las características principales de este grupo de pacientes descritos como síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión.

El miR-125a y miR-125b se han asociado con la severidad de los pacientes sépticos. Mientras que el miR-125b, infraexpresado en PICS\_C, correlaciona con moléculas inflamatorias en pacientes sépticos, como la IL-6, la IL-17, la IL-23 y moléculas inflamatorias como la PCR (343,344), el miR-125a no mostró estas interacciones, indicando que los niveles de miR-25b podrían indicar una inmunosupresión en estos pacientes con más evolución de la enfermedad. Además, niveles elevados del miR-125b se han asociado con la mortalidad a corto plazo (28 días) de los pacientes sépticos (343,344), pero no en el miR-125a, sobreexpresado en nuestros resultados de pacientes con PICS tras 14 días ingresados en UCI. Así mismo, el miR-125b-5p se ha encontrado disminuido en PBMCs expuestas a LPS y en el plasma de pacientes sépticos (345,346). En cuanto al mecanismo molecular, Antonakos *et al.*, han descrito que el miR-125b-5p, liberado mediante exosomas por las células endoteliales, incrementa los niveles de VEGF, protegiendo contra el daño pulmonar inducido por la sepsis. Esto podría explicar los bajos niveles de este miRNA encontrado en el plasma de los pacientes sépticos, además de indicar un posible

valor terapéutico frente a la sepsis (347). En relación con el valor terapéutico que ofrece este miRNA, en un estudio muy reciente se describe cómo la regulación positiva del miR-125b-5p alivia la insuficiencia hepática aguda durante la sepsis al regular la vía Keap1/Nrf2/HO-1 (348).

Otro de los miRNAs relacionados con el sistema inmunitario es el miR-4512. Recientemente, se ha relacionado el miR-4512 con la activación de los monocitos y los macrófagos. De hecho, se ha visto que niveles disminuidos del miR-4512 activan la inmunidad innata, incluyendo mecanismos de NETosis, a través de la ruta TLR4-CXCL2 (349). Puesto que en nuestro trabajo encontramos niveles elevados de este miRNA en pacientes con PICS tras 14 días ingresados en la UCI, en comparación con la muestra tomada el primer día, se corrobora el proceso de inmunosupresión que experimentan estos pacientes. Además, la sobreexpresión del miR-4512 refuerza nuestra hipótesis en la que postulamos que la reducción de H3cit que hemos observado (apartado 6.6) está relacionada con una reducción de los eventos de ETosis.

El miR-150-5p es capaz de regular el gen *STAT3*, implicado en la maduración de algunas células inmunes, especialmente del sistema inmunitario adaptativo (350). Este miRNA también se ha relacionado con la apoptosis de los macrófagos (351). Por lo que los niveles de este miRNA podrían ser claves para modular la respuesta inmunitaria. Niveles elevados podrían favorecer una inmunosupresión a través del bloqueo del gen *STAT3* o la apoptosis de los macrófagos. Por el contrario, si los niveles de expresión de este miRNA fueran demasiado bajos, podría darse una activación excesiva del sistema inmunitario, causando inflamación persistente (352). Recordemos que ambos procesos son característicos de los pacientes con PICS. De hecho, nuestros resultados mostraron que los pacientes con PICS-C, a los 14 días de ingreso, tenían menor expresión del miR-150-5p que los pacientes con PICS a tiempos iniciales, pudiendo estar contribuyendo a un proceso de inflamación persistente.

Por último, Hazra *et al.*, encontraron una correlación entre los niveles elevados del miR-301-3p y una mejor prognosis de la enfermedad causada por el virus de la encefalitis. Además, estos autores propusieron el factor regulador de INF 1 (*IRF1*) como uno de los genes diana del miR-301a-3p, regulando la respuesta inmunitaria y la apoptosis (353), altamente desreguladas en los pacientes sépticos. Nuestros resultados muestran una disminución de la expresión de este miRNA en los pacientes con PICS durante el 14º día de su estancia en UCI en comparación con el día de ingreso, lo que podría causar una desregulación de la respuesta inmunitaria, característica de los pacientes con PICS.

*6.9.4.1.3. MIRNAS CON FUNCIÓN SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO  
Y RELACIONADOS CON EL DAÑO ORGÁNICO*

Otros de los miRNAs encontrados, además de estar relacionados con el sistema inmunitario, también se han relacionado con daño orgánico, lo cual podría ayudar a predecir algunas de las morbilidades asociadas a la sepsis en los pacientes supervivientes y, especialmente, con PICS. Los miRNAs descritos a continuación demuestran cómo la alteración del sistema inmunitario puede causar alteraciones en diferentes órganos. Aunque se han encontrado miRNAs asociados con el daño renal y hepático, la mayoría se han asociado con daño cardiovascular, comunmente afectado durante la sepsis (33). El miR-150-5p se ha asociado con el sistema inmunitario (351), daño cardiovascular (354) y renal (350), daño que también es capaz de monitorizar el miR-550 (miR-550a y miR-550b) (355). El miR-335 (356) y el miR-29c-3p se han relacionado con la inflamación y la disfunción cardíaca (335). Otros de los miRNAs hallados en esta comparación, como son el miR-584 (357), miR-301a-3p (358) y miR-1-3p (359)) han sido asociados con el daño pulmonar. Algunos de estos miRNAs se describen con más detalle a continuación (Figura38).

*miRNAs con función cardiovascular*

El miR-150-5p, además de haberse relacionado con el sistema inmunitario, también se ha relacionado con la reducción de apoptosis en las células cardíacas, aliviando la depresión miocárdica inducida por la sepsis (354). Zhu *et al.*, demostraron que el miR-150-5p estaba infraexpresado en pacientes con daño miocárdico causado por la sepsis, y demostraron que, a nivel molecular, este miRNA es capaz de reducir los niveles de las proteínas pro-apoptóticas caspasa-3 y Bax, y aumentar los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. En nuestros resultados, este miRNA mostró una reducción de sus niveles en los pacientes con PICS a los 14 días de ingreso en UCI. Además, apoyando la propuesta del uso del miR-150-5p como posible terapia, se ha descrito su papel en la protección frente al daño renal agudo en sepsis, a través de la represión de la vía MEKK3/JNK, reduciendo la apoptosis celular, la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo (350).

Long, *et al.*, demostraron cómo la regulación positiva del miR-335 ejerce efectos protectores contra la lesión miocárdica inducida por la sepsis (356). La razón de esta protección frente al daño cardíaco puede deberse a que la regulación positiva del miRNA-335-5p reduce las respuestas inflamatorias al inhibir *FASN* a través de la activación de la vía de señalización AMPK/ULK1, como demostraron Gao, *et al.*, en un modelo de ratón séptico (360). Así mismo, Oliveira S, *et al.*, también demostraron que el miRNA-335-5p alivia la respuesta inflamatoria a través de la

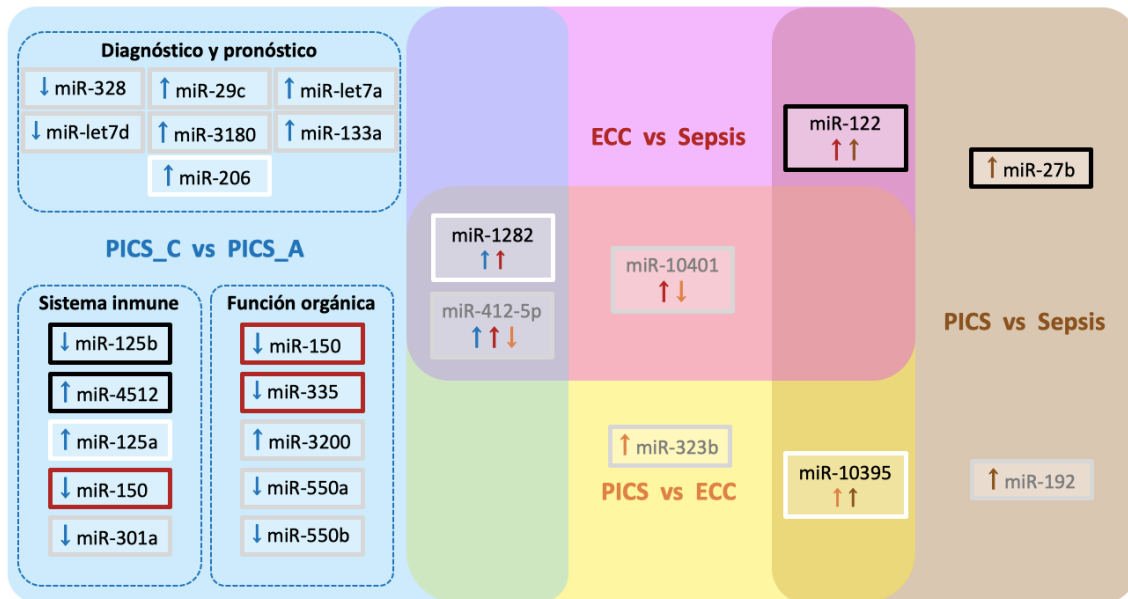
regulación de *LRRK2* (361). Nuestros resultados apuntan a que este miRNA podría estar implicado en la inflamación persistente que se observa en los pacientes con PICS.

#### *miRNAs con función renal y hepática*

Los miRNAs miR-550a y miR-550b también se han relacionados con el fallo renal, otro órgano afectado frecuentemente en los pacientes supervivientes de sepsis, pudiendo afectar hasta a un 40% de los pacientes (362). Niveles elevados de miR-550a y miR-550b se han correlacionado con daño renal agudo inducido por la sepsis (355). Sin embargo, en nuestra comparación entre las muestras obtenidas a los dos tiempos de estancia en UCI de los pacientes con PICS encontramos una reducción de estos niveles a medida que progresa la enfermedad. Futuros estudios longitudinales en pacientes supervivientes a PICS deberían comprobar si esta es una comorbilidad asociada a los supervivientes de PICS, y en su caso si los niveles de miR-550a y miR-550b están relacionados con la enfermedad crónica renal.

Por otro lado, el miR-3200-5p es capaz de regular la muerte celular mediante mecanismos de ferroptosis a través de *ATF4* en células de cáncer hepático (363). Siendo las células hepáticas capaces de morir por mecanismos de ferroptosis, la cual se ha descrito también involucrada en la sepsis (364), y donde el miR-3200-5p aparece como elemento regulador de este mecanismo, nuestros resultados sugieren que este miRNA podría ser importante en el desarrollo de complicaciones hepáticas asociadas a la sepsis.

Como conclusión, de entre todos los miRNAs descritos en esta sección, resalta el papel diagnóstico de la sepsis que tiene el miR-206, ya que no solo se relaciona con la severidad de la enfermedad, ya que los grupos de pacientes que poseen mayor puntuación SOFA también poseen mayores niveles circulantes de este miRNA, sino que es capaz incluso de diferenciar entre pacientes del mismo grupo a diferentes tiempos. Además, postulamos que generar una firma de miRNAs que incluya el miR-10395-3p, junto al let-7d-5p y miR-133a, ayudará al diagnóstico diferencial de los pacientes que tendrán una peor evolución, sirviendo para identificar a tiempos iniciales qué pacientes evolucionarán a PICS. Además, incluir en esta firma de miRNAs el miR-27b, el miR-122 y el miR-4512 podría ayudar a discernir si los pacientes que desarrollen PICS sufrirán una inmunosupresión a largo plazo o, por el contrario, mediante el análisis de expresión del miR-150-5p, miRNA-335-5p, una inflamación persistente. La validación de esta firma de miRNAs permitirá establecer protocolos de seguimiento adecuados para estos pacientes, con el fin de disminuir la elevada mortalidad y mejorar la calidad de vida de los pacientes sépticos que sobreviven a una sepsis (Figura 38).



**Figura 39. Representación de los miRNAs hallados en cada comparación.** Los miRNAs escritos en negro presentan una función relevante descrita en sepsis, los que están escritos en gris no han sido directamente relacionados con la sepsis hasta el momento. En la comparación de pacientes con PICS a diferentes tiempos además se presenta una subclasificación de los microRNAs según la función que presentan, habiéndose visto implicados en el diagnóstico y pronóstico de la sepsis, con función en el sistema inmune y con función en la alteración de diferentes órganos (función orgánica), como el corazón o el riñón. La dirección de las flechas indica si el miRNA está sobreexpresado (hacia arriba) o infraexpresado (hacia abajo). El color de la flecha indica en qué comparación se ha encontrado alterado, siendo roja la representación de la comparación ECC vs Sepsis, marrón la de PICS vs Sepsis, naranja la de PICS vs ECC y azul la de PICS-C vs PICS-A. Los miRNAs que están en el conjunto de dos o tres colores es porque se han visto desregulados en todas las comparaciones que se mezclan. El color del borde de la caja que rodea al miRNA (blanco, negro y rojo) indica qué función tendría en la firma de RNAs: el blanco indica evolución y severidad de la enfermedad, el negro indica el diagnóstico los pacientes que sufrirán una inmunosupresión a largo plazo, el rojo indica inflamación persistente.

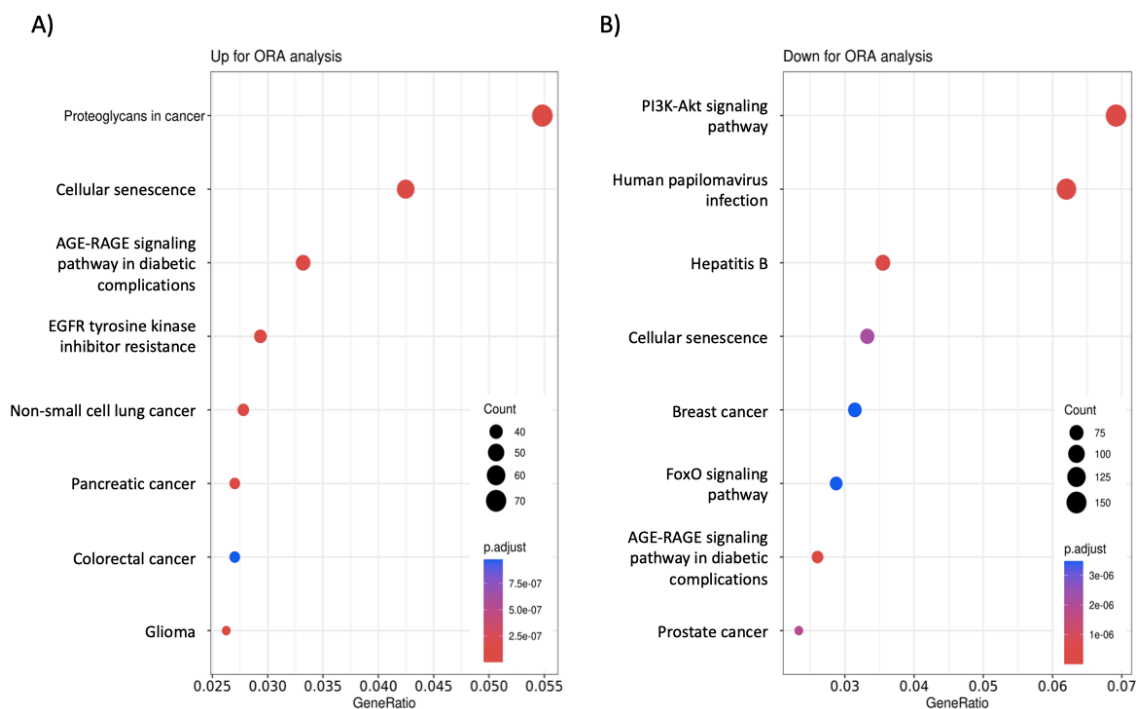
#### 6.9.4.2. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL CON LOS MIRNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS DURANTE LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON PICS (ENTRE PICS-C Y PICS-A).

En la comparativa entre tiempos del mismo grupo de pacientes de PICS, se encontraron 251 rutas KEGG cuando se realizó el análisis ORA, teniendo en cuenta las que se encontraron en los miRNAs sobreexpresados e infraexpresados (Figura 40). Al realizar el mismo análisis para los términos GO, se obtuvieron más de 3000 términos teniendo en cuenta todos los miRNAs (Figura 41).

La senescencia celular, cuya importancia en sepsis se describió en apartados anteriores, volvió a observarse como una de las rutas más relevantes (Figura 40), tanto en los miRNAs que están sobreexpresados como en los que están infraexpresados. Así mismo, se obtuvieron algunas rutas como PI3K-Akt (Fosfatidilinositol 3 kinasa/serina/treonina kinasa B) o FoxO (Figura 40B), que han demostrado estar implicadas en la homeostasis del sistema inmune (365). En concreto, la vía



PI3K-Akt es una ruta que desempeña un papel crucial en las funciones de las células inmunitarias y también en la vía de coagulación (366). Esta vía regula procesos implicados en el desarrollo de la inmunidad celular, y en la supervivencia, proliferación y en las funciones específicas de las células inmunitarias (367), así como en la respuesta inflamatoria (368). De hecho, Liu *et al.*, describieron que controlando la ruta PI3K-Akt podría controlarse la disfunción cardíaca inducida por la sepsis (369). Además, la ruta FoxO también regula de manera importante la progresión básica del ciclo celular y la homeostasis de los linfocitos, incluyendo una función crítica en la terminación y resolución de una respuesta inmune (365).

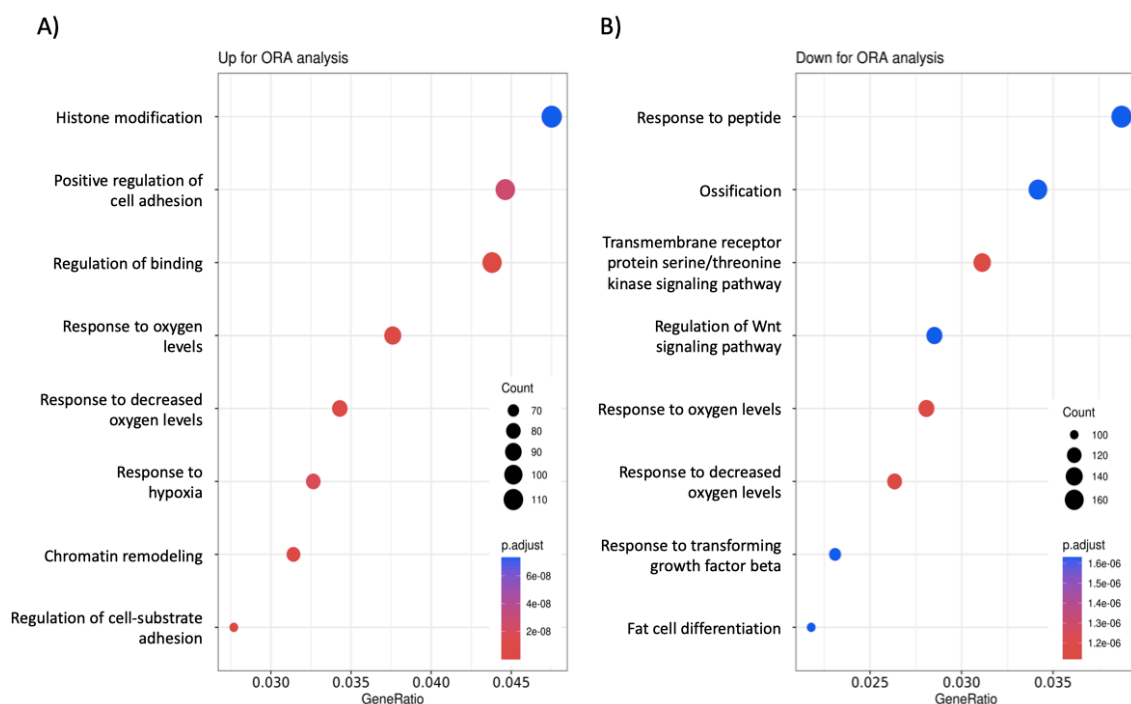


**Figura 40. Principales rutas KEGG obtenidas del análisis ORA para los miRNA sobreexpresados (izquierda) e infraexpresados (derecha).** Gene ratio: número de genes diana para los miRNA significativos obtenidos, respecto al número total de genes que conforman el término en cuestión. Count: número de genes de cada término. p.adjust: p-valor ajustado del test realizado en ORA.

En cuanto a los términos GO, es interesante destacar que la mayoría de las rutas que aparecen relacionadas con los miRNAs sobreexpresados están relacionadas con la modificación de las histonas y la remodelación de la cromatina, los cuales son temas centrales en este trabajo puesto que la modificación post-traducciona de las histonas, como es el caso de la citrulinación, ejerce un papel clave sobre el empaquetamiento de la cromatina (131,253,370,371) y por tanto en la regulación de la expresión génica. Otra de las rutas está implicada en la regulación de los mecanismos de adhesión celular. Particularmente, estos mecanismos los hemos encontrado alterados en estudios *in vitro*, y de hecho observamos una desregulación de la V-CAM y la I-

CAM en las células endoteliales expuestas a histonas extracelulares tanto en condiciones nativas como citrulinadas (Figura 18). En este sentido, nuestro grupo también describió elevados niveles de I-CAM y E-SEL en muestras de plasma de pacientes con sepsis, demostrando que eran candidatos ideales para el diagnóstico y la caracterización de un peor pronóstico de los pacientes (57).

La regulación de la adhesión celular está muy relacionada con la sepsis por estar implicada en el rodamiento y la migración de las células inmunitarias hasta el sitio de infección. Entre ellas, se ha visto que la desregulación de las interacciones de las células endoteliales y los neutrófilos, juegan un papel clave en el curso del daño orgánico y la inflamación (372).

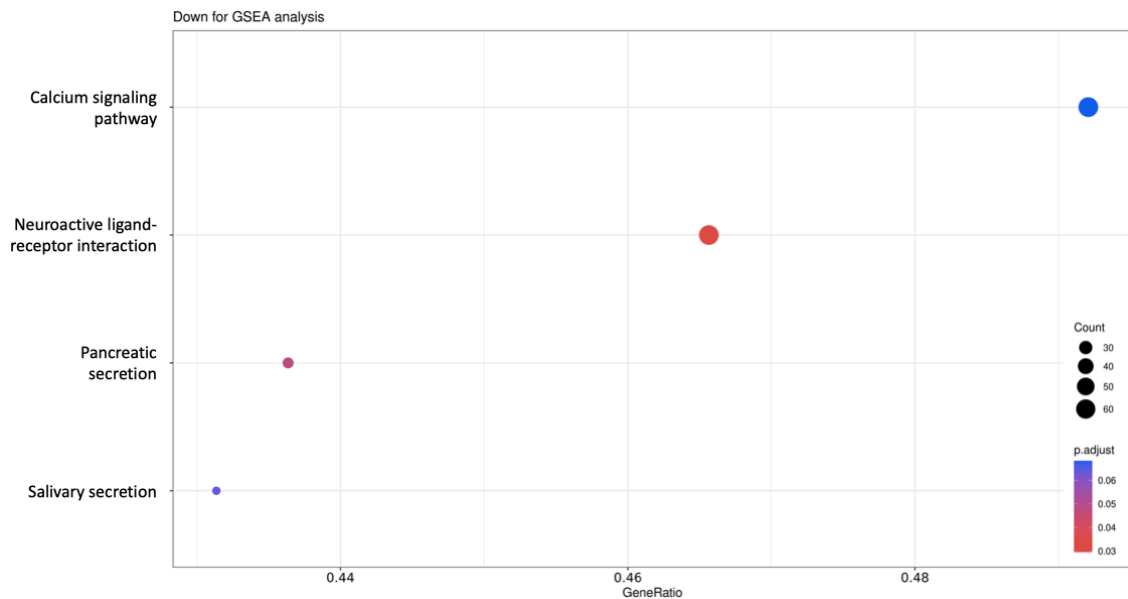


**Figura 41. Principales términos GO obtenidos del análisis ORA para los miRNA sobreexpresados (izquierda) e infraexpresados (derecha).** Gene ratio: número de genes diana para los miRNA significativos obtenidos, respecto al número total de genes que conforman el término en cuestión. Count: número de genes de cada término. p.adjust: p-valor ajustado del test realizado en ORA.

Cuando se realizó el análisis GSEA con un valor ajustado de 0.1, se obtuvo un total de 4 rutas KEGG, todas ellas para los miRNAs infraexpresados (Figura 42). Empleando el mismo análisis para obtener los términos GO, se obtuvo un total de 108 términos, entre los miRNAs sobreexpresados e infraexpresados (Figura 43).

La ruta de señalización del calcio fue una de las rutas más interesantes que se observaron modificadas entre las rutas KEGG (Figura 42). Se han descrito alteraciones asociadas a la

homeóstasis del calcio en pacientes con sepsis, los cuales presentan menores niveles de calcio en plasma, especialmente los pacientes más críticos (373). Müller *et al.*, postulan que la disminución de esos niveles está relacionada con los precursores de la calcitonina (373). De hecho, la procalcitonina es uno de los marcadores empleados en sepsis para identificar si el foco de infección es bacteriano, indicando la necesidad del uso de antibióticos para tratar la infección en estos pacientes (374,375).

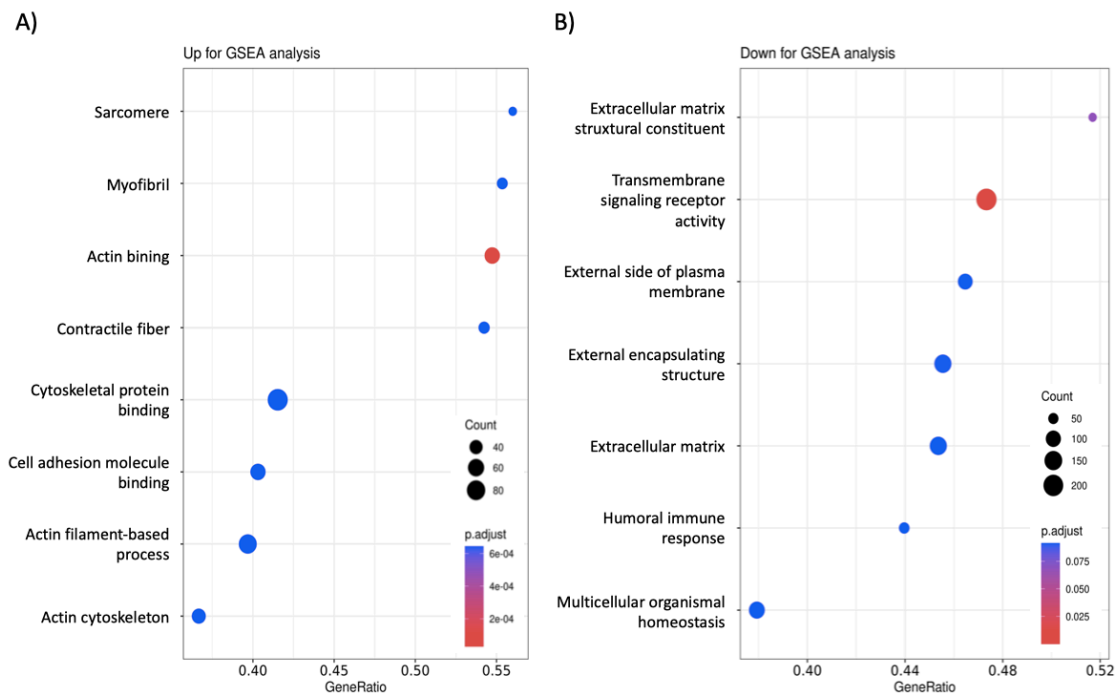


**Figura 42.** Principales rutas KEGG obtenidas del análisis GSEA para los miRNAs infraexpresados. Gene ratio: número de genes diana para los miRNA significativos obtenidos, respecto al número total de genes que conforman el término en cuestión. Count: número de genes de cada término. p.adjust: p-valor ajustado del test realizado en ORA.

Entre las rutas que aparecen relevantes al analizar los principales términos GO (Figura 43), encontramos la unión de la actina y otras previamente descritas en este trabajo, como es el caso de la ruta implicada en las moléculas de adhesión celular (57) o la actividad de receptores transmembrana (como es el caso de los TLRs) (299,300).

Algunas proteínas de unión a la actina se han relacionado con la progresión de la sepsis a fenotipos más severos por la llegada masiva de los neutrófilos a los órganos periféricos (376). Se ha descrito que la extravasación de los neutrófilos (migración) en los tejidos depende de proteínas de unión a actina, como la cortactina, la cual se expresa de manera ubicua en la mayoría de las células, excepto en los neutrófilos. La cortactina endotelial es necesaria para la adecuada regulación de la migración transendotelial y el reclutamiento de los neutrófilos en los sitios de infección (376), por lo que la desregulación de la ruta implicada en las proteínas de unión a la actina puede causar una peor evolución de los pacientes sépticos.

Otras rutas GO descritas gracias al análisis GSEA, se relacionan con la respuesta inmunitaria humoral y la matriz extracelular, comentada previamente. La respuesta humoral está relacionada con las células inmunitarias circulantes, como es el caso de los linfocitos B y T, los cuales se han visto altamente desregulados en sepsis. Observamos que los miRNAs que interaccionan con estas rutas se encuentran infraexpresados, incrementando los niveles de esta respuesta inmunitaria. Esto concuerda con resultados publicados previamente por nuestro grupo, los cuales demuestran que la respuesta adaptativa se activa en los estadios más tardíos de la sepsis (57). Además, cabe recordar que la comparativa que se está analizando es la que se da en pacientes de PICS a diferentes tiempos, comparando la evolución tras 14 días en la UCI con los tiempos iniciales del desarrollo de la sepsis (muestra tomada durante las primeras 24 horas de ingreso en la UCI), lo cual también concuerda con las funciones en las que están involucradas los miRNAs significativos y con los resultados publicados previamente (57).



**Figura 43. Principales términos GO obtenidos del análisis GSEA para los miRNAs infraexpresados.** Gene ratio: número de genes diana para los miRNA significativos obtenidos, respecto al número total de genes que conforman el término en cuestión. Count: número de genes de cada término. p.adjust: p-valor ajustado del test realizado en ORA.

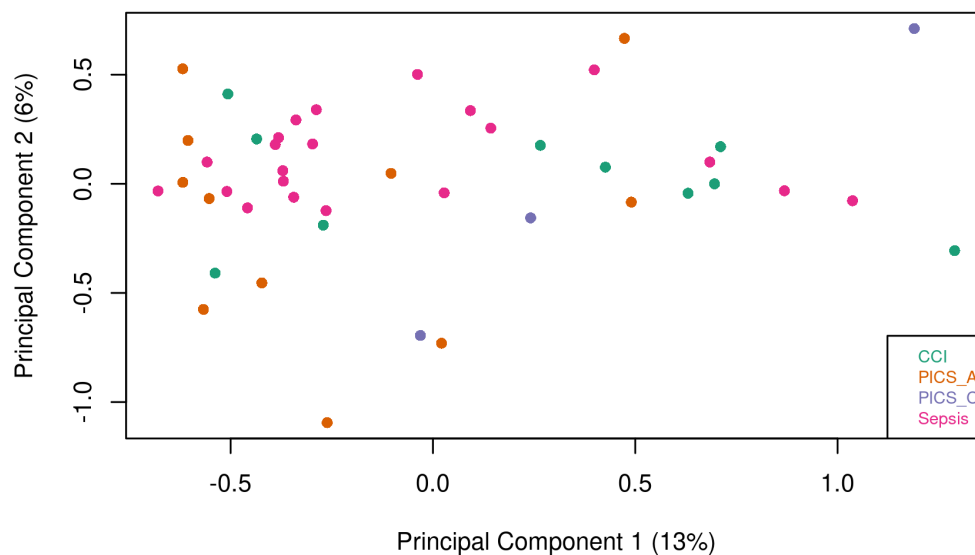
### 6.10. LOS PBMCS DE LOS PACIENTES CON SEPSIS, CON ECC Y PICS PRESENTAN DIFERENTES PATRONES DE METILACIÓN DEL DNA

El análisis de metilación de los sitios CpG se realizó mediante el array EPIC 850K de Illumina, empleando las mismas muestras sobre las que se analizó el miRNoma. Estos pacientes estaban ingresados en la UCI del HCUV, categorizados como pacientes sépticos (21 muestras de 1ª toma, correspondiente a la muestra tomada durante las primeras 24 horas de ingreso en la UCI), ECC (10 muestras de 1ª toma) y PICS (11 de 1ª toma y 4 de 3ª toma, correspondiente a la muestra tomada a los 14 días de estancia en UCI). Los detalles clínicos de cada grupo de pacientes se presentan en el apartado 5.10 (Figura 11 y 13 de materiales y métodos; Tabla Suplementaria 1 y Tabla 13). Recordemos que los pacientes con ECC (Enfermos Críticos Crónicos) se definen como pacientes con sepsis que llevan al menos 7 días ingresados en UCI con un fallo orgánico en curso y con necesidad de ventilación mecánica (79). Los pacientes con PICS (Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión) son pacientes con sepsis ingresados al menos 14 días en UCI y que cumplen los criterios de Gentile *et al.* (ver apartado de material y métodos punto 5.10) (84).

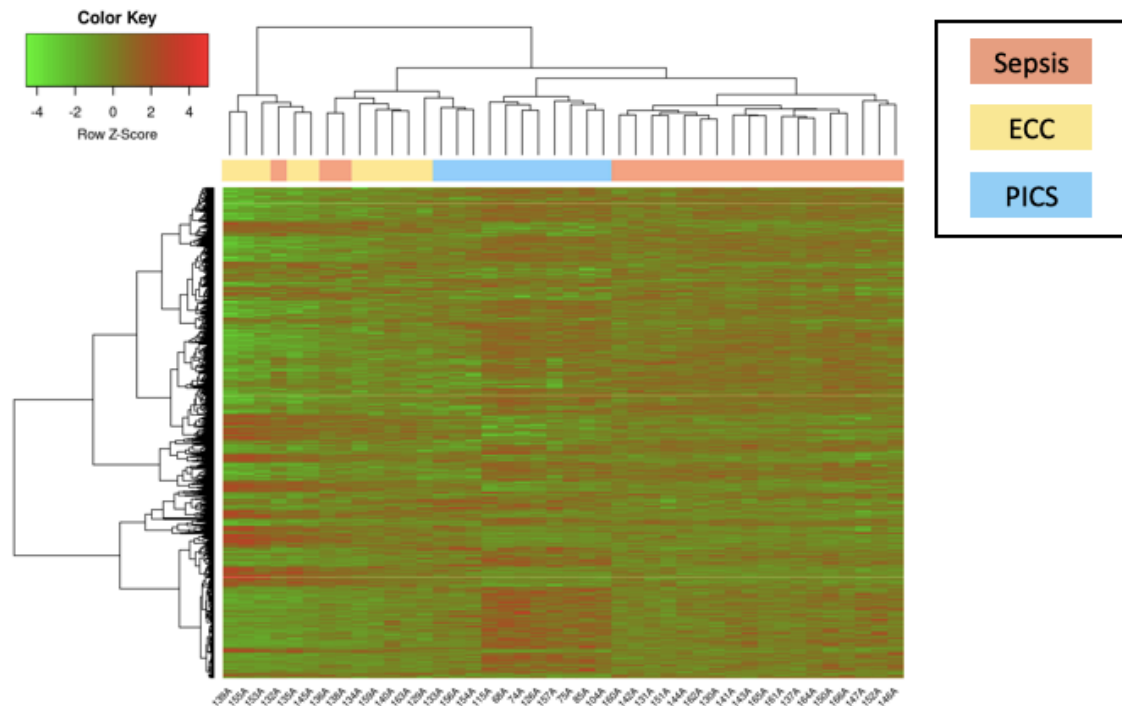
El objetivo de este análisis fue encontrar patrones diferenciales de metilación tanto a nivel de sitios CpG (*differentially methylated positions* o DMP) como a nivel de región de metilación (*differentially methylated regions* o DMR), con un peso estadístico significativo ( $FDR < 0.05$ ) entre los distintos grupos experimentales para realizar análisis de sobrerrepresentación de rutas KEGG y términos GO y comprender los mecanismos moleculares que están ocurriendo durante estos fenotipos. Las comparaciones realizadas fueron: ECC vs sepsis, PICS vs sepsis, ECC vs PICS y PICS-C (3ª toma) vs PICS-A (1ª toma).

En primer lugar, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), excluyendo la edad y el sexo de los pacientes, para observar cómo se agrupaban las muestras (Figura 44). A pesar de que existe cierta agrupación de algunas muestras de un mismo conjunto experimental, como es el caso de las muestras de sepsis, los resultados obtenidos mostraron que muchas de las muestras no se agruparon y presentaron una distribución aleatoria que no separa los diferentes grupos de pacientes. En base a estos resultados, se realizó un análisis de posiciones con metilación diferencial entre las muestras obtenidas durante las primeras 24h y se realizó un mapa de calor con los 1000 sitios CpG que presentan un menor p-valor ajustado de la prueba F de Fisher. Cabe destacar que, aunque no se obtuvo ninguna sonda significativa para CpGs individuales (con un  $FDR < 0.05$ ), el análisis permitió la clasificación de los distintos grupos de pacientes utilizando los 1000 sitios CpG (Figura 45). En este análisis jerárquico se puede observar que hay una agrupación

casi perfecta con unos patrones de metilación muy definidos. Las muestras de los pacientes con PICS (presentados en el centro de la figura 45) mostraron mayores cambios de metilación, y más marcados, a tiempos iniciales que los pacientes con sepsis o con ECC. Así mismo, a la izquierda de la figura se ubicaron los pacientes con ECC, los cuales también presentan unos cambios de metilación muy marcados, como permiten ver las líneas rojas, mucho más delimitadas que en el caso de los pacientes sépticos, presentados a la derecha de la figura bajo el color naranja. Así pues, cabe destacar que los pacientes con sepsis presentan unas respuestas inmunes muy heterogéneas (377), lo cual podría explicar los tres pacientes sépticos que encontramos clasificados como ECC. Si bien los pacientes con ECC son pacientes sépticos con mayor susceptibilidad de padecer afecciones funcionales y comorbilidades a largo plazo (378), los cambios en los patrones de metilación del DNA de las células inmunitarias podrían ser un factor determinante para entender qué ocurre con estos pacientes a largo plazo, empleando los cambios de metilación entre grupos como biomarcadores de pronóstico.



**Figura 44. Exploración de los datos: Análisis de Componentes principales (PCA) de datos de metilación** de pacientes con sepsis, ECC (CCI en la figura) y PICS a diferentes tiempos (A: muestra tomada durante las primeras 24h de ingreso del paciente en UCI; C: muestra tomada durante el 14º día de ingreso en UCI).



**Figura 45. Mapa de calor de metilación del DNA** comparando las 1000 sondas CpG con menor p-valor ajustado (test F) de pacientes con sepsis, ECC (CCI en la figura) y PICS. La métrica de metilación utilizada para obtener el mapa de calor son las puntuaciones z calculadas a partir de los valores beta, 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.

A continuación, se llevaron a cabo los análisis de metilación diferencial siguiendo la metodología del paquete Limma para las 4 comparaciones 2 a 2 indicadas anteriormente, y no se obtuvo ninguna DMP (differentially methylated position, CpG) significativa. Puesto que no se encontraron DMPs con el análisis Limma, se analizó todo el conjunto de datos con el método mCSEA, con el fin de buscar diferencias de metilación más sutiles entre las distintas muestras, y así encontrar DMRs (differentially methylated regions) entre los grupos. Los resultados obtenidos de este análisis se muestran en la Tabla 20. Como se puede comprobar, se obtuvieron DMRs para las 4 comparaciones, siendo la comparación de PICS vs. ECC la que más DMRs presentó y la comparación PICS vs. Sepsis la que menos. En este sentido, cabe destacar que cuando se procedió a analizar las rutas enriquecidas por la metilación diferencial en cada comparación, mediante los análisis KEGG y GO, la comparación entre PICS y sepsis no mostró ninguna ruta enriquecida para este subtipo clínico de paciente de sepsis.

**Tabla 20.** DMR obtenidos en genes y promotores con mCSEA entre las distintas comparaciones de grupos experimentales con un p-valor ajustado < 0.05

Comparación	Promotor	Gen
ECC (A) vs. Sepsis	607	541
PICS (A) vs. Sepsis (A)	288	179
PICS (A) vs. ECC (A)	1158	1000
PICS (C) vs. PICS (A)	662	733

Más adelante, en cada comparación y en los documentos anexos (apartado 11), se muestran algunos de los genes más relevantes obtenidos en cada comparación ([https://n9.cl/anexosphd\\_rov](https://n9.cl/anexosphd_rov)). Sobre ellos se realizaron los gráficos relacionados con el análisis mCSEA y, aquellos que presentaron mayores diferencias de metilación se seleccionaron como los más relevantes. Aquellos que presentaron menores diferencias de metilación se muestran en la sección de Anexos (apartado 11).

#### 6.10.1. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL ENTRE ECC Y SEPSIS

Para el análisis de las rutas KEGG o procesos *Gene Ontology* (GO) enriquecidos en DMRs significativos situados en genes o promotores, se empleó el análisis ORA. Se analizaron los cambios de metilación y se presentaron los términos GO referentes a los procesos biológicos más alterados (Figura 46). El primer grupo comparado fueron los pacientes con ECC (pacientes sépticos ingresados al menos 7 días en UCI y con necesidad de ventilación mecánica (79)) y pacientes con sepsis en muestras obtenidas durante las primeras 24h de ingreso en UCI (ver Figuras 11 y 13).

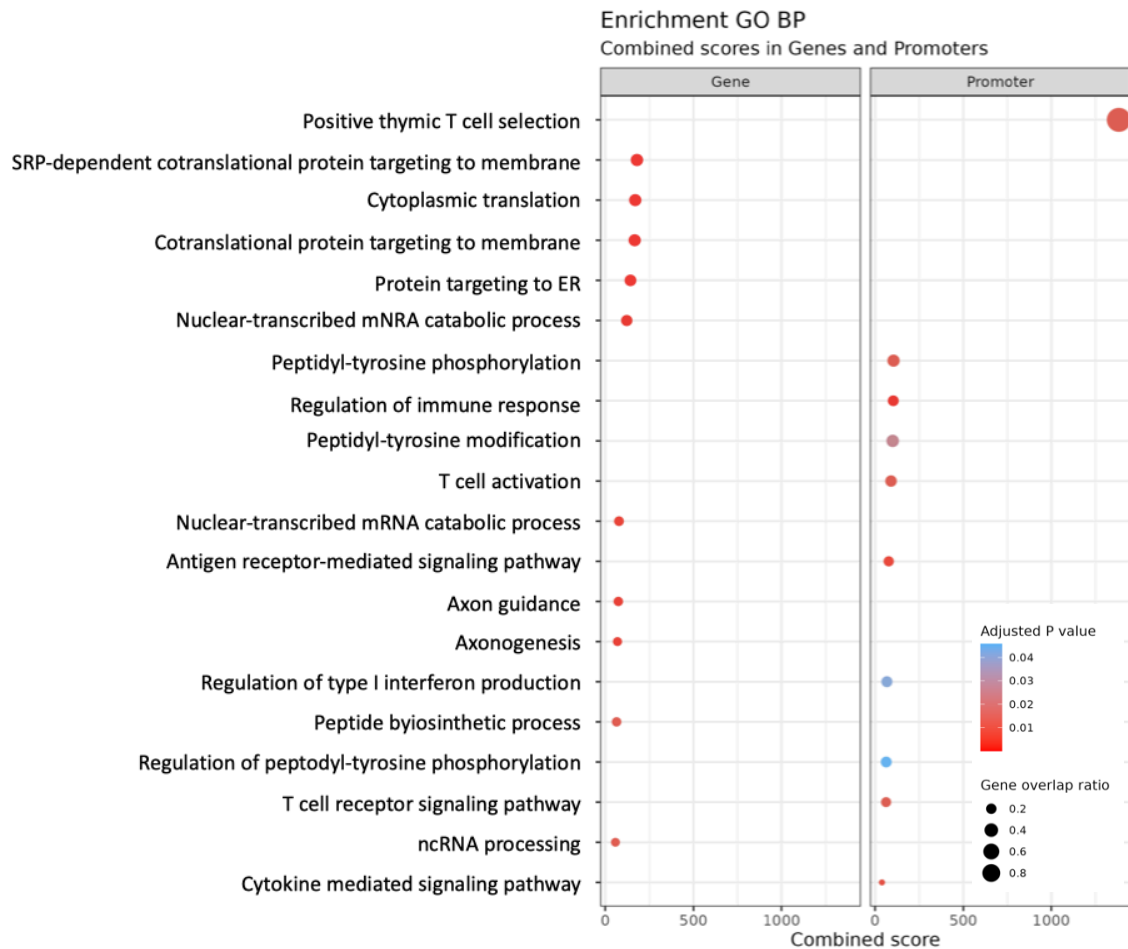
En la Figura 46 donde se muestran algunos de los términos GO más relevantes se puede observar que muchas de las funciones más representadas están relacionadas con el sistema inmunitario. Algunas de estas son las vías de señalización mediadas por citoquinas, las vías de señalización mediadas por los receptores a antígenos y la regulación de la producción del interferón tipo I, que es un tipo de citoquina que juega un papel fundamental en la activación del sistema inmunitario y de la inflamación, así como en la activación de células T (379), que son los linfocitos que juegan un papel principal en la inmunidad adaptativa. De hecho, algunas de las rutas que se ven presentadas en esta figura resaltan el papel principal de estas células, como es el caso de la activación de células T, la selección positiva de células T en el timo o la vía de señalización de receptores de células T.



Como se puede observar (Figura 46), los mayores cambios de metilación diferencial encontrados se corresponden con la ruta de selección positiva de los linfocitos T, concretamente a nivel de promotores, lo cual indica una potente remodelación de la producción de estas células. Además, se encontraron cambios de metilación a nivel de genes en la activación de las células T y en la ruta de señalización de las células T, apoyando la idea de la remodelación mediada por patrones de metilación de los linfocitos T. Así mismo, también se encontraron cambios en los niveles de metilación en las vías de producción de diferentes citoquinas, así como con la producción del interferón de tipo 1, que incluye el IFN- $\alpha$  y el IFN- $\beta$ , los cuales juegan un papel principal en la activación del sistema inmunitario (379). Es interesante destacar que también se encontraron alterados los niveles de metilación correspondientes a RNAs no codificantes, como son los miRNAs, lo cual indica que es probable que la modulación de los niveles de metilación durante la sepsis altere en cierta medida otras formas de regulación epigenética, como es la regulación a través de RNAs no codificantes, como se ha demostrado recientemente en algunos tipos de cancer (380).

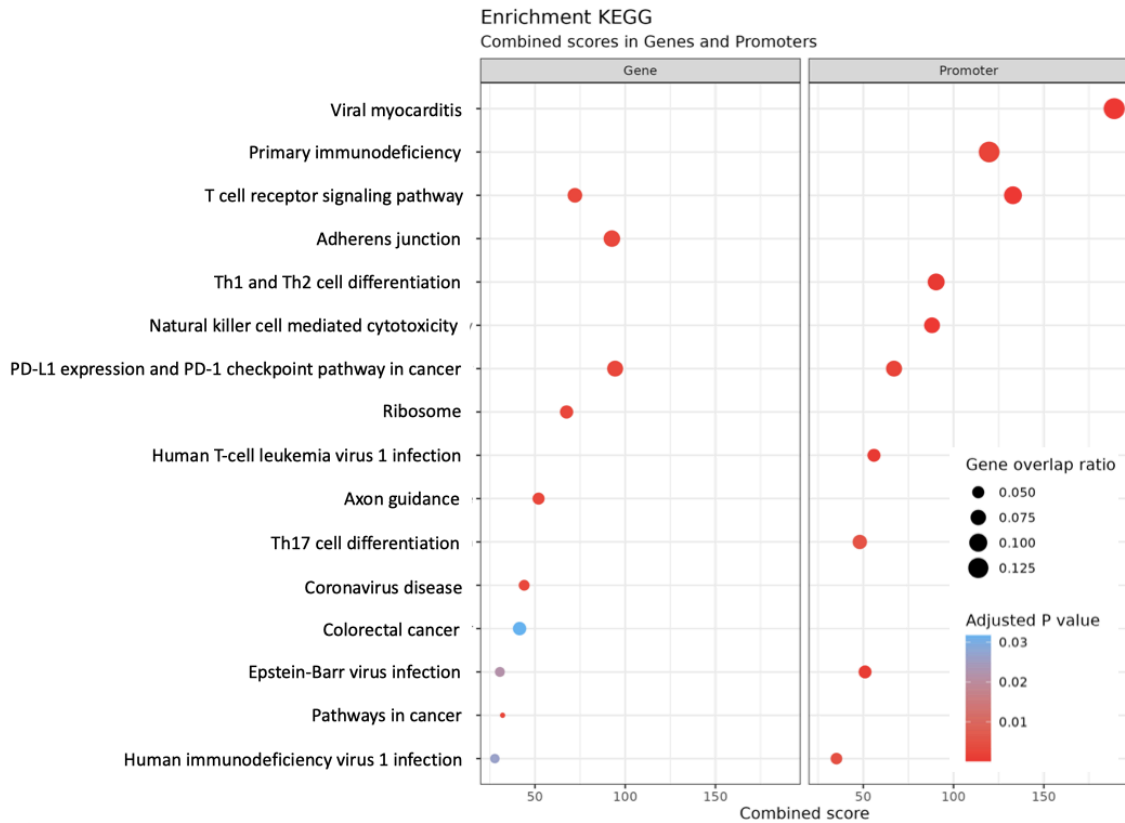
Por tanto, las principales rutas diferencialmente alteradas entre los pacientes con ECC y aquellos con sepsis se corresponden, en su mayoría, a la regulación del sistema inmunitario. Principalmente, la inmunidad adaptativa a través de la modulación en la producción y activación de los linfocitos T, lo cual afecta de forma directa a la progresión de la enfermedad, así como a fenómenos de inmunosupresión ocasionados por un sistema inmunitario exhausto.

Al centrarnos en las rutas KEGG (Figura 47), observamos que los cambios en los patrones de metilación son muy similares a los obtenidos en el análisis de los términos GO, resaltando la importancia de los linfocitos T. No obstante, las rutas KEGG nos permiten profundizar en esta alteración de los linfocitos T, observando que la mayor alteración en los niveles de metilación se corresponde con los linfocitos T “helper”, tanto a nivel de genes como de promotores. Esto es especialmente interesante porque se considera que los linfocitos T helper (células T auxiliares) son las células más importantes en la inmunidad adaptativa, ya que son necesarias para casi todas las respuestas inmunitarias adaptativas. Esto se debe a que, no solo ayudan a activar a las células B para que secreten anticuerpos y activen macrófagos para destruir los microbios ingeridos, sino que también ayudan a activar las células T citotóxicas para lisar las células diana infectadas (381). Así mismo, cabe resaltar que también se encontraron alterados entre ambos grupos los niveles de metilación de la respuesta de los linfocitos NK, concretamente a nivel de promotor, lo cual apoya la remodelación epigenética a nivel de metilación que ocurre en los pacientes de ECC.



**Figura 46.** Principales términos GO obtenidos del análisis ORA para los genes y promotores inframetilados en la comparación de pacientes con ECC y sepsis. El eje “y” representa los 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 p-valor ajustado obtenido para los términos del test realizado en ORA del análisis de sobrerrepresentación determina el color de los puntos.

Otra de las rutas KEGG observada en esta comparación, es la expresión de PD-L1 (ligando de muerte celular programada) y PD-1 checkpoint en cáncer. Tanto PD-1 como PD-L1 son puntos clásicos de inhibición inmune, considerados como estrategias prometedoras para el tratamiento de tumores, por su capacidad de inhibir ciertas respuestas inmunitarias (382). En el caso del ambiente tumoral, se ha observado que los macrófagos asociados a tumores juegan un papel clave en la inmunosupresión regulada por PD-1/PD-L1, puesto que inhiben el reclutamiento y la función de las células T a través de de citoquinas, exosomas y ligandos inmunitarios (382). En este sentido, controlar estos puntos de inhibición inmune puede ser una estrategia a considerar para elaborar nuevas terapias que permitan el tratamiento de la sepsis, pues inhibir la respuesta exacerbada que ocurre durante el inicio de la sepsis (292), podría evitar la cascada de eventos consiguientes y, por lo tanto, la progresión de la sepsis a estadios más severos como ECC o PICS.



**Figura 47. Principales términos KEGG obtenidos del análisis ORA para los genes y promotores inframetilados en la comparación de pacientes con ECC y sepsis.** El eje “y” representa los 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 p-valor ajustado obtenido para los términos del test realizado en ORA del análisis de sobrerrepresentación determina el color de los puntos.

#### 6.10.1.1. PROMOTORES Y GENES CON METILACIÓN DIFERENCIAL ENTRE ECC Y SEPSIS

Centrándonos en los diferentes promotores y genes (607 y 541, respectivamente; [https://n9.cl/anexosphd\\_rov](https://n9.cl/anexosphd_rov)) encontrados dentro de esta comparación, se hizo una selección de los mismos según el p-valor y la función biológica de los mismos. Además, se cribaron los genes repetidos en otras comparaciones, con el fin de obtener aquellos que eran capaces de discernir de manera más específica, durante los estados iniciales de la sepsis, a los pacientes que desarrollarían ECC de los pacientes con sepsis (Tabla 21). Es importante destacar que los 3 promotores y los 4 genes seleccionados se encontraron hipometilados, por lo que sería esperable encontrar los genes que regulan más expresados.

**Tabla 21.** Promotores y genes seleccionados de la comparación de pacientes Enfermos Críticos Crónicos y pacientes con sepsis. Abreviaturas: P-adj: P-valor ajustado; N.A.: no aplicable.

Promotor	Gen	P-valor	P-adj	Metilación
CCR6	-	2,92E-06	0,0009	Hipometilado
LGALS3BP	-	6,34E-06	0,0015	Hipometilado
HLA-DMB	-	6,42E-06	0,0015	Hipometilado
-	TCF7	3,32E-06	0,0007	Hipometilado
-	LEF1	2,38E-06	0,0006	Hipometilado
-	CD28	0,0001	0,0100	Hipometilado
N-A	IL12RB2	0,0003	0,0164	Hipometilado

Los 3 promotores (Tabla 21; Figuras Suplementarias 1-3) y los 4 genes seleccionados (Tabla 21; Figuras 48-50) de esta comparación fueron representados mediante el análisis mCSEA y se localizaron en el genoma de referencia con el fin de observar dónde se hallaban los DMRs diferenciales y definir así las posiciones del DMR con mayor diferencia en la metilación, con el fin de posteriormente poder realizar una validación de esta metilación diferencial.

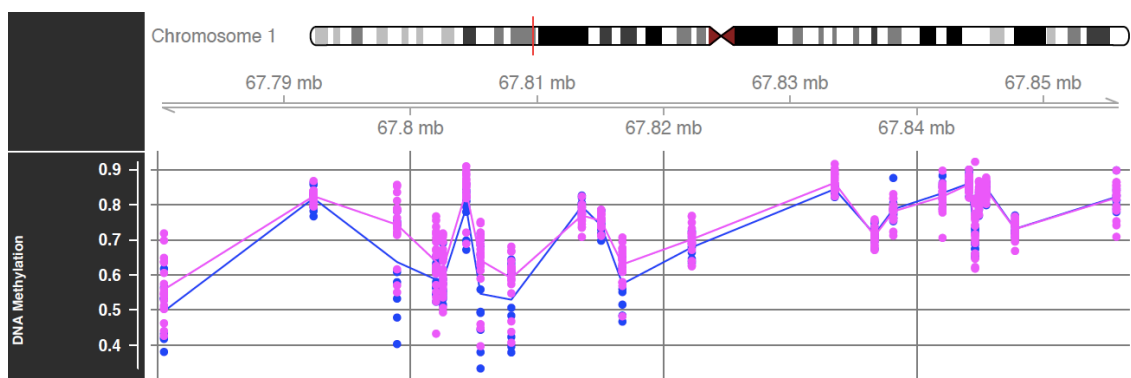
Todos los genes y promotores seleccionados tenían funciones biológicas que han sido previamente relacionadas con la sepsis. Por ejemplo, *LGALS3BP* (Figura suplementaria 1) codifica para una proteína cuya función está relacionada con las uniones célula-célula. Esto es muy interesante porque en resultados anteriores vimos que los pacientes con sepsis presentan alteraciones en el endotelio, pudiendo verse afectada la unión de las células endoteliales (383) causando un aumento de la permeabilidad, lo cual contribuye a un aumento de la inflamación (384,385). Además, este gen ya ha sido postulado por otros autores como un posible biomarcador de diagnóstico y pronóstico de la sepsis (386), lo cual concuerda con nuestros resultados por presentar una metilación diferencial en los pacientes con sepsis y ECC durante las primeras 24h de ingreso en UCI de los pacientes.

Otro promotor con metilación diferencial estudiado fue el *HLA-DMB* (Figura suplementaria 3). La familia de genes *HLA* está implicada en la presentación de antígenos. Se ha descrito que los cambios de expresión de los *HLA* pueden afectar a la función de los linfocitos T *helper*, viéndose asociados con fenómenos de inmunosupresión (387). En esta cohorte de pacientes, donde los fenómenos de inmunosupresión a largo plazo son una de sus características más relevantes, este gen gana especial relevancia, puesto que hallar diferencias de metilación en estadios iniciales de la sepsis, podría explicar los problemas relacionados con el sistema inmunitario que se observan en el futuro.

En la Figura 48 se presenta el gráfico mCSEA para el gen *IL12RB2*. Este gen está implicado en la respuesta de la inmunidad innata (células NK) y de la inmunidad adaptativa (linfocitos Th1 y Th2). Snyder *et al.* encontraron alterada la expresión transcriptómica de este gen en niños con shock séptico y lo relacionaron con problemas de inmunoparálisis (388), posicionando este gen como un buen candidato capaz de indicar la inmunosupresión a largo plazo. Esto correlaciona con nuestros resultados, ya que encontramos hipometilación de este gen en los pacientes con ECC respecto a los pacientes con sepsis, indicando una sobreactivación en sus niveles de expresión, lo que puede culminar con un sistema inmune exhausto y, por lo tanto, con inmunosupresión a largo plazo del paciente. Así mismo, el trabajo de Cazalis *et al.*, encontró alterados los niveles de expresión de *LEF1* (Figura 49) en pacientes con shock séptico que tardaban en recuperarse. Además, asociaron la función de este gen a la activación del sistema inmune y a procesos de muerte celular (389). Debido a que nosotros también encontramos cambios en la metilación de este gen, concretamente menores niveles de metilación en pacientes con ECC que en pacientes con sepsis, podemos pensar que este gen también estaría regulando una inmunosupresión a largo plazo en los pacientes con sepsis que desarrollan ECC.

Finalmente, el gen *TCF7* se ha relacionado con la producción de factores inflamatorios (390) y es clave para el desarrollo y diferenciación de las células T. En nuestros resultados observamos cambios en la metilación de este gen (Figura 49), que podrían participar en la inmunosupresión a largo plazo de estos pacientes.

Como hemos visto, los genes seleccionados en esta comparación están todos relacionados con la inmunidad adaptativa, más concretamente, con las células T, las cuales son los principales efectores de la respuesta adaptativa. En este sentido, se ha postulado que los déficits de la inmunidad adaptativa son los que causan mayor mortalidad en los pacientes supervivientes a una sepsis (273).



**Figura 48. Representación mCSEA para el gen *IL12RB2*.** El color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con ECC, el color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con sepsis.

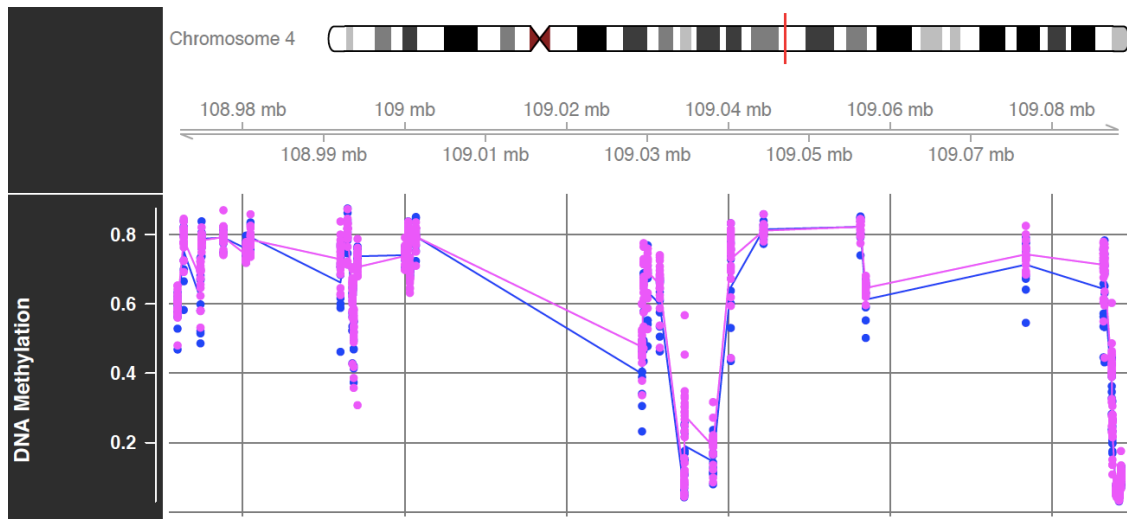


Figura 49. Representación mCSEA para el gen LEF1. El color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con ECC, el color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con sepsis.

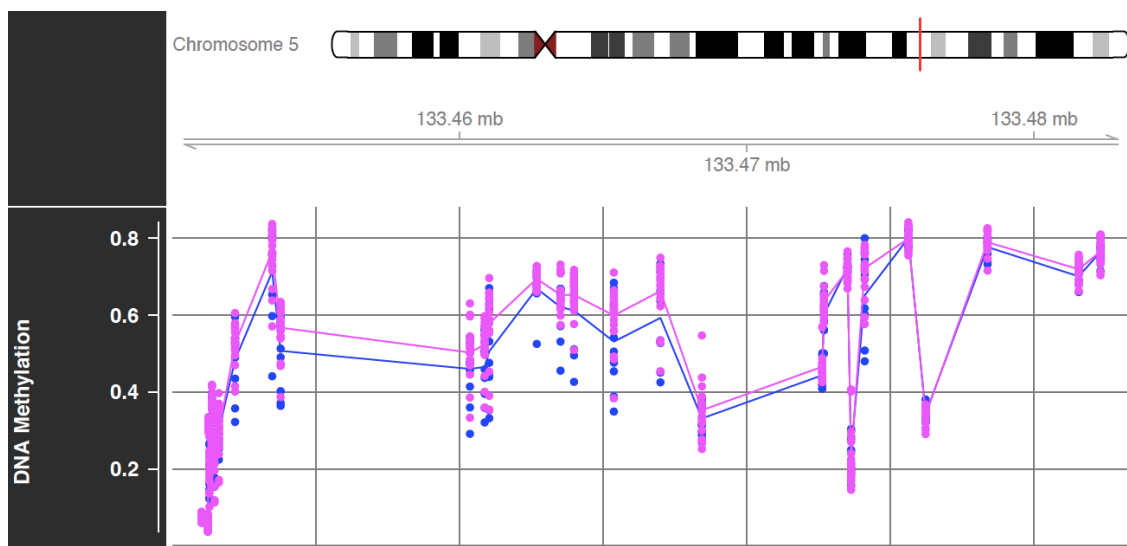


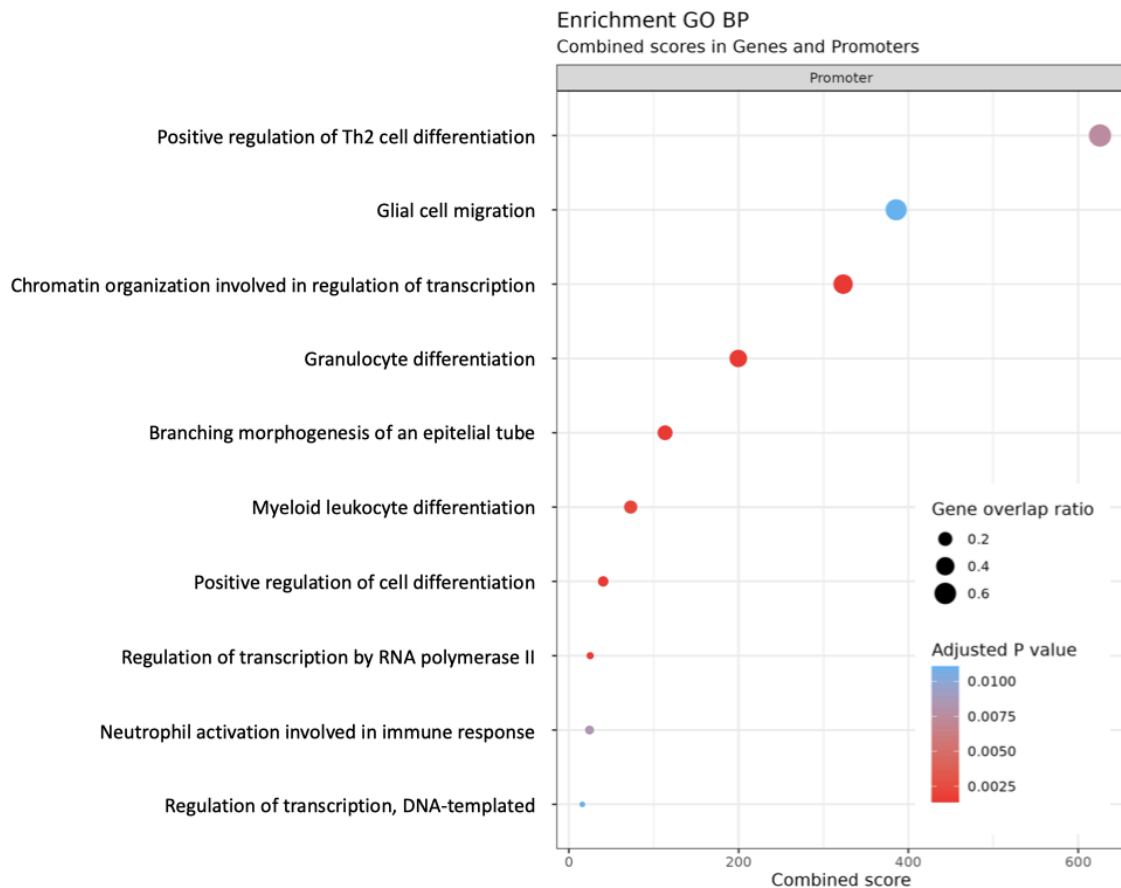
Figura 50. Representación mCSEA para el gen TCF7. El color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con ECC, el color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con sepsis.

#### 6.10.2. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL ENTRE PICS Y ECC

En cuanto a la comparación entre PICS y ECC se encontraron rutas GO en procesos biológicos sobregulados e infraregulados (Figuras 51 y 52). Recordemos que los pacientes con PICS son pacientes con sepsis ingresados al menos 14 días en UCI y que cumplen características inmunitarias y metabólicas concretas (84), mientras que los pacientes con ECC son pacientes sépticos ingresados al menos 7 días en UCI y con necesidad de ventilación mecánica (79).

En el caso de la hipometilación (Figura 51), solo se encontraron promotores alterados relacionados, al igual que en la comparativa anterior, con el sistema inmunitario. En este caso, también se observó una desregulación a la baja de la metilación correspondiente a las rutas relacionadas con las células T y una hipometilación relacionada con la regulación positiva de la diferenciación a células T helper de tipo 2 (Th2), capaces de orquestrar las respuestas inmunitarias protectoras de tipo 2, como son las que ayudan en la reparación de tejidos dañados. En este sentido, cabe destacar que el trabajo de Ferguson *et al.*, publicado a finales de los 90, ya encontró alteraciones en los niveles de Th2 disponibles en muestras de plasma de pacientes sépticos en comparación con controles (391). Por ello, y debido a que estas células también se han relacionado con el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas, como es el caso del asma o las alergias (392), estas rutas GO alteradas podrían estar relacionadas con comorbilidades asociadas a largo plazo de la sepsis.

La diferenciación de granulocitos, entre los que se encuentran los neutrófilos, también es otra de las rutas que se encontró hipometilada, lo que indica una mayor activación. En esta línea, la activación de neutrófilos implicados en la respuesta inmunitaria, también se encontró sobrerregulada en los pacientes con PICS a tiempos iniciales. Esto significa que en los pacientes de PICS, no solo existe una alteración en la función de los linfocitos T, especialmente en los linfocitos T helper, sino también en otras células inmunitarias como son los neutrófilos o las células dendríticas, indicando una mayor desregulación del sistema inmunitario en estos pacientes. Esto concuerda con el perfil clínico de los pacientes, ya que este grupo de pacientes se caracteriza por una desregulación inmune profunda, asociada generalmente con fenómenos de inmunosupresión y alteraciones catabólicas, desencadenando un peor pronóstico.



**Figura 51. Principales términos GO obtenidos del análisis ORA** para los promotores hipometilados en la comparación de pacientes con PICS y ECC. El eje “y” representa los 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 p-valor ajustado obtenido para los términos del test realizado en ORA del análisis de sobrerepresentación determina el color de los puntos.

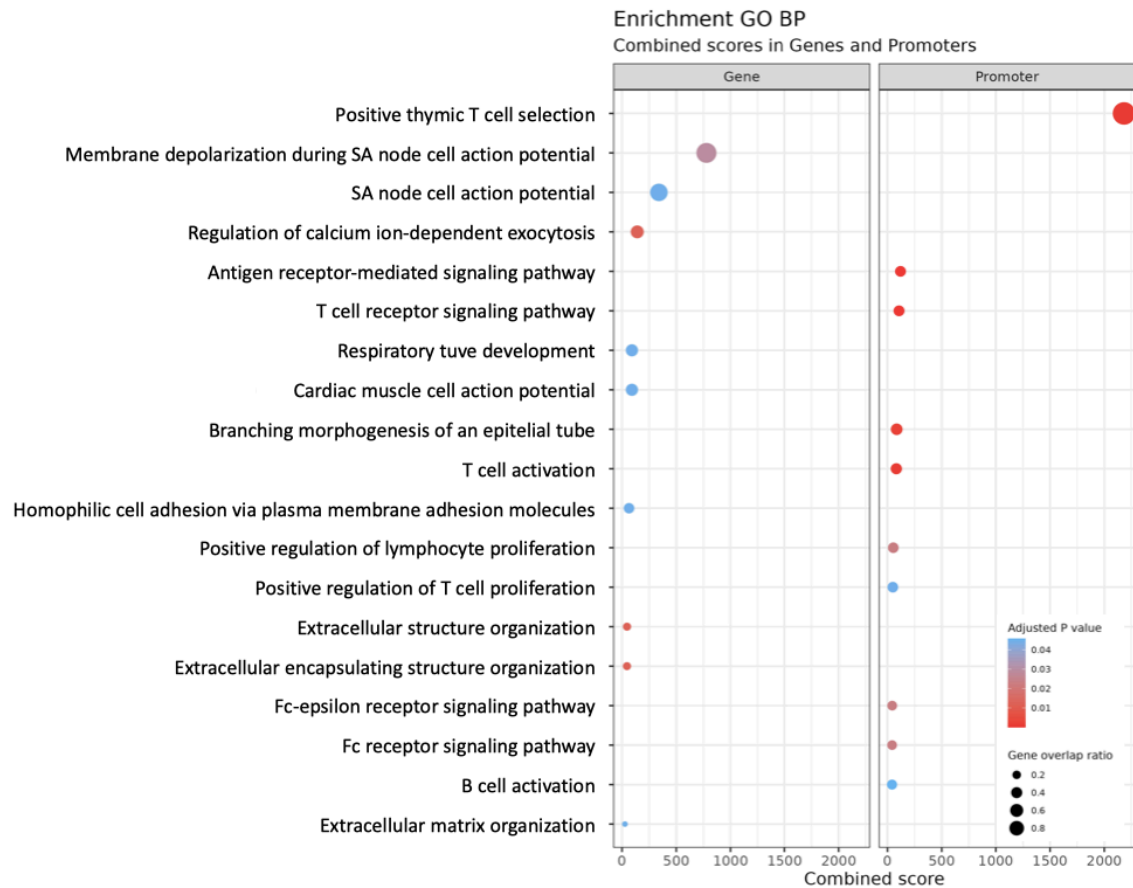
Al centrarnos en las rutas que presentan un incremento en los niveles de metilación de los pacientes de PICS en comparación con los de ECC, observamos una hipermetilación en los promotores implicados en la selección positiva de células T en el timo (Figura 52), al contrario de lo que observábamos en la comparación entre ECC y sepsis, que encontramos esta ruta hipometilada. Estos resultados sugieren que los pacientes con PICS estarían produciendo una menor cantidad de células T, puesto que la hipermetilación se asocia a una reducción de la expresión por compactación de la cromatina. Esto se complementa con la ruta de proliferación de los leucocitos, y las de activación y proliferación de células T, las cuales también aparecen hipermetiladas en esta comparación (Figura 52). Del mismo modo, en esta comparación también observamos una hipermetilación en la ruta de señalización mediada por los receptores a antígenos, la cual también estaba hipometilada en la comparación de pacientes con ECC y sepsis. Esto explicaría porqué los pacientes con PICS poseen una inmunosupresión severa, ya que, como muestran nuestros resultados, existe una remodelación profunda de la metilación del ADN en



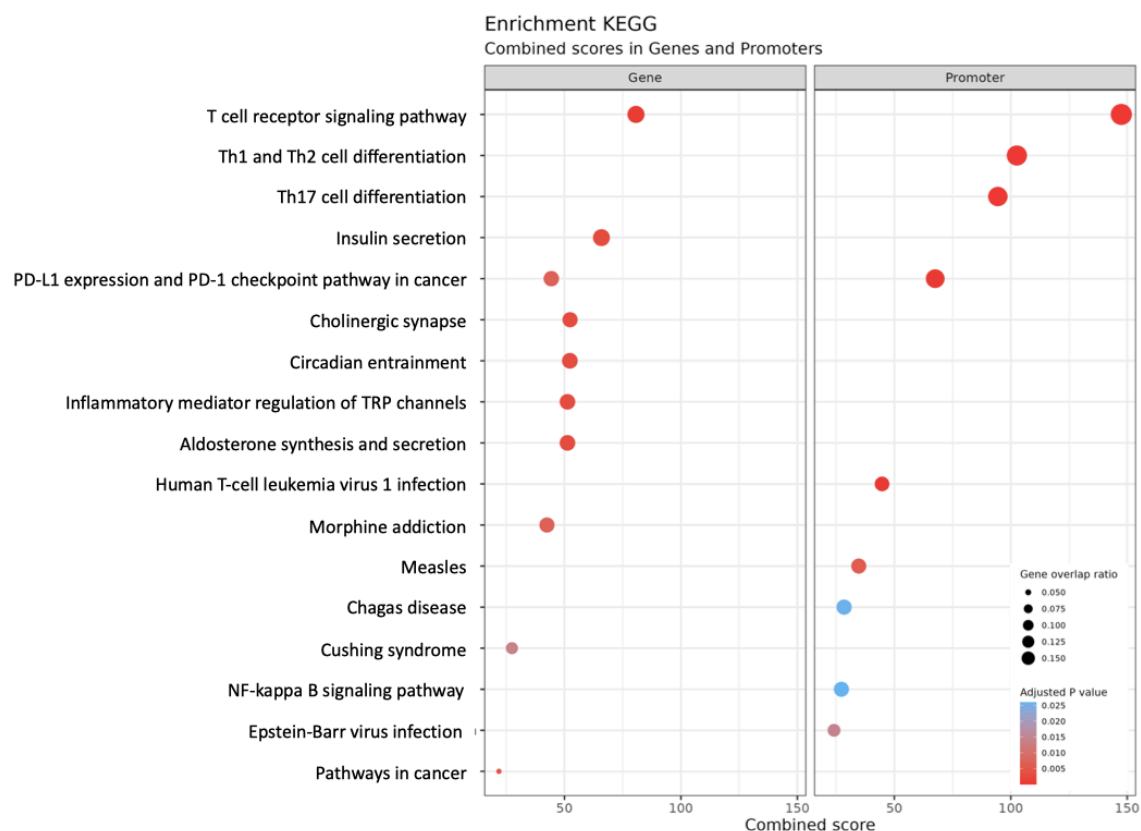
genes clave incluidos en rutas del sistema inmunitario. Esto da como resultado una peor respuesta mediada por la presentación de antígenos, una desactivación de los linfocitos T, e incluso problemas de activación con la diferenciación mieloide (macrófagos y células dendríticas), así como una alteración de la respuesta de los neutrófilos.

Cabe destacar que en esta comparación (Figura 52) también observamos genes hipermetilados de la ruta de la activación de las células B, indicando que hay una desregulación considerable en el sistema inmunitario adaptativo (tanto linfocitos T como linfocitos B) en los pacientes con PICS desde tiempos iniciales de la sepsis. Medir estos parámetros en el momento de ingreso del paciente aportará información muy relevante sobre el estado y pronóstico del paciente, ya que saber que el paciente va a desarrollar un PICS, antes de que este incluso se categorice como ECC, lo que indica que su estancia en la UCI va a ser, al menos, de 14 días. Además, el riesgo de mortalidad durante los siguientes dos años se verá incrementado (393), puesto que la desregulación del sistema inmunológico indica que el paciente sufrirá una remodelación inmune severa durante el desarrollo de la enfermedad, lo cual puede derivar directamente en inmunosupresión y alteraciones de catabolismo, que característico de los pacientes con PICS (78).

Finalmente, entre las rutas hipermetiladas en esta comparación (PICS vs ECC), observamos la ruta de señalización del receptor Fc (Figura 52). La proteína Fc forma parte de la cadena ligera de los anticuerpos, y la alteración del receptor de estas moléculas, junto a una alteración de la activación de los leucocitos B encargados de liberar los anticuerpos, indica un desbalance grave en estos pacientes, ya que toda la respuesta inmunitaria adaptativa se estaría viendo comprometida. Además, los receptores Fc controlan la inmunidad innata y humoral, las cuales son esenciales para responder adecuadamente a las infecciones y prevenir la inflamación crónica (394), como la que se da en los pacientes con PICS.



**Figura 52.** Principales términos GO obtenidos del análisis ORA para los genes y promotores hipermetilados en la comparación de pacientes con PICS y ECC. El eje “y” representa los 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 p-valor ajustado obtenido para los términos del test realizado en ORA del análisis de sobrerrepresentación determina el color de los puntos.



**Figura 53. Principales términos KEGG obtenidos del análisis ORA** para los genes y promotores hipermetilados en la comparación de pacientes con PICS y ECC. El eje “y” representa los 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 p-valor ajustado obtenido para los términos del test realizado en ORA del análisis de sobrerrepresentación determina el color de los puntos.

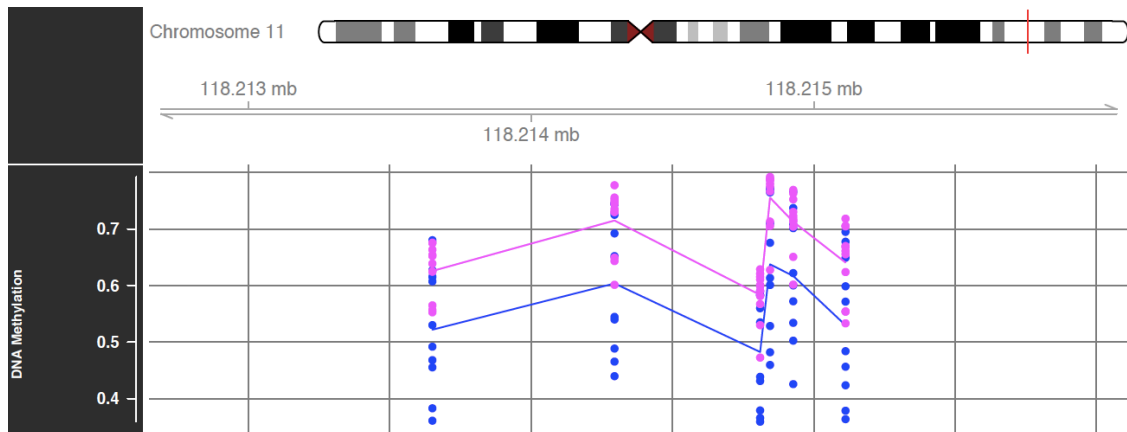
#### 6.10.2.1. PROMOTORES Y GENES CON METILACIÓN DIFERENCIAL ENTRE PICS Y ECC

En esta comparación surgieron 1158 promotores y 1000 genes con DMRs significativas ([https://n9.cl/anexosphd\\_rov](https://n9.cl/anexosphd_rov)). A partir de estos datos se realizó un cribado según el p-valor y la función biológica, evitando seleccionar los genes repetidos en otras comparaciones, con el fin de escoger sólo aquellos que discernían, a tiempos iniciales, a los pacientes con sepsis que desarrollarían ECC de aquellos que desarrollarían PICS. Los promotores y genes seleccionados para esta comparación se muestran en la Tabla 22. Tras cribar los datos, según el p-valor y la función biológica de los mismos, y reducirlos a 7 promotores y 2 genes se realizaron las representaciones mCSEA de cada uno de ellos (Figuras 54-58 y Figuras anexas 5-8) y se seleccionaron los que más diferencias de metilación presentaron (Figuras 40-44).

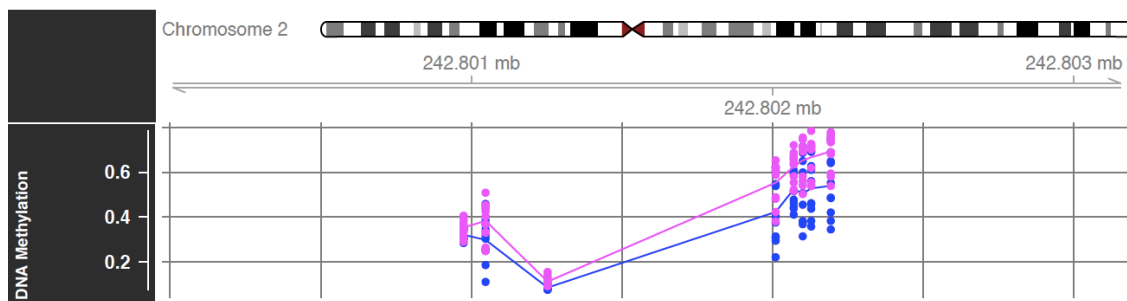
**Tabla 22.** Promotores y genes seleccionados de la comparación de pacientes con Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión y pacientes Enfermos Críticos Crónicos. Abreviaturas: P-adj: P-valor ajustado.

Promotor	Gen	P-valor	P-adj	Metilación
LCK	-	1,95E-10	5,17E-07	Hipermetilado
AZU1	-	1,80E-08	1,59E-05	Hipometilado
CD3G	-	2,23E-07	9,84E-05	Hipermetilado
DEFA4	-	4,52E-07	0,0002	Hipometilado
IL10	-	1,68E-06	0,0004	Hipometilado
IL18	-	2,10E-06	0,0005	Hipometilado
PDCD1	-	2,21E-06	0,0005	Hipermetilado
-	PTPRC	9,14E-07	0,0002	Hipermetilado
-	TNFSF4	3,60E-06	0,0004	Hipometilado

El promotor *GD3G* se encontró hipermetilado (Figura 54) en los pacientes con PICS respecto a los pacientes con ECC. Este gen se encarga de ensamblar subunidades de los receptores de linfocitos T y se han descrito déficits en el ensamblaje de estos receptores relacionados con problemas de inmunodeficiencia relacionada con los linfocitos T (395). De hecho, Huang *et al* validaron los cambios de expresión del *GD3G* en pacientes con sepsis y lo propusieron como un biomarcador de diagnóstico y pronóstico de la sepsis, relacionándolo con inmunosupresión a largo plazo (395). Estos resultados junto con los obtenidos en este trabajo relacionados con la hipermetilación de este gen, indicarían que existe una disminución en la expresión de los receptores de las células T, hecho que puede tener consecuencias muy significativas en el desarrollo de la respuesta inmunitaria. Así mismo, el promotor *PDCD1* también se observó hipermetilado en los pacientes con PICS en comparación a los pacientes con ECC (Figura 55). *PDCD1* codifica para la proteína 1 de muerte celular programada, es un receptor inhibidor expresado en las células T. Está implicado en la regulación de las funciones de los linfocitos T, incluyendo las de las células efectoras CD8+. Además, esta proteína también promueve la diferenciación de las células CD4+ a células T regulatorias (396). Por ello, podemos decir que la respuesta de las células T se verá disminuida desde los momentos iniciales en los pacientes con sepsis que desarrollarán PICS, haciendo el estudio de metilación de estos dos genes un buen candidato para monitorizar qué pacientes con sepsis tendrán un peor pronóstico y una inmunosupresión a largo plazo.



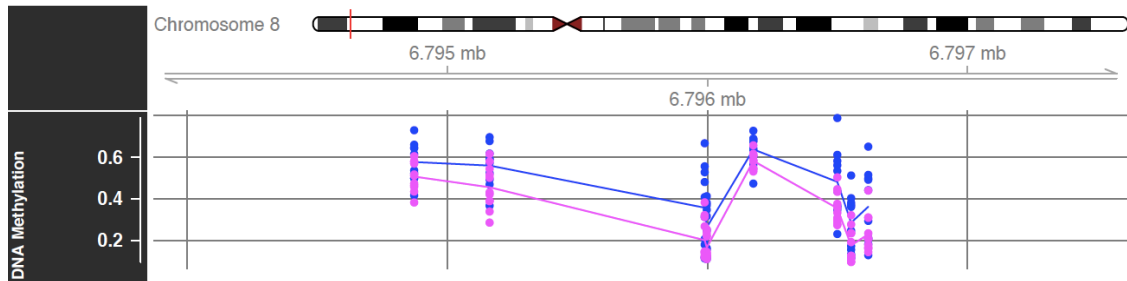
**Figura 54. Representación mCSEA para el promotor *CD3G*.** El color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con PICS, el color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con ECC.



**Figura 55. Representación mCSEA para el promotor *PDCD1*.** El color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con PICS, el color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con ECC.

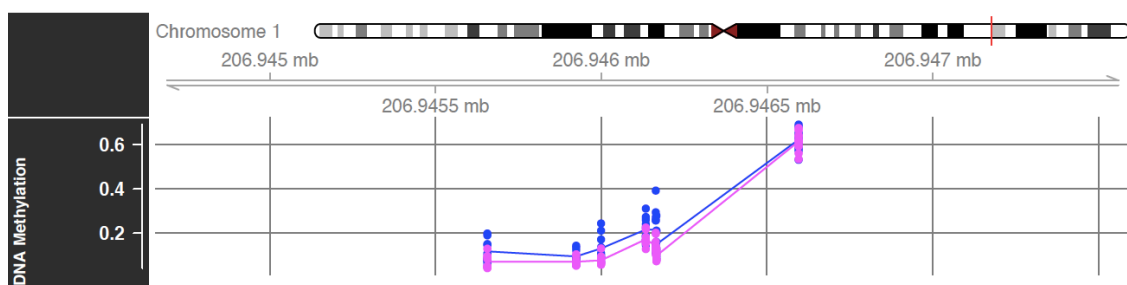
Existen diferentes isoformas de las defensinas (*DEFA1-4*) expresadas en diferentes células inmunes, como los linfocitos, los monocitos o las células NK (397,398). La isoforma 4, codificada para *DEFA4*, se ha encontrado expresada en los gránulos del neutrófilo y se encarga de defender al huésped contra virus y bacterias (399). Esto es especialmente relevante en este trabajo, puesto que nos hemos centrado en describir el papel de los neutrófilos en la inmunidad innata mediante los mecanismos de NETosis, a través de los cuales se liberarían los gránulos que contienen las defensinas. En este sentido, se han asociado problemas de expresión de la *DEFA4* en enfermedades relacionadas con la inflamación y disfunción de la inmunidad (400), como sucede en los pacientes de PICS. Es relevante subrayar que los resultados obtenidos en este trabajo mostraron una hipometilación de esta isoforma de las defensinas, indicando una sobreexpresión (Figura 56). Debido a que estos resultados se hallaron en muestras obtenidas durante las primeras 24h de estancia en UCI, esto podría explicar que haya mayor activación de los eventos de NETosis durante este periodo de tiempo, así como que los pacientes con un caso más complicado de sepsis presenten mayores niveles de H3cit en plasma, como observamos en la sección de resultados 5.7, donde vimos que los pacientes con peor pronóstico mostraron más niveles de H3cit. Así pues,

aquellos pacientes que muestren mayores eventos de NETosis podrían verse afectados por una carencia de estas células en el futuro, desencadenando diferentes eventos de inmunosupresión, característico de los pacientes con PICS.



**Figura 56. Representación mCSEA para el promotor *DEFA4*.** El color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con PICS, el color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con ECC.

La IL-10 es la interleuquina antiinflamatoria por excelencia, habiéndose encontrado expresada en plasma de pacientes con SS en estadios iniciales de la sepsis (57), explicando la respuesta antiinflamatoria compensatoria que se activa en los pacientes con sepsis (96) (Figura 3). Los cambios de metilación hallados en estos resultados (Figura 57) podría explicar porqué en algunos fenotipos de los pacientes con sepsis se da un desajuste de la respuesta inmunitaria a largo plazo, ya que los pacientes con PICS muestran menores niveles de metilación en el promotor de la *IL10* que los pacientes con ECC (Figura 57). Esto indica que, en estadios iniciales, cuando debería estar activándose una respuesta proinflamatoria para combatir al organismo causante de la sepsis, se está activando también una respuesta antiinflamatoria, causando un mecanismo compensatorio entre ambas respuestas.



**Figura 57. Representación mCSEA para el promotor *IL10*.** El color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con PICS, el color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con ECC.

Finalmente, se observó que el gen *TNFSF4* estaba hipometilado en los pacientes con PICS respecto a los pacientes con ECC (Figura 58). Este gen es una citoquina de la familia del TNF (factor de necrosis tumoral) que funciona en las células T como presentadora de antígenos y media la adhesión de las células T activadas a las células endoteliales (401). La hiperactividad de las

células T puede terminar agotándolas, lo que causaría un sistema inmunitario agotado, contribuyendo a la inmunosupresión que caracteriza a los pacientes con PICS.

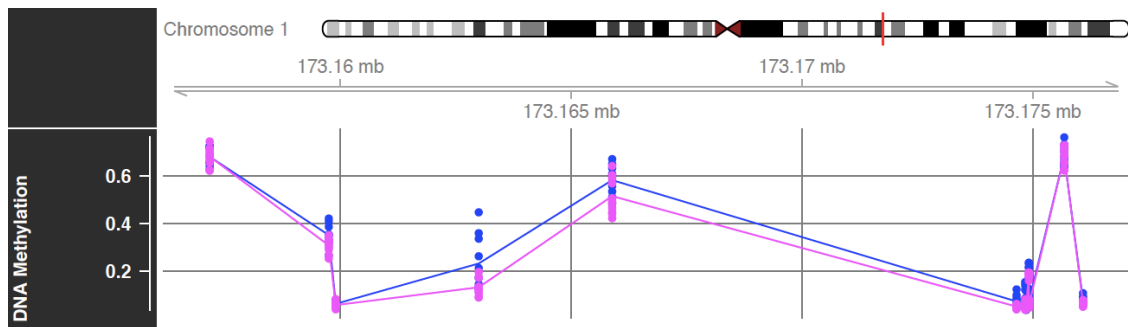


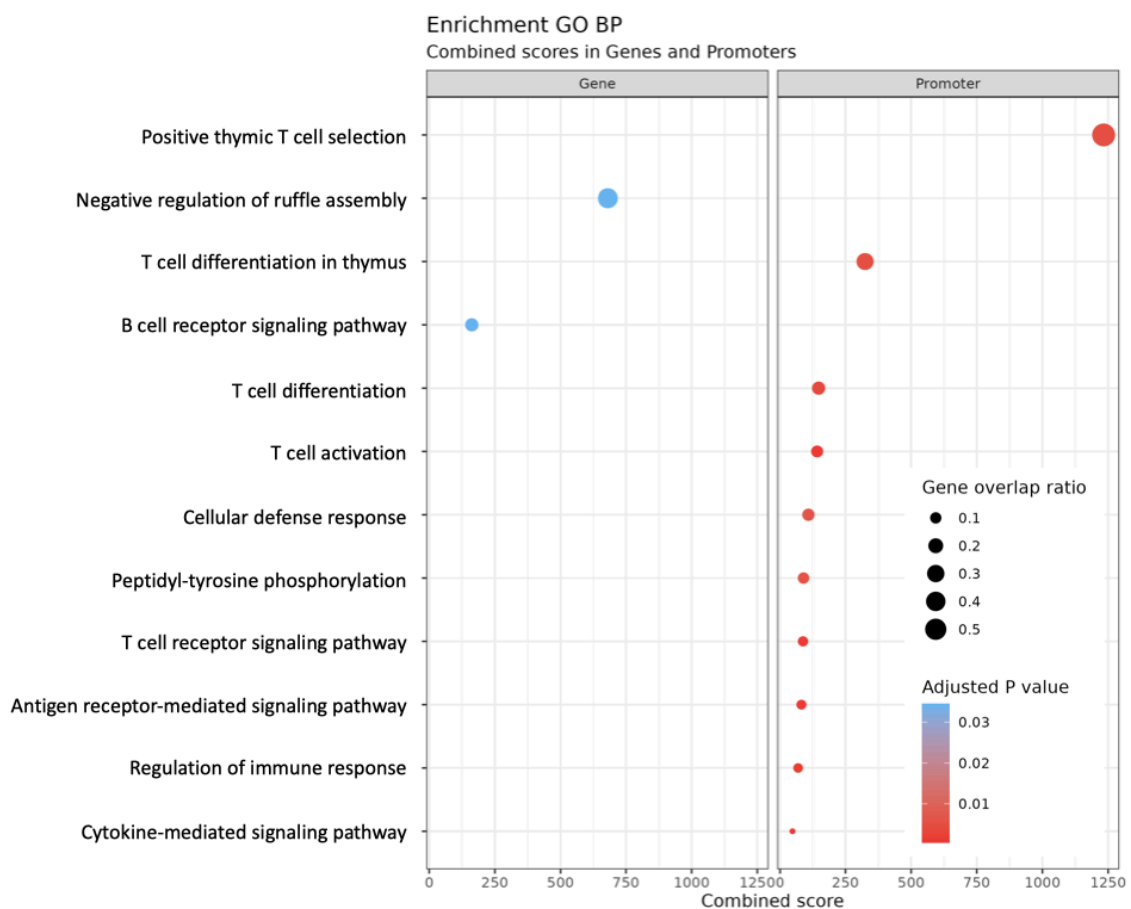
Figura 58. Representación mCSEA para el gen *TNFSF4*. El color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con PICS, el color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con ECC.

### 6.10.3. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL DE LOS PACIENTES PICS DURANTE SU EVOLUCIÓN CLÍNICA (ENTRE 24 HORAS Y 14 DÍAS).

Por último, se realizó la comparación entre pacientes con PICS a diferentes tiempos. La comparación entre los diferentes tiempos de evolución clínica de los pacientes con PICS nos aporta información sobre las diferencias en los patrones de metilación tanto a tiempos iniciales (primeras 24h tras el ingreso en UCI) como a los 14 días de estancia de ingreso en UCI. Esto es clave ya que nos ofrece una visión de la progresión del propio paciente en el tiempo, lo cual nos ayuda a entender los mecanismos moleculares que gobiernan la progresión de la enfermedad, además de ofrecernos biomarcadores de pronóstico. Recordemos que los pacientes con PICS son pacientes con sepsis, ingresados al menos 14 días en UCI y que cumplen características inmunitarias y metabólicas concretas (84).

Entre las rutas encontradas tras el análisis de enriquecimiento funcional destaca de nuevo la desregulación de los linfocitos T (Figura 60-62), encontrándose una hipometilación relacionada con estas células el día 14 respecto al día de ingreso en UCI. Esto apunta a que los pacientes que presentan alteraciones relacionadas con la metilación de genes y promotores de genes relacionados con el control del sistema inmunitario en los tiempos iniciales desarrollen PICS, mientras que los pacientes con menores alteraciones en el perfil de metilación en genes y promotores relacionados con los linfocitos T a tiempos iniciales, es probable que no lleguen a desarrollar este síndrome. Así mismo, de nuevo, también se encontró una desregulación en la producción de citoquinas, que son los señalizadores inmunitarios por excelencia, regulando la activación de las diferentes células del sistema inmune (402).

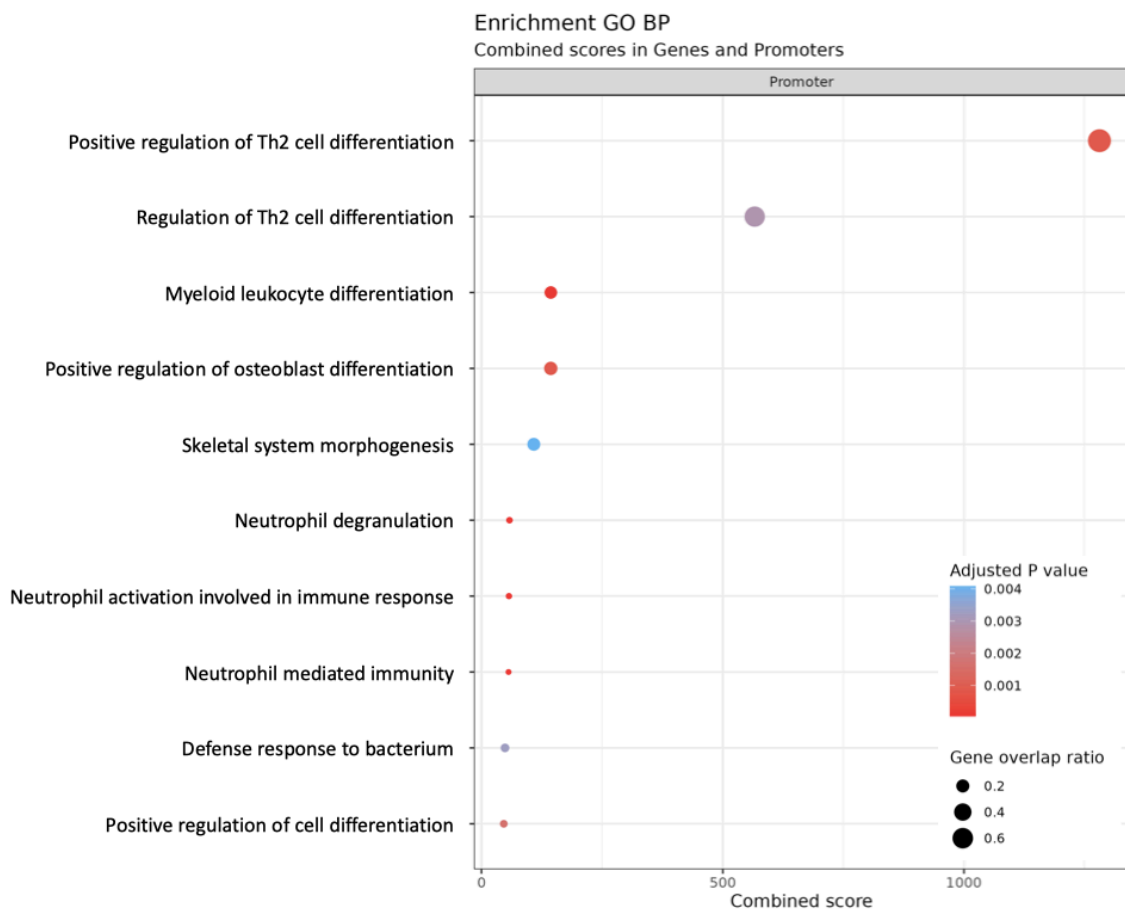
La hipometilación de los genes implicados en el sistema inmunitario (Figura 59), cuando se compara el perfil de metilación de los 14 días respecto a las 24h, especialmente los relacionados con los linfocitos T, podría indicar que, a medida que progresa el tiempo de ingreso de un paciente séptico en la UCI, puede ocurrir una alteración en el patrón de metilación en las células inmunitarias de los pacientes que puede ir ligada a la alteración de la respuesta inmunitaria del sistema adaptativo (77). Esto puede llevar a la hipometilación de los promotores de genes clave en la función de los linfocitos T para permitir al huésped contrarrestar la infección, e hiperactivar a las células T, lo cual puede desencadenar un sistema adaptativo exhausto llevando al paciente a un peor pronóstico (273).



**Figura 59. Principales términos GO obtenidos del análisis ORA para los genes y promotores hipometilados en la comparación de pacientes con PICS, en este caso se analizan muestras obtenidas a diferentes tiempos, comparando la obtenida durante el día 14 de estancia en UCI con la obtenida durante las primeras 24h del día de ingreso en UCI. El eje “y” representa los 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 p-valor ajustado obtenido para los términos del test realizado en ORA del análisis de sobrerepresentación determina el color de los puntos.**



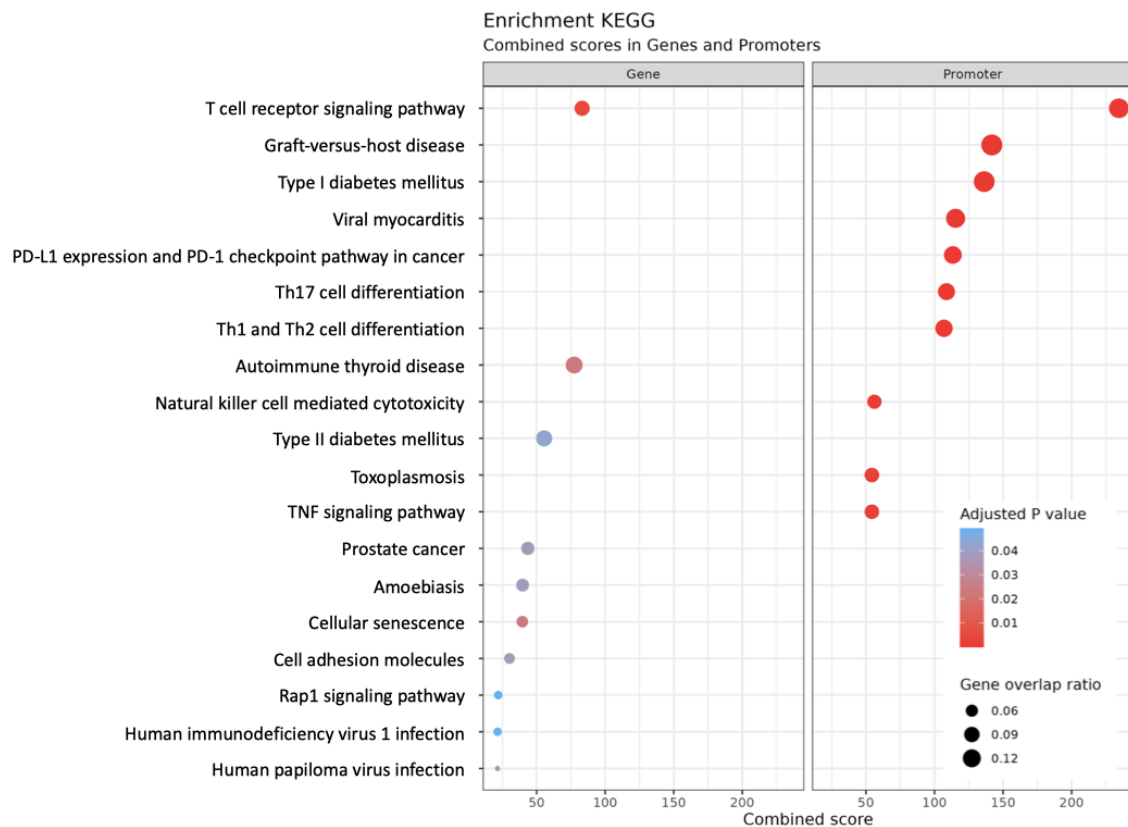
En cuanto a los promotores hipermetilados, se encontraron además de la regulación de la producción y diferenciación de las células T helper, una fuerte desregulación de la diferenciación de células mieloides, indicando alteraciones en el sistema inmune innato (403), reforzadas por una alteración de los neutrófilos, viéndose alterada su activación, degranulación (capacidad citotóxica), e incluso la propia inmunidad mediada directamente por estas células (Figura 60). Esto indica una remodelación profunda, a nivel de metilación de promotores y genes del sistema inmunitario, no solo a nivel adaptativo, sino también del sistema innato, lo cual debe llevar a una menor respuesta inmunitaria sistémica del paciente, induciendo un peor pronóstico.



**Figura 60. Principales términos GO obtenidos del análisis ORA** para los promotores hipermetilados en la comparación de pacientes con PICS, en este caso se analizan muestras obtenidas a diferentes tiempos, comparando la obtenida durante el día 14 de estancia en UCI con la obtenida durante las primeras 24h del día de ingreso en UCI. El eje “y” representa los 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 p-valor ajustado obtenido para los términos del test realizado en ORA del análisis de sobrerepresentación determina el color de los puntos.

Por último, al analizar las diferencias de metilación de las principales rutas KEGG entre los pacientes de PICS a tiempo inicial y las muestras tomadas a los 14 días, encontramos de nuevo

una alteración en la metilación de los promotores y genes que participan en la ruta de producción de los linfocitos T, principalmente de los linfocitos T helper, así como también una alteración de los linfocitos NK (Figura 61). Así mismo, también encontramos una alteración en la metilación de genes y promotores implicados en la producción de citoquinas, principalmente en citoquinas relacionadas con la inflamación como el TNF (Figura 61). Todos estos resultados confirman los resultados obtenidos previamente, donde se postuló que la alteración en los niveles de metilación se relaciona con una peor respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa, principalmente de los linfocitos T (273), y dentro de estos, de los linfocitos T helper, lo que puede conducir a un sistema inmunitario exhausto (62,272,273). Así mismo, nuestros resultados también sugieren el potencial del análisis de los niveles de metilación a tiempos iniciales, siendo capaz de indicar la severidad del paciente, así como el progreso de su enfermedad y su pronóstico, e incluso explicando molecularmente las razones de esta evolución y pronóstico.



**Figura 61. Principales términos KEGG obtenidos del análisis ORA para los promotores hipometilados en la comparación de pacientes con PICS, en este caso se analizan muestras obtenidas a diferentes tiempos, comparando la obtenida durante el día 14 de estancia en UCI con la obtenida durante las primeras 24h del día de ingreso en UCI. El eje “y” representa los 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 p-valor ajustado obtenido para los términos del test realizado en ORA del análisis de sobrerrepresentación determina el color de los puntos.**

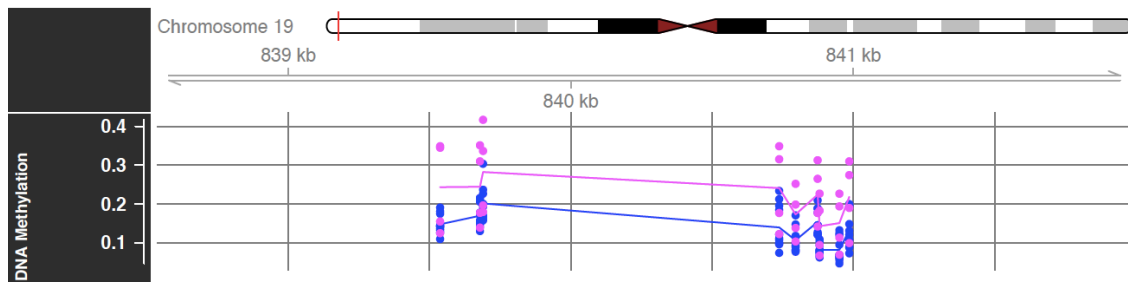
**6.10.3.1. PROMOTORES Y GENES CON METILACIÓN DIFERENCIAL ENTRE PICS-C Y PICS-A**

En la comparación de pacientes con diagnóstico de PICS donde se analizaró el metiloma en las primeras 24 horas tras el ingreso en UCI y a los 14 días post-ingreso, se encontraron 662 promotores y 733 genes metilados diferencialmente ([https://n9.cl/anexosphd\\_rov](https://n9.cl/anexosphd_rov)). Reduciendo estos datos, tras cribarlos según el p-valor y la función biológica, a 5 promotores y 2 genes (Tabla 23). Sobre estos promotores y genes priorizados se realizó el análisis mCSEA y se descartaron dos promotores y un gen por no presentar diferencias de metilación relevantes en este análisis de perfil de metilación de la región por mCSEA (Figuras S9 - S11).

**Tabla 23.** Promotores y genes seleccionados de la comparación de pacientes con Síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión en muestras obtenidas a diferentes tiempos (14 días y día de ingreso en UCI). Abreviaturas: P-adj: P-valor ajustado.

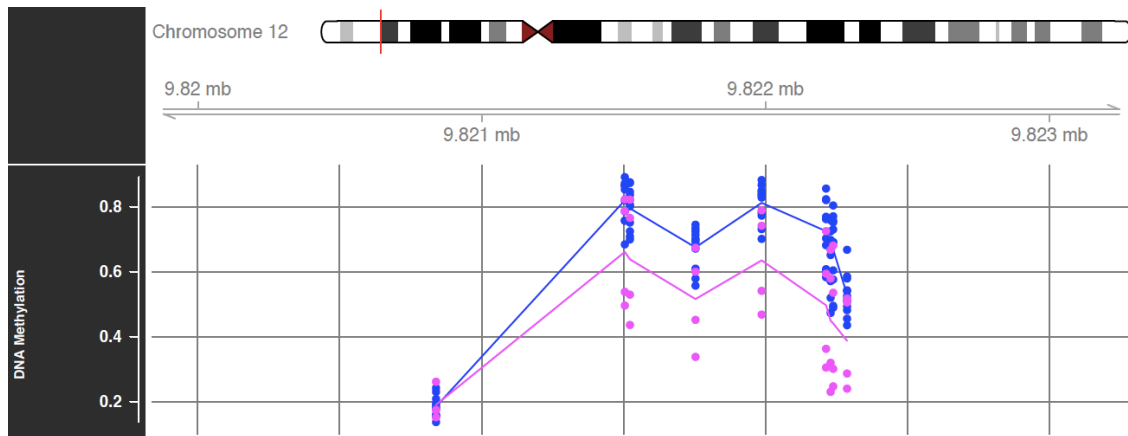
Promotor	Gen	P-valor	P-adj	Metilación
CLEC2D	-	1,36E-11	5,06E-08	Hipometilado
PRTN3	-	1,40E-08	1,18E-05	Hipermetilado
IRF5	-	4,85E-07	0,0002	Hipermetilado
ITGB2	-	9,17E-07	0,0003	Hipometilado
CD3D	-	1,34E-06	0,0004	Hipometilado
-	TRAF3IP2	4,91E-07	0,0001	Hipermetilado
-	PRF1	4,57E-05	0,0035	Hipometilado

El promotor *PRTN3* codifica para la proteinasa 3, con función en el sistema inmunitario por mediar la unión de enzimas y receptores de señalización (404), se encontró hipermetilado en las muestras de 14 días de ingreso en UCI (Figura 62). Es decir, observamos que los pacientes con PICS durante las primeras 24h de ingreso en UCI presenta menores niveles de metilación en el gen *PRTN3*. Estos resultados sugieren que a día 14, el sistema inmunitario de los pacientes ha sufrido un cambio en el patrón de metilación que puede contribuir a una inmunosupresión a largo plazo, puesto que este promotor también regula diferentes procesos como la maduración convencional de diferenciación de células dendríticas y la extravasación de neutrófilos (404). Además, resultados previos publicados por nuestro grupo de investigación, ya demostraron la hipometilación del gen *PRTN3* en pacientes de sepsis neonatal (220,405).



**Figura 62. Representación mCSEA para el promotor PRTN3.** El color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes PICS-C, cuya muestra de ADN fue tomada a los 14 días de ingreso en UCI; el color azul indica los cambios de metilación en los pacientes (PICS-A) cuya muestra de ADN fue tomada en las primeras 24h del ingreso en UCI.

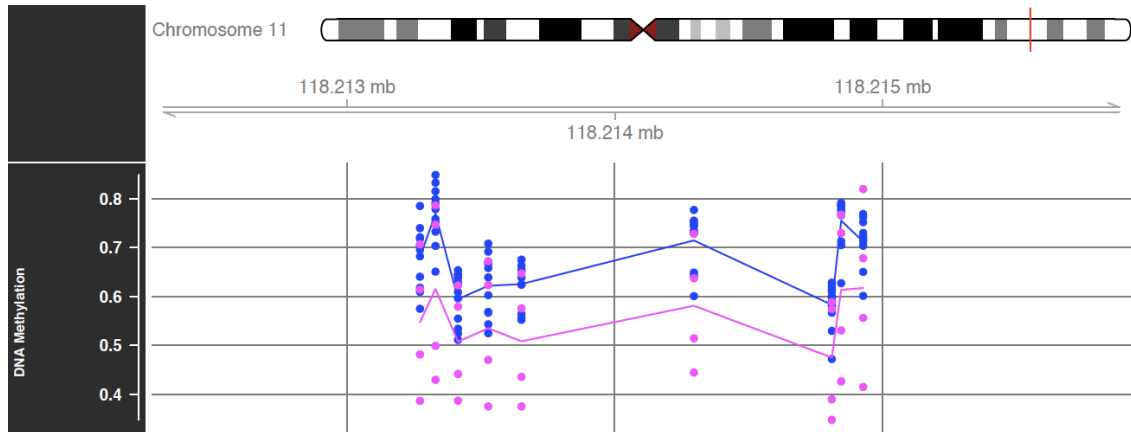
El promotor *CLEC2D* regula la expresión del gen *LLT1* (*Induction of Lectin-like Transcript 1*). *LLT1* es el ligando del receptor CD161, ubicado en la superficie de las células NK, el cual actúa de manera inhibitoria, controlando así la expresión de estas células (406). Así pues, la hipometilación del promotor *CLEC2D* (Figura 63) indica una sobreexpresión del *LLT1* y por lo tanto, una mayor unión al receptor CD161, disminuyendo la población de células NK. Es importante destacar que las células NK trabajan creando una retroalimentación positiva con los macrófagos a través de citoquinas como la IL-12 o el INF- $\gamma$  (57), por lo que una reducción de NKs podría causar una reducción de los macrófagos, que a su vez actúan sobre la activación de los linfocitos T (407). Por lo tanto, los cambios de metilación de este promotor tendrían importantes efectos sobre la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, de los pacientes con sepsis. Debido a que los cambios de metilación se observan en la muestra del día 14 de ingreso en UCI en los pacientes con PICS, podemos decir que los cambios de metilación de este promotor pueden estar implicados en los fenómenos de inmunosupresión que se observan en estos pacientes. De hecho, aunque hasta la fecha no se ha relacionado directamente con la sepsis, el gen *LLT1* se ha relacionado con distintas propiedades inmunosupresoras en distintos tipos de tumores, reforzando la idea del papel de la metilación del *CLEC2D* con la inmunosupresión observada en pacientes con PICS (408)



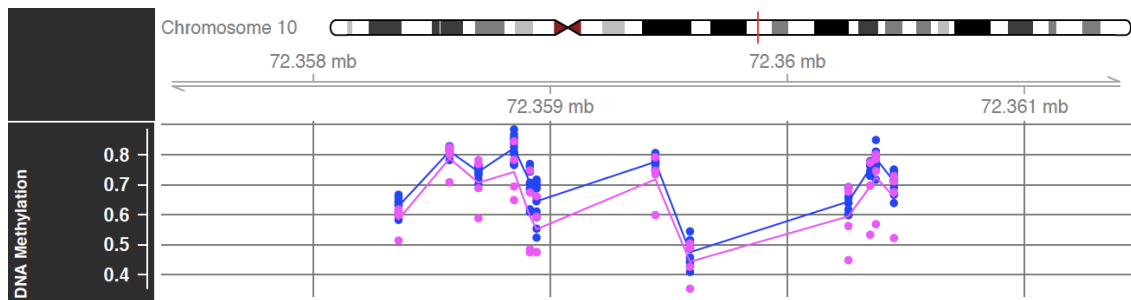
**Figura 63. Representación mCSEA para el promotor *CLEC2D*.** El color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes PICS-C, cuya muestra de ADN fue tomada a los 14 días de ingreso en UCI; el color azul indica los cambios de metilación en los pacientes (PICS-A) cuya muestra de ADN fue tomada en las primeras 24h del ingreso en UCI.

Los linfocitos T se han relacionado con los cambios de inmunosupresión a largo plazo en enfermedades como la sepsis (273). Se ha demostrado que el *CD3D* es uno de los principales receptores de activación para las células T, por lo que la hipometilación de este gen que presentaron los pacientes con PICS ingresados durante 14 días en UCI (Figura 64), *a priori* se traduciría en un incremento de la expresión del receptor *CD3D*, lo cual implica una sobreactivación de los linfocitos T y, por tanto, una mayor respuesta inmune mediada por los linfocitos T. Por el contrario, una sobreactivación que se mantiene en el tiempo podría acabar causando una inmunosupresión, debido al agotamiento de las células T (409).

Por otro lado, las perforinas (*PRF1*) son proteínas de membrana de las células T y las células NK, encargadas de hacer poros en otras células y destruirlas a través de procesos de citólisis. Estas proteínas de membrana ayudan a controlar la población de células inmunitarias (410). Por lo tanto, debido a que en las muestras de los pacientes con PICS obtenidas a los 14 días de ingreso en la UCI, se observó una hipometilación del gen que codifica para esta proteína (Figura 65), estaría dándose una mayor expresión de estas proteínas de membrana capaces de causar citólisis en otras células.



**Figura 64. Representación mCSEA para el promotor *CD3D*.** El color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes PICS-C, cuya muestra de ADN fue tomada a los 14 días de ingreso en UCI; el color azul indica los cambios de metilación en los pacientes (PICS-A) cuya muestra de ADN fue tomada en las primeras 24h del ingreso en UCI.



**Figura 65. Representación mCSEA para el gen *PRF1*.** El color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes PICS-C, cuya muestra de ADN fue tomada a los 14 días de ingreso en UCI; el color azul indica los cambios de metilación en los pacientes (PICS-A) cuya muestra de ADN fue tomada en las primeras 24h del ingreso en UCI.

Entre todos los promotores y genes que se seleccionaron, y los que se consideraron más relevantes debidos a sus cambios de metilación, cabe resaltar que la mayoría se relacionan con la respuesta inmunitaria adaptativa y, especialmente, con los linfocitos T. En este sentido, se ha descrito anteriormente que durante la sepsis son los linfocitos T los más afectados, viéndose comprometido el buen funcionamiento de estas células, con elevados niveles de mortalidad o agotadas para realizar su función correctamente (273,411). Por todo ello, analizar los cambios de metilación durante las primeras 24h de ingreso en UCI de los genes que han salido relevantes en las comparaciones ECC vs Sepsis (*IL12RB2*, *LEF1*, *TCF7*) y PICS vs ECC (*CD3G*, *PDCDI*, *DEFA4*, *IL10*, *TNFSF4*) permitirían clasificar los pacientes con sepsis que evolucionarán a los fenotipos más severos. Así mismo, evaluar la metilación de los genes que mostraron metilación diferencial en la comparación de pacientes con PICS ingresados en la UCI durante 14 días vs las muestras de los pacientes tomadas durante las primeras 24h tras el ingreso en UCI (*PRTN3*, *CLEC2D*, *CD3D*, *PRF1*), ayudaría a entender qué mecanismos moleculares son los que se modifican para causar la inmunosupresión a largo plazo que caracteriza a estos pacientes.

### 6.11. INTEGRACIÓN DE LAS RUTAS COMUNES ENTRE LOS CAMBIOS DE MIRNAS Y DE METILACIÓN EN PACIENTES CON PICS

Recordemos que los pacientes con PICS son pacientes con sepsis, categorizados previamente (a los 7 días de ingreso en UCI) como pacientes con ECC, que permanecen 14 días o más ingresados en UCI. Los pacientes con PICS son pacientes que desarrollan un síndrome de inflamación persistente, activación del catabolismo e inmunosupresión. Desde el punto de vista clínico, siguiendo los criterios establecidos por Gentile *et al* (84), cumplen los siguientes parámetros: pérdida de peso (más de un 10% durante el tiempo de ingreso), pérdida de masa muscular por debajo de 18, albúmina por debajo de 3mg/dL, prealbúmina por debajo de 10mg/dL, proteína C reactiva (PCR) superior a 1,5mg/L, y un recuento de linfocitos total inferior a 800/mm<sup>3</sup> (84); serían clasificados clínicamente como pacientes con PICS (Figura 4 y 13).

Tras analizar en conjunto los cambios obtenidos en los patrones de microRNAs y metilación en los pacientes con PICS respecto a los pacientes con ECC o sepsis, observamos que la ruta de formación de NETs es una ruta que se encuentra infra regulada por miRNAs. De hecho, aunque ningún miRNA relacionado con esta ruta resultó ser de los miRNAs más alterados en esta comparación, la ruta sí resultó ser una de las más alteradas (rutas KEGG, apartado 5.9.3.2), demostrando que la alteración en esta ruta no se debe a un solo miRNA, sino que existen diferentes miRNAs que están contribuyendo a una alteración de esta ruta, como el miR-155, que regula la PAD4 (412), o el miR-223 o el miR-146, que inhiben la formación de NETs (413,414), la mayoría de ellos encontrados alterados en nuestro estudio ([https://n9.cl/anexosphd\\_rov](https://n9.cl/anexosphd_rov)). En esta misma comparación, en los análisis de metilación, observamos que los promotores y genes implicados en la diferenciación a granulocitos (donde se engloban los neutrófilos), así como los implicados en la activación de los neutrófilos implicados en la respuesta inmunitaria, se encuentran hipometilados, como por ejemplo el promotor del gen *DEFA4*. La hipometilación de estas rutas, así como la infra regulación de miRNAs para estas rutas, explicaría la hiperactivación de los neutrófilos y los eventos de NETosis en estos pacientes. Este hecho estaría de acuerdo con los resultados observados anteriormente, ya que los pacientes con sepsis más severa (SS no supervivientes) fueron los que mostraron mayores niveles de H3cit en el plasma (apartado 5.6), evento que como se ha descrito en este trabajo es necesario para la activación de la NETosis. Teniendo en cuenta que los pacientes con PICS estuvieron más tiempo ingresados en la UCI que los pacientes con sepsis o con ECC (Tabla 13), podemos deducir que los pacientes de PICS serán los pacientes que presenten mayores comorbilidades en el futuro.

En referencia a la ruta de formación de NETs, donde muchos de los genes que participan en esta ruta deberían estar infra regulados por la sobreexpresión de miRNAs en la comparación de PICS

vs ECC, cabe destacar que a medida que el paciente está más tiempo ingresado en la UCI (pacientes con PICS ingresados durante 14 días), se encontraron cambios en los patrones de metilación de rutas relacionadas con la desgranulación de neutrófilos, neutrófilos activados para mediar la respuesta inmune y la inmunidad mediada por neutrófilos. Es interesante destacar que estas rutas se encontraron hipermetiladas en los pacientes con PICS ingresados 14 días en la UCI. Esto indicaría que los pacientes con PICS tienen una mayor activación de los neutrófilos y las respuestas mediadas por este tipo celular a tiempos iniciales en comparación con otros grupos de pacientes estudiados, pero a medida que el paciente está más tiempo ingresado en la UCI, los genes implicados en estas rutas moleculares sufren cambios en los patrones de metilación (por ej. *PRTN3*) que producen una menor activación de estas rutas. Esto podría explicar los fenómenos de inmunosupresión a largo plazo observados en estos pacientes, especialmente los relacionados con la inmunidad innata (215,415).

En la comparación de PICS vs ECC del análisis de miRNAs, se observó alterada la ruta molecular de la función del ciclo celular, y en la comparación de PICS-C vs PICS-A, se observó alterada la ruta molecular de receptores de membrana. En la comparación de PICS-C vs PICS-A, es decir, en los pacientes de PICS que llevan 14 días ingresados en UCI, se hallaron alteradas diferentes rutas relacionadas con los receptores de señalización de las células T y B, así como la diferenciación de las células T. Nuestros resultados sugieren que a medida que el paciente está ingresado en la UCI, se producen cambios en sus patrones epigenéticos implicados en los mecanismos de diferenciación de las células relacionadas con la respuesta inmunitaria adaptativa, lo cual sería uno de los eventos clave en la inmunosupresión que sufren los pacientes a largo plazo (215,415). Además, en consonancia con esto, los genes involucrados en la ruta de señalización de los receptores de antígenos y la diferenciación de leucocitos mieloides también se encontraron alterados en cuanto a sus niveles de metilación, en esta comparación de pacientes que llevan más tiempos ingresados. Debido a que los leucocitos mieloides (macrófagos y células dendríticas) son los que reciben y muestran los antígenos, alterar los mecanismos implicados en la recepción de antígenos, especialmente en estas células, causaría una inactividad de las células mieloides, debilitando considerablemente toda la respuesta inmunitaria (416).

Las rutas implicadas en la regulación de la adhesión celular y las moléculas de adhesión celular también se encontraron alteradas tanto a nivel de miRNAs como de metilación en los pacientes ingresados en la UCI durante más tiempo (PICS-C vs PICS-A). Se ha descrito que las moléculas de adhesión celular, incluyendo los receptores de inmunoglobulinas e integrinas, tienen una importancia crucial mediando los procesos de respuesta inmunitaria (417), además de estar claramente implicadas en los procesos de inmunosupresión, como es el caso por ejemplo de ICAM-1 en las células MSCs (418). Especialmente, las integrinas juegan un papel clave en la



regulación de todos los aspectos de la función inmunitaria celular, como la llegada a los tejidos, la activación de los efectores celulares y la formación de la sinapsis inmunológica entre las células inmunitarias o entre las células inmunitarias y las células diana, tanto durante la homeostasis del sistema inmunitario como durante la inflamación (417). Es importante destacar que las integrinas son moléculas de adhesión claves también para mantener la unión célula-célula, por lo que una alteración en estas proteínas podría causar graves efectos en los tejidos (419).

Finalmente, en los pacientes con PICS las rutas de miRNAs implicadas en la senescencia celular (miR-335 o el miR-150) están alteradas, tanto a tiempos iniciales en comparación con los pacientes de sepsis, como a tiempos más avanzados (PICS-C). Los pacientes con PICS también mostraron esta ruta alterada a nivel de metilación durante su evolución clínica (día 1 en comparación con el día 14 de su estancia en UCI). La hipometilación observada en estos pacientes indicaría una mayor senescencia celular. Muñoz-Espín y Serrano publicaron en *Nature* hace unos años que diferentes procesos patológicos promueven la senescencia celular con el fin de favorecer la regeneración tisular y eliminar el agente etiológico de la patología, activando además la respuesta inmunitaria. Sin embargo, en dicho estudio observaron que en estados patológicos avanzados, la senescencia celular no actúa eficazmente, y por tanto agrava las manifestaciones patológicas (420). Extrapolando los anteriores resultados al presente trabajo: los cambios de metilación en las rutas implicadas en la senescencia celular en los pacientes con PICS ingresados durante tiempo prolongado en la UCI estarían contribuyendo a la fisiopatología de la sepsis, explicando porqué estos pacientes tienen peor prognosis que los pacientes con sepsis o ECC.



## **7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**



Las limitaciones del estudio incluyen:

1.- Variabilidad en las cohortes: Debido a la falta de suficiente volumen de muestras, no se pudo analizar las mismas muestras en todos los experimentos, teniendo dos cohortes diferentes, una para los estudios de histonas circulantes (sepsis y shock séptico), y otra para los estudios de secuenciación de microRNAs y metilación (sepsis, ECC y PICS).

2.- Tamaño muestral: En algunos grupos de pacientes, especialmente en los pacientes sépticos que fallecieron, solo se pudieron incluir unas pocas muestras, ya que aquellos pacientes que fallecieron antes de los 5 días, se descartaron del análisis por falta de muestras a diferentes tiempos. Esto pudo haber llevado a una falta de potencia estadística y la incapacidad de detectar diferencias significativas entre algunos grupos.

3.- Validación de la secuenciación de miRNAs: La secuenciación de miRNAs proporcionó una lista de candidatos para formar una firma de miRNAs, pero sería recomendable validar estos hallazgos mediante diferentes técnicas, como RT-qPCR, para confirmar los resultados por diferentes técnicas.

4.- Validación de cambios de metilación: Al igual que la secuenciación de miRNAs, la validación de los genes y promotores hallados con cambios en los patrones de metilación mediante diferentes técnicas como la pirosecuenciación, sería recomendable para validar los cambios de metilación observados.

5.- Diferentes tiempos de evolución: En esta tesis doctoral se realizaron los análisis de los pacientes a diferentes tiempos (tiempo de entrada en UCI, 7 días o menos, y a 14). Esto se realizó de esta manera ya que los tiempos iniciales son clave para determinar la evolución de los pacientes sépticos, así como el PICS se determina a los 14 días. No obstante, podría haber sido interesante analizar la evolución de estos pacientes durante estadíos más largos. En cualquier caso, durante la consecución de este proyecto se han recogido, y se siguen recogiendo, muestras de estos pacientes a tiempos de 6 meses, 1 año y 2 años desde la entrada en UCI. En este sentido, se espera analizar los datos obtenidos en esta tesis doctoral en comparación con la evolución a largo plazo de estos pacientes.



## **8. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS**





### 8.1. CONCLUSIONES

- 1.- A diferencia de las histonas nativas, las histonas citrulinadas producen una menor citotoxicidad en las células endoteliales, así como una menor desregulación en los mecanismos de respuesta antioxidante y de función endotelial que las histonas nativas.
- 2.- Los niveles de histonas circulantes se mantienen constantes en los pacientes sépticos a lo largo de su estancia en UCI. Los niveles de H3 citrulinada disminuyen a lo largo de la estancia en UCI, siendo la primera muestra tomada en el momento de ingreso en UCI, la que mayores niveles de histonas H3 citrulinada presenta.
- 3.- Los pacientes con shock séptico que no sobreviven son los que mayores niveles de histonas circulantes y H3 citrulinada presentan en plasma. En el caso de las histonas circulantes, se hallaron niveles semejantes mantenidos a lo largo del tiempo, tanto en los pacientes con sepsis como los pacientes con shock séptico, al contrario que los niveles de H3cit, que disminuían con el tiempo de estancia en UCI.
- 4.- Las histonas circulantes son predictoras de una mala prognosis, puesto que los pacientes más severos presentaron mayores niveles de ambos tipos de histonas, especialmente en los tiempos iniciales tras el ingreso en la UCI. Así mismo, las correlaciones con las características clínicas fueron especialmente relevantes en el grupo de pacientes con shock séptico, indicando el papel de las histonas circulantes en la coagulación (correlaciones positivas de las histonas circulantes con: Protrombina total, Dímero-D y tiempo parcial de tromboplastina activada; y correlaciones negativas con: Proteína C activada y Proteína C funcional) e inmunomodulación (correlaciones con leucocitos).
- 5.- A diferencia de lo observado para las histonas circulantes, no se ha observado una correlación estadística entre la H3 cit y los parámetros de coagulación.
- 6.- Las diferencias entre los microRNAs expresados en pacientes con sepsis, ECC y PICS podría permitir establecer una firma de miRNAs para el diagnóstico y pronóstico de la sepsis, como es el caso del miR-10395-3p, el miR-206 y el miR-1282.
- 7.- El análisis de la metilación de genes (*CD3G*, *PDCDI*, *DEFA4*, *IL10*, *TNFSF4*) en el momento del ingreso podría caracterizar a los pacientes con sepsis que evolucionarán a PICS.

## 8.2. CONCLUSIONS

1.- In contrast to native histones, citrullinated histones produce lower levels of cytotoxicity in endothelial cells and cause less deregulation in both antioxidant response mechanisms and endothelial function.

2.- Circulating histone levels in septic patients remain stable during their ICU stay. However, the H3cit levels decrease over time, with the first sample taken upon admission to the ICU showing the highest levels of citrullinated histone H3.

3.- Septic shock patients who do not survive have the highest levels of circulating histones and citrullinated H3 in their plasma. While the levels of circulating histones remained stable over time in both sepsis and septic shock patients, the H3cit levels decreased as the patients stayed longer in the ICU.

4.- Circulating histones are predictors of a poor prognosis, since the most severe patients had higher levels of both types of histones, particularly in the early stages after intensive care unit admission. In addition, the correlations with clinical features were particularly relevant in the septic shock patient group, suggesting the involvement of circulating histones in coagulation (with positive correlations of circulating histones with total prothrombin, D-dimer, and partial thromboplastin time; and negative correlations with activated Protein C, Functional Protein C, and activated thromboplastin), as well as immunomodulation (correlating with leukocytes).

5.- Unlike what was observed for circulating histones, no statistical correlation has been observed between H3cit and coagulation parameters.

6.- The differences between the microRNAs expressed in patients with sepsis, CCI, and PICS allow us to establish a miRNA signature for sepsis diagnosis and prognosis, as is the case of miR-10395-3p, miR-206, and miR-1282.

7.- Gene methylation analysis (*CD3G*, *PDCD1*, *DEFA4*, *IL10*, *TNFSF4*) at ICU admission characterizes patients with sepsis who will progress to PICS.

## **9. SUMMARY**



## 9.1. INTRODUCTION

### 9.1.1. SEPSIS AND SEPTIC SHOCK

The third and most recent international consensus on sepsis and septic shock (SS) (Sepsis-3) defines sepsis as "a life-threatening condition caused by an exacerbated response of the body against an infection, capable of damaging the host's own tissues." Thus, SS is considered "a subset of sepsis in which cellular, circulatory, and metabolic abnormalities are especially severe, being associated with an increased risk of death" (1). In this sense, sepsis presents a worldwide incidence of 48 million cases per year, increasing annually (2). Despite the improvements in the treatments applied in the Intensive Care Unit (ICU), it is estimated that it causes more than 11 million deaths annually worldwide, of which almost 3 million are newborns (3,4). In addition, sepsis is the most frequent cause of death in the ICU of most hospitals (5).

Currently, sepsis management guidelines recommend antibiotics administration as soon as possible, the use of vasopressors, fluid resuscitation, and the use of life support techniques for organ failure, depending on the course of the disease (6). In this sense, clinicians use a clinical scale that allows the organic involvement degree evaluation in patients who are critically ill with suspected infection, although it is not capable to diagnose sepsis in its early stages. This tool is known as the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score (6). In addition, the quick SOFA (qSOFA) helps to identify adult patients likely to have a poor prognosis, especially in the ICU setting (1,7,8). These two tools differ mainly in speed, qSOFA makes it possible to identify patients who can develop sepsis from those critically ill patients with a high risk of suffering complications, something very necessary in the emergency area or on the hospital ward. Nevertheless, despite qSOFA selects critically ill patients with high precision, it is necessary to calculate the SOFA to confirm organ dysfunction. In this regard, it should be noted that despite hospital mortality has been associated with a higher SOFA score, this scale cannot predict the clinical evolution of critically ill patients, nor does it identify patients with SS (1,9). For this reason, it is necessary to develop new methods capable of identifying sepsis in its early stages, and if possible in advance, since the first hours of the disease are crucial for its prognosis (10). Early diagnosis of sepsis would reduce the most serious states of the disease, as well as the number of associated deaths. It would prevent the development of comorbidities in survivors, which have been associated with a greater possibility of suffering new episodes of sepsis (11,12), thus increasing the risk of death in these patients with a weakened immune system (13–15).

The importance of early recognition of sepsis (between the first 6h and 24h, and preferably within 1h of arrival at the hospital), rapid antibiotics administration, or appropriate treatment can significantly reduce the number of deaths caused by sepsis (16). However, since the damage

produced by sepsis in the patient entails a great variety of simultaneous cellular, pathophysiological and organic alterations, diagnosis is very complicated (17–19) (Figure 1). Many technologies are currently being developed for the early diagnosis of sepsis. Many of them are directly focused on rapid recognition of the infectious agent, with the ultimate goal of being able to administer the appropriate antibiotic early. Mass spectrometry (MS) with matrix-assisted laser desorption/ionization with a time-of-flight detector (MALDI-TOF) is already a routine work tool in clinical microbiology units, due to its speed, sensitivity, especially with all those microorganisms with difficulties growing in the liquid media used for inoculation, and reliability in the identification of microorganisms that can cause an infection. The microorganism protein profile analysis in the 2-20kD range using MALDI-TOF, which is where most of the ribosomal proteins are located, offers a specific profile for the vast majority of bacterial species, which allows them to be differentiated from the others with reliability similar to that offered by 16S rRNA sequencing. The results provided by this technique are perfectly contrasted in the identification of bacteria and yeasts, facilitate the detection of mixed cultures and allow a rapid diagnosis of resistant species. The main drawback of the MALDI-TOF technique is that it has limitations for certain microorganisms identification since it is not capable of differentiating or discriminating between some specific genera, such as *Streptococcus viridans* from *Streptococcus pneumoniae* or *E. coli* from *Shigella spp.*, which can limit the adequate antibiotic therapy use (20). This fact has led to the continued development of technologies for the identification of the microorganisms that cause an infection. SeptiFast™ is a PCR-based diagnostic technique that is gaining relevance due to its ability to detect bacterial DNA, even when the bacteria have been eliminated, as well as the speed with which the result is obtained (21). This diagnostic technique increases the chances of isolating at least one microorganism up to 13 times compared to traditional culture methods (13.5; 95% CI, 5.05–36.06) in less than 6h (22). Traditional culture and advanced techniques such as MALDI-TOF (which also uses culture growth for detection) are used to determine if the pathogen causing the infection is a bacterium, a virus, or a fungus, to choose which treatment is the best. The traditional techniques are slower, and less precise since the drugs administered to the patient before the test can alter the results, causing false negatives in up to 30% of cases (23). However, despite SeptiFast™ offering interesting results, its sensitivity and specificity ranges vary between 42% and 73%, and between 50 and 97%, respectively (24). Therefore, despite this technique significantly reducing the time to identify the microorganism causing the infection, the sensitivity is insufficient, and recognizing the microorganism is not synonymous with identifying sepsis.

Because only the identification of the microorganism is not per se the ideal tool for the rapid diagnosis of sepsis, and even less for establishing its prognosis, has led to the search for other biomarkers. In this regard, other molecular parameters such as lactate, C-reactive protein (CRP),

or procalcitonin (PCT), among others (25,26) are also taken into account to identify a possible case of sepsis. However, these markers have a problem, they are non-specific, so other factors independent of a septic episode can increase them, and false positives may appear in the absence of infection, as well as false negatives in cases of viral or fungal infection, since PCT is only altered in bacterial infections (26,27).

All described previously makes it clear how difficult it is to diagnose sepsis, especially in the early stages. Since when pathophysiological events become evident, recovering the patient's cellular and organic homeostasis is much more complicated, which can lead to the patient being referred to an ICU, lengthening their hospital stay, or even leading to a fatal outcome.

It is important to highlight the economic cost that this disease has, since only in the United States sepsis is a sanitary expense of more than 24,000 million dollars, and in Europe, it has a cost of around 7,600 million euros annually (13,28,29). In addition, sepsis compromises the quality of life of survivors due to sequelae, among which are: depression, cognitive impairment, and immunosuppression (30–32), making them dependent on the health system. In addition, as our research group has recently published, sepsis is frequently related to heart damage, developing heart diseases associated with sepsis, neurological damage developing encephalopathy associated with sepsis, and renal damage (33–35). Interestingly, both heart damage and renal damage appear as predominant pathologies because sepsis can accelerate the appearance of pre-existing pathologies, or sharpen their symptoms (36,37). In this sense, it is important to note that a retrospective epidemiological study has demonstrated that new appearance cardiovascular disease is one of the most frequent long-term cardiovascular results in sepsis survivors, including the appearance of events such as heart failure, myocardial infarction, stroke, coronary revascularization, and atrial fibrillation many years after surviving sepsis (38–41). In addition, it has been described that the appearance of cardiovascular pathologies considerably increases the risk of dying, reaching up to 80% of patients, compared to 20% who die without heart problems (42). Likewise, the alteration in the endothelial tissue that occurs during sepsis, causes a blood cell barrier deregulation that deteriorates its function of filtering toxic substances towards the brain (43) (Figure 2). These substances, such as cytokines, cause hyperinflammation and neuronal apoptosis, as well as oxidative stress, metabolism deregulation, neurotransmission alterations, cerebral signage alterations, and microcirculation alterations (44,45). The activation of all these processes causes an exacerbated gliosis, commonly observed in patients with encephalopathy associated with sepsis (43).

It should be noted that sepsis survivors are immunosuppressed, and short-term immunosuppression implies a greater risk for the patient of suffering from infections by opportunistic pathogens, which could be controlled by a healthy immune system (46). In this

sense, a large percentage of patients are rehospitalized during the month and a half after the septic episode. In addition, the immune system can be affected in the long term, causing immunosuppression that causes a significant reduction in survival (47,48).

### 9.1.2. IMMUNE SYSTEM DURING SEPSIS

The patient's immune response, both innate and adaptive, is affected when sepsis progresses since homeostasis recovery becomes more difficult as the disease progresses. Although the pathogens causing the infection are completely eliminated and the development of the disease ends, the immune capacity of the patient may not fully recover. From the classical point of view, sepsis-associated organ dysfunction and mortality have been attributed to the interplay between inflammatory and anti-inflammatory responses (50).

#### 9.1.2.1. HYPERINFLAMMATION AND IMMUNOSUPPRESSION DURING SEPSIS

Septic patients suffer an inflammatory response that causes cytokines release. Loss of local control of cytokines release is known able to lead to systemic inflammation, known as a cytokine storm, and its potentially detrimental consequences, including Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), Multi-Organ Dysfunction Syndrome (MODS), organ failure, shock and death (51,52).

The immune response is initially mediated by Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) and Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs) generated by the infection-causative organisms, which can have a bacterial, viral, or fungal origin. These molecules, PAMPs, and DAMPs, are capable of binding to recognition receptors expressed on the host's innate immune cells (53–55). The activation of these recognition receptors causes the production of numerous proinflammatory and anti-inflammatory cytokines simultaneously, which leads to the activation of opposing cellular responses, contributing to organism dysregulation. Activated responses include elevated phagocytic activity, vascular endothelial damage, leukocyte chemotaxis to infection sites, and activation of the coagulation system (53–56). In fact, in a study published by our group (57), we described an infection counteraction by the immune system during the initial stages of sepsis, perhaps through neutrophils that are part of the innate immunity system. In contrast, the adaptive immune system is not yet fully activated in these patients. However, immunosuppressive responses and procoagulation signals are active in septic patients, specifically in those with more severe clinical phenotypes (57). In this published work we describe that this group of patients has high levels of the cytokine S1008, derived from neutrophils and capable of promoting coagulation through platelet activation (58,59). Likewise, P-selectin (platelet selectin), whose function is to facilitate this process mediated by S100A8 and increase



platelet aggregation, was also found to be increased in these patients. In addition, when endothelial selectin (E-selectin) levels and D-dimer (DD) levels, highly related to coagulation processes, were analyzed, a strong correlation was also found in patients with SS. Coagulation has been closely linked to inflammation, so in sepsis, inflammation is accompanied by coagulation activation, thrombin generation, and disseminated intravascular coagulation (DIC) (60). Monocytes and neutrophils bind thrombin, which binds to activated receptors on activated endothelial cells, promoting the release of proinflammatory cytokines, especially interleukins (IL) IL-6 and IL-8, and endothelial adhesion molecules (60). Recruited leukocytes produce lytic enzymes, reactive oxygen species (ROS), and reactive nitrogen species (REN) that contribute to tissue damage at the site of infection, which may be followed by microcirculatory failure, diffuse hemorrhage, and, finally, an organ failure (60).

On the other hand, it should be noted that it has been seen that as patients survive the initial hyperinflammatory phase of the cytokine storm, many septic patients develop a potentially prolonged counterregulatory anti-inflammatory state, which tries to restore immune system homeostasis (61). This state is known as Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (CARS), which is also known as the hypoinflammatory mechanism (62–66) (Figure 3). CARS is the event responsible for short-term immunosuppression since it causes failure or exhaustion of the immune system due to opposing events being simultaneously active (67). Consequently, the dysregulation of the immune response combined with the MODS that septic patients have suffered increases short-term mortality and should contribute to the long-term mortality of these patients since opportunistic infections with a depleted immune system can be lethal to the patient (65,68–71).

It is known that SIRS is a consequence of the innate inflammatory response mainly mediated by polymorphonuclear cells (PMN) (72,73), and CARS represents the adaptive immune response (mainly lymphocytes) (74–76). Therefore, it was found that the late MODS is actually a persistent state of CARS where infections and poor wound healing are symptoms of underlying pathophysiology (75). Immunosuppression can be maintained over time, lasting months or years, producing serious comorbidities in patients who have survived a septic episode, and significantly increasing the risk of death (Figure 3).

### 9.1.2.2. SYNDROME OF PERSISTENT INFLAMMATION, ACTIVATION OF CATABOLISM AND IMMUNOSUPPRESSION

In the late 1990s, the SIRS/CARS paradigm became the explanation for the inflammatory and immunological trajectory of a patient admitted to the ICU with a complicated clinical course. Currently, with the better management of extracorporeal support therapies applied in intensive medicine, patients with severe illnesses survive for longer periods of time to the acute phases of the disease. However, some of these patients with sepsis admitted to the ICU may progress to clinical improvement or persistence of the state of physiological alterations requiring prolonged mechanical ventilatory support and other Intensive Care therapies. Among these septic patients, usually among those over 65 years of age, there is a subset of patients who suffer from what is known as Chronic Critical Illness (CCI), which is characterized by the fact that the patient is admitted to the ICU for more than 7 days and maintains a MODS in progress (Figure 3). Within this subset, another MODS phenotype called persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome (PICS) may occur when cellular catabolism and immunosuppression events are present (Figure 4) in these patients who remain in the ICU for long periods of time, and MODS is associated with a catabolic state, latent inflammation, and progressive immunosuppression (77) (Figure 3).

Patients suffering from PICS are mainly affected by a continuous low-grade inflammatory process with defects in their innate and adaptive immunity, they are also characterized by the dependent on respiratory support, frailty, malnutrition, which causes a considerable loss of body mass despite adequate supplementation and an optimized nutritional therapy; and suffer from recurrent nosocomial infections together with prolonged immunosuppression. All of this increases the probability of late death in these patients (77–79) (Figure 3). Furthermore, the severity of early PICS seems to have been related to the severity of late immunosuppression (80). This is because, in the clinic, it has been seen that patients with the worst course of the disease develop an early stage of PMN activation and kidnapping, especially neutrophils (72,74). Subsequently, there is a period in which circulating PMNs become functionally ineffective and granulopoiesis in the bone marrow is inhibited, leading to immunosuppression (81–83).

Currently, there are no clearly defined parameters to diagnose a patient with PICS, which means that each hospital defines its own. However, the most recent literature establishes some parameters to define or identify patients with PICS, consisting of weight loss (more than 10% during the time of admission), BMI (Body Mass Index) below 18, albumin below 3mg/dL, prealbumin below 10mg/dL, C-reactive protein (CRP) greater than 150mg/dL, and a total lymphocyte count less than  $800/\text{mm}^3$  ( $<0.80 \times 10^9/\text{L}$ ) (84) (Figure 4). Although the diagnosis of PICS may vary between hospitals, an upward trend in the diagnosis and prevalence of PICS has

been observed (85). The cases increase of this syndrome is an important fact since it represents a huge economic cost for the health systems (77,86) because these patients are generally referred to chronic care centers, where they fail to recover and end up dependent one year after discharge, due to they suffer from depression, cognitive impairment, complex physiologic abnormalities, organ dysfunction, neuroendocrine deficits, and immune dysfunction. In some cases, they even end up dying early (86–92) (Figure 3).

Owing to the aging of the population, PICS cases are expected to continue rising. However, there are no biomarkers available to predict immunosuppression phenomena, beyond increased IL-6 and IL-10, HLA-DR monocyte expression, and alterations in myeloid cell-derived suppressor cells (MDSC) (67,69,78). The latter include two subtypes, which can be granulocytic and monocytic, which inhibit the function of B and T lymphocytes (93). This dysregulation causes a depletion of the immune system of the patient with PICS, which is added to an increase in regulatory T cells (Tregs), which present immunosuppressive characteristics (84,94). In addition, the increased population of MDSCs, which may also participate in the immunosuppression observed in these patients (95), makes them candidates to be PICS biomarkers. However, they are no specific markers of this syndrome. For all these reasons, there is a need to develop specific biomarkers capable of predicting immunosuppression events, syndromes such as PICS, and comorbidities observed in sepsis survivors; to which the work carried out in this doctoral thesis aims to contribute.

Finally, it is important to note that this syndrome should not be confused with the so-called Post-ICU Syndrome, for which the same acronym "PICS" is used. This syndrome occurs in survivors of a septic case and refers to a disability that leads to deterioration in cognition, psychological health, and physical function (98).

### **9.1.3. ENDOTHELIUM AND VASCULAR DAMAGE DURING SEPSIS**

Endothelial cells form the inner wall of blood vessels, creating an interface between the blood and the cells responsible for organ functions. The endothelium is essential for coagulation regulation, vasomotor control through the release of molecules such as prostacyclins or nitric oxide (NO) (99), and immune function through the secretion of molecules that initiate transcellular and intercellular signaling (100). Sepsis affects almost all aspects of endothelial cell function and it has been postulated the endothelium as a key factor in the sepsis progression to organ failure (100), as it is one of the first tissues to be affected by responding to infection (101–103).

The integrity of endothelial cells as a barrier and transporter of solutes is largely determined by the endothelial cytoskeleton and glycocalyx, which are tightly regulated. The glycocalyx is involved in several key physiologic processes, including vascular barrier function, coagulation, leukocyte and platelet adhesion, shear stress transmission to the endothelium, and anti-inflammatory and antioxidant defenses (104). In fact, the expression of adhesion molecules and the production of vasoactive compounds, as well as inflammatory molecules, help the endothelium to switch from an anticoagulant to a procoagulant state (105). Glycocalyx detachment is thought to occur in the presence of oxidants, such as ROS, bacterial endotoxins (which act as DAMPs), and cytokines, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (106–108). It should be noted that the endothelium is a target and a source of inflammation since it links the local and systemic immune response (109). In this sense, endothelial activation helps fight infection locally, but systemic activation can cause microvascular thrombosis, capillary permeability, hypotension, tissue hypoxia, and ultimately tissue damage (110).

Selectins (E-selectin (E-SEL), L-selectin (L-SEL), and P-selectin (P-SEL)) mediate adhesion and rolling, while integrins such as intercellular adhesion molecule 1 (ICAM -1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) mediate firm adhesion and transcellular trafficking of leukocytes. These molecules are considerably increased on the endothelial cell surface in response to inflammatory cytokines, especially IL-1 and TNF- $\alpha$  (111). Initially, binding occurs between leukocytes, through the Sialil-Lewis carbohydrate ligands and E-selectin and P-selectin, allowing them to roll onto the endothelium. It should be noted that P-selectin in endothelial cells is not only involved in the recruitment and rolling of leukocytes but also promotes the activation of integrins through P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1), inducing greater recruiting of leukocytes (112). These leukocytes are then activated by macrophages and endothelial cells through the release of chemokines (CXCL8, CXCL1, CXCL2, and CXCL5) so that they express integrins on their surface. These integrins allow them a stronger adhesion to ICAM-1 and VCAM-1, initiating their migration towards injured tissues (113). The previously released chemokines form a chemotactic gradient that directs leukocyte migration towards infection sites, especially neutrophils, and improves their adhesion (114) (Figure 5).

It should be noted that during sepsis one of the most important clinical characteristics is hypotension, which occurs due to endothelial dysregulation caused by a mismatch in prostacyclin levels (115,116). In addition, it is known that NO is a potent vasodilator and that its levels also vary during an episode of sepsis, helping to deregulate vascular tone (117). In this sense, it has been described that the expression of P-SEL and E-SEL can vary depending on the NO concentration (118).

When the inflammatory response progresses, some adhesion molecules implicated in recruiting leukocytes are detached from cell surfaces to reduce leukocyte-endothelium interactions, in order to protect the host from excessive collateral damage (119). These molecules that have been detached from cell surfaces are soluble and accumulate in blood plasma, so measuring their blood levels can be useful for early sepsis diagnosis, predicting its severity, and predicting its outcome, since the concentration of these soluble factors (sE-SEL, sP-SEL, sICAM-1, and sVCAM-1) increase during sepsis and correlate with mortality (120,121). In fact, some studies have proposed these molecules as ideal candidates to follow the evolution of sepsis, due to the high sensitivity and specificity that they show, especially in comparison to other parameters that are currently measured such as procalcitonin. In addition, the relationship they have with organ dysfunction caused by sepsis because it has been seen that the levels of these molecules increase with organ dysfunction and normalize with the improvement of the patient (121,122). Despite their importance in endothelial and immune function during sepsis and their correlation with the sepsis progression, these molecules are not currently used as biomarkers in the clinic, nor are there studies that focus on them for the development of drugs for sepsis.

For all of the described previously, the endothelium plays a key role during sepsis development since its deregulation causes the alteration of numerous processes related to it, such as thrombosis, leukocyte aggregation, or loss of vascular tone. In addition, the endothelium is related to inflammation and the immune response, both very active in sepsis. Finally, it should be noted that endothelial alteration is closely related to organ failure and the phenomenon of disseminated intravascular coagulation that can occur during sepsis, thus contributing to mortality in these patients (123–125).

#### **9.1.4. SEPSIS EPIGENETICS**

Our research group has dedicated years to understanding how different epigenetic mechanisms are involved in sepsis (123,126–128).

Epigenetics studies the flow of information between a constant DNA sequence and the variability of the different expression patterns that can be derived from it. Epigenetic processes can produce heritable intergenerational effects, clonal propagation of cell identity, and also stable alterations in transcriptional programs, and not necessarily heritable (129). In this regard, epigenetics is a revolutionary science with the potential to improve precision medicine. Epigenetic marks can act as archives that record the natural history of disease and lifetime exposures, as well as explain the biological changes that increase our susceptibility to disease (130). Therefore, epigenetic marks can be used as biomarkers for the diagnosis and prognosis of diseases (131).

Several initiatives have been launched over the past decade to map and interrelate epigenomic data, such as the International Human Epigenome Consortium (IHEC), the Encyclopedia of DNA Elements Project (ENCODE) Consortium, the Human Epigenome Project (HEP) Consortium, the NIH Roadmap Epigenomics Consortium, the International Human Epigenome Project (EpiGeneSys), and the 4D Nucleosome Project (132–136). All this is in order to create a more complete analysis of human diseases since epigenetic biomarkers could help to obtain an early diagnosis, monitoring of the progression and prognosis of the disease outcome, and the prediction of future morbidities. In addition, epigenetic biomarkers could be used to select and stratify patients for specific treatments and to assess the effects, positive or negative, of therapeutic interventions (130).

Epigenetics includes changes in gene expression by histone post-translational modifications (PTMs), changes in the expression of non-coding RNAs such as long non-coding RNAs (lncRNAs) or microRNAs (miRNAs), among others, and changes in DNA methylation patterns. This thesis work has focused on a specific PTM: citrullination, since it is a fundamental modification for the activation of key immunological processes during the innate response activated in sepsis. In addition, the miRNAs profile in the plasma of septic patients, CCI, and PICS, as well as the changes in DNA methylation in PBMCs in these same groups of patients have also been analyzed, in order to find which expression differences, allow discriminating these subgroups within sepsis, and thus propose new biomarkers that can predict these more complex developments of the disease.

#### 9.1.4.1. POST-TRANSLATIONAL HISTONE MODIFICATIONS: CITRULLINATION

The involvement of extracellular histones as microbial agents and their ability to kill invading pathogens has been extensively investigated (137,138). In recent years it has been discovered that extracellular histones can also be cytotoxic mediators, capable of worsening the development of many diseases in which histones have been shown to be a relevant mediator (139,140). These proteins today have a central role in diseases related to inflammation and immunosuppression, such as sepsis (31,141,142). However, previous works by our group show that some histone PTMs, such as acetylation, are capable of reducing the cytotoxic capacity of extracellular histones in endothelial cells (128).

Histones in sepsis have been described as potential predictors of the disease development and as interesting candidates for therapies, since they have been seen to cause damage at a systemic level, but also at a local level, having been found in numerous organs (33,34,124,143). In this regard, our group has described how circulating histone levels correlate with patient prognosis, with histone H3 as a potential biomarker of poor disease prognosis (139).

Histone PTMs occur mostly in the tail of these nuclear proteins and can cause changes in the nucleosome assembly, thus contributing to chromatin conformation and regulation of gene expression. In this sense, the present thesis work focuses on citrullination, since it is a necessary PTM to activate immune processes such as extracellular traps (ET: Extracellular Traps), one of the first defense mechanisms of the body against infection (144,145). During sepsis, histones are released into the bloodstream primarily by immune mechanisms known as ETs, which can occur in cells such as macrophages (METs, Macrophage Extracellular Traps) or neutrophils (NETs, Neutrophil Extracellular Traps) (146,147). During these events, granulosa cells actively release chromatin and all its intracellular content into the bloodstream, creating a sticky network, capable of binding to invading pathogens, which contains highly cytotoxic proteins for pathogens, thus contributing to their elimination (32,148,149) (Figure 6).

Histone H3 citrullination (H3cit) is a key event for the initiation of ETosis processes, playing a central role in the modulation of the innate immune response (144,145).

In other pathogen clearance mechanisms, such as phagocytosis, pathogens are engulfed by a phagosome that fuses with intracellular granules to form a phagolysosome in which pathogens are killed by antimicrobial peptides, enzymes, and increased ROS (151). However, in ETosis mechanisms, immune cells such as neutrophils release an extracellular structure consisting of approximately ~15nm diameter chromatin strands to which are bound antimicrobial peptides such as cathepsin G or neutrophil elastase (151,152). In this sense, it should be noted that both macrophages and neutrophils are granulosa cells that can act by engulfing pathogens, activating cellular pyroptosis mechanisms. Pyroptosis is a mechanism by which, in addition to eliminating pathogens, it triggers an inflammatory cascade through the release of pyroptotic cytokines such as IL-1 and IL-18, and in turn is able to induce cellular ETosis mechanisms (153–155). It is interesting to note that pyroptosis is a programmed cell death process in which the cell is able to promote an inflammatory response. It has been described that NETs are capable of promoting macrophage pyroptosis during sepsis, amplifying the immune response at infection sites where there is a large recruitment of leukocytes (156). In fact, neutrophils and macrophages move rapidly from the bone marrow, where they are generated, to the site of infection, due to a systemic increase in the levels of GM-CSF (Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor), levels that our group described as elevated in septic patients during early stages of the disease, possibly because it is the key granulopoietic cytokine after infection (57,157). In addition, it has been seen that the GM-CSF increase causes a rise in the production of these cells, both macrophages, and neutrophils (157). All this overproduction of neutrophils and macrophages caused by the increase in systemic levels of GM-CSF enhances the patient's immune response against sepsis, which ultimately triggers the activation of cellular ETosis. ETosis mechanisms are essential to stop the

infection spread and the initiation of these processes has been related to a ROS increase (158). Likewise, the mechanism by which the network formed during ETosis is capable of trapping pathogens has not yet been described, although it is postulated that it is related to the negative charge that chromatin gives it (151).

Peptidylarginine Deiminases (PADs) are the catalytic enzymes of this ETosis process, being isoform 4 (PAD4) the most important in this process, although it has been described that isoform 2 (PAD2) can also act in this citrullination process (159,160) (Figure 5). In addition, PAD4 has been shown to be able to citrullinate other histones, such as H4, H2A, and H1 (161–165). Therefore, because H3 citrullination is a critical event for ETosis activation, a key immune response during sepsis, it is expected that a large proportion of H3 histones circulating in the bloodstream during a septic episode are citrullinated. In addition, since PADs are capable of citrullinating other histones and because they remain active once they have been released by ETosis processes, it is expected that a large number of circulating histones during the early stages of sepsis are also citrullinated. This is one of the bases of this work, because, despite there have been done many studies carried out to understand the role of histones during sepsis development, they can act as DAMPs activating mechanisms that affect the endothelium, contributing to the progression of sepsis (17,142,166) (Figure 6). However, there are few studies that explain whether extracellular histones released into the bloodstream and that have PTMs, such as citrullination, are involved in the course of sepsis. In this sense, previous works have observed that the inhibition of deacetylation (inducing acetylation as PTM) has positive immunomodulatory effects (167), inducing the formation of NETs, probably because the inhibition of deacetylation simultaneously causes increased acetylation and citrullination (48,168). However, despite this type of study revealing the involvement of PTMs in sepsis development, there are not many studies that explain how PTMs are involved in the cytotoxic mechanisms of histones, nor have been found correlations between PTMs and the course of the disease.

For all these reasons, the formation of ETs is a very effective immune strategy to eliminate pathogens; however, if their formation is deregulated, ETs can propagate inflammation. Furthermore, because ETs are released into the bloodstream, the first tissue to be affected will be the endothelial tissue, thus contributing to an increase in microvascular thrombosis caused by histones due to thrombin activation. Likewise, microvascular thrombosis can lead to DIC (125,170,171). These molecular events can lead to devastating cell death processes, as well as damage tissue and organ functions, causing increased inflammation and accelerating the progression of sepsis to a critical situation (172).



**9.1.4.2. REGULATORY RNAs IN SEPSIS: MICRORNAs**

Regulatory RNAs, also known as non-coding RNAs (nc-RNAs), have gained great importance nowadays, since they have been postulated as star regulators of inflammatory signaling (173,174), and they may be ideal potential biomarkers not only for sepsis but also for some the most common comorbidities associated with it (33,34).

Long non-codingRNAs (lncRNAs) are a class of regulatory RNAs composed of more than 200 nucleotides (175), capable of remodeling chromatin and regulating gene expression at the transcriptional and post-transcriptional levels in response to various stimuli (176). Deregulation of lncRNAs impacts cell functions, such as cell proliferation or apoptosis resistance (176–178), which have been linked to sepsis and its progression (179). Another recently discovered type of regulatory RNA is circular RNAs (circRNAs) (180), which are found free in the cell cytoplasm or stored in exosomes, and are formed from coding or non-coding genes by back-splicing processes (181). One of the most important characteristics of this type of regulatory RNAs is the greater stability and specificity they have in comparison to other types of regulatory RNAs, and they are also capable of indicating the stage or phase of development of a disease (182–184) (reviewed in Osca-Verdegal et al (185)). Despite all this, the most studied regulatory RNAs to date are microRNAs (miRNAs), which are short (17-25nt) conserved nc-RNAs that regulate gene expression, including their silencing, at the post-transcriptional level (186). miRNAs are biomarkers and promising therapeutic targets for the vast majority of diseases because of their high stability and their ability to control different molecular processes (186,187).

Although the origin of circulating miRNAs in sepsis remains unclear, it is postulated that dying cells, either by mechanisms of apoptosis, necrosis, or ETosis, may be responsible for releasing them (188,189). In recent years, a wide variety of miRNAs related to inflammatory or infectious processes have been described, as well as a large panel of miRNAs involved in the modulation of the immune response in sepsis (190–192). However, a consensus has not yet been reached to determine whether it is better to use a single miRNA or a set of them (miRNA signature) for sepsis diagnosis, prognosis, or clinical management (193). Indeed, this is an area that is currently beginning to be explored in research and requires a greater number of studies with larger patient cohorts to clinically validate the potential use of miRNAs in sepsis.

Recent studies have described a series of individuals and signatures of several miRNAs to diagnose sepsis and to differentiate, in early stages, more critical states such as septic shock, as well as to discriminate from other critical cases without infection. Caserta *et al.* have found a family of downregulated circulating miRNAs in plasma (miR-30d-5p, miR-30a-5p, miR-192-5p, miR-26a-5p, miR-23a-5p, and miR-191-5p), which make it possible to discriminate severe cases

of patients with sepsis from those cases that present SIRS (194). Wang *et al.* have reported low serum levels of the inflammamiRs miR-146a and miR-223 in septic patients, making it possible to distinguish patients with sepsis from those with SIRS with a sensitivity of 63% and 80%, respectively, and a specificity of 100% and 80% respectively (195). However, another study found these same miRNAs elevated in a Chinese pediatric sepsis cohort when comparing SIRS and control groups and, specifically, miR-146a levels were higher in severe sepsis (196). Another study conducted on serum samples has indicated high levels of miR-15a and miR-16 in septic patients compared to SIRS and healthy subjects. Likewise, miR-15a has shown good sensitivity and specificity in distinguishing sepsis from SIRS (197). Other studies highlight that miR-15a is a good candidate to differentiate septic patients or patients with SIRS from healthy patients. In fact, miR-15a serum levels are increased in sepsis and SIRS patients compared to controls, being higher in SIRS patients than in septic patients. Thus, Wang *et al.* postulated miR-15a as a sepsis diagnostic biomarker with good sensitivity and specificity, even higher than those obtained with PCR or PCT (197). The importance of this miRNA derives from some studies that have indicated that both miR-15a and miR-16 are upregulated also in patients with neonatal sepsis (198) and have high sensitivity and specificity, capable of distinguishing sepsis from SIRS (197). Interestingly, the downregulation of miR-15a has been linked to an abnormal immune response in patients with other diseases (199), reinforcing that it would be a good candidate to identify sepsis.

miR-122 is another miRNA that has been found in different cohorts of patients with sepsis. Elevated miR-122 has been reported in plasma and serum samples taken from patients in at least 3 studies, except for the work by Wang *et al.*, who described low levels of miR-122 (200,201). This miRNA has been related to the regulation of the response element stimulated by interferon, which increases the cellular response to INF- $\gamma$  (202), being key to the innate immune response, as it is a key proinflammatory cytokine, in addition to regulating the activation macrophages and NK cells (57).

The miRNAs described so far are just examples of the potential of knowing which regulatory RNAs, and more specifically which miRNAs, are elevated in each stage of the disease. For this reason, we want to highlight the functionality that transcriptomics has since it allows us to know what transcripts and how many are in a cell, during a specific physiological condition. Knowing the transcriptome allows us to understand the disease development, since it allows the transcript number of copies quantification, including messenger RNAs and nc-RNAs (203).

The development of RNA sequencing techniques (RNA-seq) focused on the expression of small RNAs (smallRNA-seq), and specifically of miRNAs (miRNA-seq) has allowed new ways of understanding, diagnosing, and treating different diseases (204). For this reason, miRNA

sequencing, as well as its validation, makes it possible to establish the miRNA profiles of each group of patients, compare them and find specific miRNAs for each stage of the disease. Thus, finding out which miRNAs are deregulated in septic patients or in patients with more critical phenotypes, such as patients with CCI or PICS, especially in the early stages of sepsis, could allow classifying patients who are going to have a worse evolution and require much closer monitoring in the ICU.

#### 9.1.4.3. METHYLATION AS EPIGENETIC MODIFICATION IN SEPSIS

Methylation is an epigenetic mechanism generally associated with gene suppression, which can occur in both DNA and histone tails through PTM processes. Methylation occurs by the transfer of a methyl group at carbon-5 (C5) of cytosine to form 5-methylcytosine (205). This process usually occurs simultaneously in regions that contain many cytosines, known as *CpG islands*, which are regions rich in cytosine and guanine groups, contributing to gene silencing. Thus, methylation may act in the differentiation of cells derived from lymphoid and myeloid lineages, to regulate the immune response (206,207) (Figures 8 and 9). It should be noted that the immune system functionality depends on a process of hematopoietic cell differentiation that must be well-regulated to form differentiated and functional immune cells. This differentiation is based on specific epigenetic programs that can be altered during infectious processes, as occurs during sepsis (31,208–213). Therefore, the methylation profile changes in a controlled manner during the hematopoietic development of different immune cells, such as neutrophils, macrophages (Figure 8), and B and T lymphocytes (Figure 9), although no significant methylation changes have been seen during the processes of differentiation and activation of neutrophils or macrophages (214). However, histone demethylation by *Jmjd* is known to promote M2 polarization of macrophages but is not required for M1 polarization. Likewise, the demethylation of H3K27me3 is required for the production of cytokines and the overexpression of *Arg1*, *Ym1*, and *IL1Rn* in M2 macrophages (215). Therefore, since sepsis produces changes in histone PTMs (H3K9me3, H3K27me3 and H3K4me3), it can regulate the expression of key pro-inflammatory genes such as *IL-6* and *IL-1 $\beta$* . In addition, DNMT1 activity is associated with proinflammatory cytokines release in macrophages by mediating *SOCS1* hypermethylation in M1 macrophages and hypomethylation of the same gene in M2 macrophages, this gene also is essential for the control of *IFN- $\gamma$*  production during the activation of NKs (57,215). In this sense, after exposure to LPS, macrophages show epigenetic remodeling in key genes, such as H3K9me2, and hypermethylation in promoter regions of *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-12B*, *NO*, and *TNF- $\alpha$*  (215).

It should be noted that while DNA methylation is stable in the long term in somatic cells, histone methylation patterns can be originated during the cell cycle course at different times in life, and may be caused by diseases such as sepsis (215). Thus, some studies indicate that DNA and histone

methylation are connected. In fact, Sarraf and Stacheva have shown that DNA methylation and histone methylation occur together during replication to ensure that specific methylation patterns are passed on to cell progeny (216).

So, characterizing the methylation changes of the gene promoters involved in the immune cell regulation would provide candidate biomarkers for the sepsis diagnosis and prognosis, as well as a great advance in understanding the pathophysiology of sepsis (217). However, despite the potential that this kind of research may have, not many studies in this field have been performed on patients with sepsis. For example, Zemmour et al, analyzed methylation changes in 100 septic patients, specifically in the *FAM101A* locus, and found high levels of unmethylated copies in these patients. Furthermore, they found that an amount greater than 10 copies per milliliter of *FAM101A* was a highly predictive biomarker of poor prognosis in patients with sepsis (218).

Likewise, other studies have been carried out in neonatal sepsis. Thus, studying methylation in neonatal sepsis samples may allow us to understand what cellular mechanisms may be altered in babies who suffer from it since it has been observed that during sepsis, the overall methylation of the DNA of blood cells increases in newborns who suffer from neonatal sepsis (219,220). In this regard, our group has recently published a study in which it found 1051 DMRs in promoters and 119 DMRs in genes with statistically significant differential methylation between preterm infants with sepsis and preterm control infants, of which a total of 26 promoters were found with a difference greater than 10% (220). The main hypomethylated promoters obtained in this work are involved in the immune response (*EGOT*, *IL10*, *CPT1B*, *PILRA*, *ELANE*, *TREMI*, *PRTN3*, *MIR145*, *S100A8*, *CSTA*, *MS4A3*, *ATP8B4*, *CPT1B*, *CMYA5*, *LRG1*, and *CD300LB*) and the main hypermethylated genes are related to adaptive immunity, specifically with the activation of T lymphocytes (*CD3G*, *CD3D*, *LTA*, *TXK*, *UBASH3A* and *SIT*). Likewise, Dhaset et al. have studied DNA methylation changes in samples from patients with neonatal sepsis and have found methylation differences in 64 genes (221). The authors highlighted the methylation differences found in *PCDHB*, which are genes involved in the immune response, for controlling leukocyte cell adhesion through cadherins, and in the Wnt signaling pathway, involved in proper development. Specifically, they found the genes *PCDHB5*, *PCDHB6*, *PCDHB7*, *PCDHB9*, *PCDHB11* and *PCDHB12* hypermethylated in leukocytes. Similarly, Dhas et al. have found that the *CCS* gene, related to the antioxidant response, is hypermethylated, and the *DEGS2* gene, related to sphingolipid metabolism, is hypomethylated (222,223).

Lorente-Sorolla et al. analyzed the methylation differences that occur in monocytes from septic patients and patients with non-infectious SIRS and observed that the *IL1A*, *CCL22*, *CCR2*, and *STAT3* genes were hypermethylated and the *HLA-A*, *SOCS1*, *IL1R2*, and *CD46* genes were hypomethylated. In addition, this work also identified a significant relationship between the levels

of the anti-inflammatory cytokine IL-10, the pro-inflammatory IL-6, and changes in DNA methylation, which increased significantly in patients with sepsis (224). Lorente-Sorolla et al. correlated DNA methylation with greater organ dysfunction (higher SOFA score) in patients with sepsis. The same was done by Binnie et al., who correlated clinical phenotypes with worse prognoses with changes in DNA methylation (225). They concluded this thanks to the methylation differences found when analyzing samples from septic and non-septic patients with Infinium 450K (Illumina) methylation arrays. Among the genes they found, some of them are strongly related to the immune response during sepsis, among which *MPO*, *ANGPT2*, *LPO*, *MHC class I A and C*, *MHC class II DQ  $\beta$ -I isotype and DR  $\beta$ -I isotype*, *LIPA*, *PONI*, *FCG2A*, *IL23A*, among others (225). Some of these genes are also hypermethylated in active B cells, such as *MHC-II*, *HLA-DR*, *HLA-DL*, and *HLA-DQ*, inducing immunosuppression phenomena (215).

Described works provide robustness to the idea that methylation pattern changes can be used to diagnose sepsis, as well as to know the patient's prognosis during early stages. In addition, it has been seen that the genes that show changes are related to the immune response (Figures 8 and 9), so methylation could explain the long-term immunosuppression that is generated in these patients since advances in this field have allowed beginning knowing what happens during the sepsis physiopathological process. Among others, it has allowed us to understand how occurs the deregulation of the host's immune response, including the inflammatory response since some studies have defined how DNA methylation changes in different cell models because of the exposure to LPS (Lipopolysaccharide) (226–228). Human monocytes are able to change DNA methylation patterns when exposed to LPS while acquiring endotoxin tolerance (224). Likewise, studying methylation has made it possible to understand how immunoparalysis mechanisms are produced in immune cell reprogramming, so the study of DNA methylation could be key for understanding the processes that lead many septic patients to develop a PICS.

DNA methylation can occur at the promoter level, silencing gene expression. This is what happens to *IL6*, the classic inflammatory IL, as well as *IL8*, tumor necrosis factor-alpha (*TNFA*), or some Toll-Like Receptors (*TLR2* and *TLR4*). However, these genes have not shown methylation changes at the promoter level in blood samples from neonatal sepsis (229). However, Tendl *et al.* found differences in methylation in CpGs of the promoter of the *CALCA* gene, involved in the response to bacterial infections, since it has been described that it regulates PCT transcription during bacterial infections, and can be used as an epigenetic biomarker for the diagnosis of bacterial sepsis in preterm neonates (229,230).

Likewise, hypomethylation of the *FOXP3* promoter in regulatory T cells (Tregs) compared to naive CD4 + T cells in septic patients, could indicate the state of T lymphocyte cell proliferation (231,232). Therefore, knowing the methylation status of *FOXP3* in these regulatory cells could

help to indicate the patient's immune status, since an increase in Treg may be related to the long-term immunosuppression observed in septic patients, due to it inhibits the inflammatory response (233). Consequently, knowing the methylation pattern of this gene could help to predict post-septic immunosuppression.

The viability and function of memory B lymphocytes are also mediated by DNA methylation, presenting differential patterns of DNA methylation (234), so knowing the specific DNA methylation patterns of B lymphocyte dynamics, as well as the production of regulatory B cells and their role in immune function would be of great help to understand the immunosuppression phenomena that sometimes occur in sepsis. Thus, it has been seen that SS patients have a greater number of Breg cells, Treg cells, and depleted B cells, and a much lower capacity for B cell proliferation (235). In addition, it has been seen that MDSCs are responsible for immunosuppression mediated by B lymphocytes, capable of suppressing the activation of effector CD8<sup>+</sup> T cells (236). Likewise, MDSCs can also mediate the inhibition of T lymphocytes through the expression of arginase-1, which causes a suppression of L-arginine, necessary for the function developing of T cells (237). Thus, a study demonstrated that hypomethylation of the ARG1 gene promoter is decreased in MDSCs by using an exogenous cannabiodiol such as 9-tetrahydrocannabidiol since it is a potent inducer of the MDSCs immunosuppressive function (237).

Everything described so far makes clear the importance of methylation changes in the immune response and how these changes can explain long-term immunosuppression in patients with sepsis, both neonates and adults.

In summary, since sepsis is one of the main causes of death in ICUs, producing one in five deaths worldwide (239), it is necessary to reduce the high mortality rate associated with it, so the discovery of new biomarkers that allow early identification of sepsis would be very useful. Likewise, rapid and early diagnosis would help to carry out a better treatment, avoiding evolution to worse clinical phenotypes, such as ECC and PICS. On the other hand, knowing the epigenetic mechanisms that underlie the reprogramming and function of immune cells would allow us to know how the immunosuppression phenomena that contribute to the PICS phenotype are produced, and even establish a molecular profile that allows adequate defining of this clinical phenotype. Likewise, patients who survived septic episodes would show fewer comorbidities, reducing the high economic costs that this implies for health systems, not only in our country but worldwide. For all these reasons, elucidating the molecular mechanisms activated by extracellular histones and the epigenetic changes that occur in the immune cells of these patients once sepsis has occurred, especially at the immune system regulation level, will help to understand the

molecular bases of sepsis and the immunosuppression phenomena of the PICS phenotype, allowing the discovery of new diagnostic and prognostic biomarkers, as well as the development of new and more effective therapies for the sepsis treatment.

### 9.2. HYPOTHESIS

The hypothesis of this work postulates that the levels of citrullinated histone H3, secreted into the bloodstream by an organism defense mechanism such as NETosis, should be high during the initial stages of sepsis, generating less damage compared to histones without this post-translational modification. Understanding the molecular mechanisms activated or mediated by citrullinated histones will allow us to establish what role this modification plays during the patient's innate immune response. Likewise, we propose that analyzing the levels of circulating histones, and in particular citrullinated H3 levels, in septic patients will allow us to establish biomarkers of disease development and progression, as well as to propose new therapies. In the field of sepsis, another need in the clinic is to identify specific endotypes of patients that can evolve to more severe stages. For this reason, the microRNAs expression patterns and the changes in DNA methylation may be used to classify the clinical and evolutionary phenotypes of patients with sepsis, making it possible to detect those patients who can be classified as chronically critically ill or who may develop a syndrome of persistent inflammation, activation of catabolism and immunosuppression, thus establishing adequate follow-up protocols for these patients, in order to reduce the high mortality and improve the quality of life of septic patients who survive sepsis.

### 9.3. OBJECTIVES

The main objective of this doctoral thesis is to propose new biomarkers that serve for the patients' diagnosis and prognosis with sepsis, as well as to classify some specific phenotypes of sepsis, such as Chronic Critical Illness (CCI) and Persistent Inflammation Syndrome, activation of catabolism and immunosuppression (PICS).

To this end, the following specific objectives have been defined:

- 1-. To determine the effect and molecular mechanisms activated by citrullinated extracellular histones in an *in vitro* model of human endothelial cells, comparing the cellular response when exposed to native extracellular histones and citrullinated extracellular histones.

2.- To analyze the levels of circulating histones and those of citrullinated histone H3 (H3cit) in plasma samples of septic patients admitted to the ICU, establishing a follow-up of their levels throughout their stay in the ICU.

3.- Understand the effect of circulating histone levels and H3cit on the clinical phenotypes and evolution of patients during their stay in the ICU.

4.- To evaluate the changes in the expression of microRNAs in plasma in different groups of septic patients, including patients with CCI and PICS, in addition to correlating the results obtained with the clinical phenotypes of these patients.

5.- To analyze changes in DNA methylation patterns in peripheral blood mononuclear cells obtained from different cohorts of septic patients, including patients with CCI and PICS, and to correlate the results obtained with the clinical phenotypes of these patients.

#### **9.4. RESULTS AND DISCUSSION**

##### **9.4.1. *IN VITRO* INDUCTION CITRULLINATION IN HUMAN EXTRACELLULAR HISTONES**

Citrullination of extracellular histones obtained from HeLa cells (described in section 5.3) was performed following the protocol described in section 5.5. For this, the PAD Cocktail (SignalChem, Richmond, Canada) was used, which contains different isoforms of the enzyme Peptidylarginine Deiminase (PAD), responsible for the citrullination of proteins.

To analyze the most efficient ratio of histones:PAD, different amounts of histones and PAD (1:1) were used, and the levels of citrullinated histones were determined by analyzing the relative levels by Western blot of H3R2cit, H3R8cit, H3R17cit, by being the Arginine residues R2, R8 and R17, the main target residues of citrullination (163), comparing them with the expression levels of H3 by means of Western Blot (Figure 14A). The highest amount of citrullinated histones were found, significantly, in the condition that used the same proportion of histones and PAD (Figure 14B). Therefore, it was decided that to induce histone citrullination in the following experiments, the ratio 1:1 (Histones:PAD) would be used. What we were able to observe was that the amount of PAD available is directly proportional to the citrullination induced under *in vitro* conditions.

To make sure that the histones that we were going to use for endothelial cell treatment were indeed significantly citrullinated compared to histones under native conditions, without any induced PTM, the global citrullination levels of all histones were compared using an anti-citrulline



antibody. As seen in Figure 14C-E, induction of citrullination increased citrullination levels compared to histones that were not exposed to the PAD Cocktail and showed that, although histone H3 is the most citrullinated, this cocktail of enzymes also citrullinated other histones, such as H2A, H2B, and H4. This agrees with previously published literature since it has been described that most histones are capable of citrullination by the action of PAD (165,251,252).

#### **9.4.2. CITRULLINATED EXTRACELLULAR HISTONES DO NOT AFFECT CELL VIABILITY IN HUVEC**

Some works have associated extracellular histones with the activation of mechanisms related to cell death (123,126,253). However, citrullinated histone H3 (H3cit) has not been reported to be capable of causing cell damage (147). In addition, it should be noted that histone citrullination consists of an amino group substitution for an oxygen group, through a deamination process (Figure 7), which does not have a significant effect on the molecular weight but does on the charge of the histones, transforming the initial positive charge of an  $\text{NH}_4^+$  group into a neutral charge. This effect on charges is significant and can affect the protein tertiary structure, as well as protein-protein and protein-nucleic acid interactions (254). As mentioned in the introduction, a large number of histones are released into the bloodstream in septic patients (166), among which we postulate that a large amount of them are released with citrullinated Arginine residues due to the activation of immune mechanisms related to ETosis events, for which H3 citrullination is essential. For this reason, the molecular mechanisms activated by citrullinated histones in an *in vitro* model of endothelial cells (HUVEC) were analyzed, since the endothelium is the first tissue that comes into contact with histones when they are released into the bloodstream.

HUVEC viability was analyzed using the MTT assay, flow cytometry, and light microscopy (described in section 5.7) after being challenged with native and citrullinated extracellular histones for 4 hours.

MTT results (Figure 15A) showed similar cell viability between the control and those cells exposed to citrullinated histones. These results suggest that citrullinated extracellular histones do not induce cell damage, whereas cells exposed to native histones showed significantly reduced viability. These results were corroborated by flow cytometry, measuring the percentage of cells positive for Annexin V and for IP, probes that mark cell death (Figure 15B). The cells with lower viability and higher mortality were those exposed to native histones, while cells exposed to citrullinated histones did not show differences in viability or mortality compared to the control. Likewise, when analyzing cell viability by light-field optical microscopy, aggregates capable of causing precipitates were observed that were not observed in cells exposed to citrullinated histones (Figure 15C). These aggregations can be explained by the positive charges that the

extracellular histones have, capable of interacting with a more negative environment such as the cell exterior due to the glycocalyx (254–256). On the contrary, and in line with what we have just described since the citrullinated histones present a neutral charge induced by the citrullination modification (Figure 7), these interactions causing cell aggregates are not observed.

The results obtained when HUVECs were exposed to citrullinated histones, and the lack of cell damage associated with this exposure, supports our initial hypothesis that citrullinated histones should induce less cell damage than histones under native conditions (166). This is due to their role in the innate immune response since they act as promoters of immune events such as ETosis, mainly NETosis (mediated by neutrophils) and METosis (mediated by macrophages) (146,151,257).

#### **9.4.3. HISTONE CITRULLINATION DECREASES THE ABILITY OF EXTRACELLULAR HISTONES TO PRODUCE OXIDATIVE STRESS AND THE ACTIVATION OF THE ANTIOXIDANT RESPONSE MEDIATED BY EXTRACELLULAR HISTONES**

Previous work by our group has shown that extracellular histones induce oxidative stress and deregulate the cellular antioxidant response (128). Since citrullinated histones did not induce changes in cell viability, we analyzed the antioxidant response to assess whether or not citrullinated histones were capable of modifying this response. HUVECs exposed to native extracellular histones showed overexpression of the enzymes involved in the detoxification of superoxides (SOD1 and SOD2) and hydrogen peroxide (CAT and GPX1). While HUVEC exposed to citrullinated histones only showed an increase in mRNA expression, it did not lead to an increase in protein expression of antioxidant enzymes (Figure 16).

The results obtained so far would explain that citrullinated histones are not cytotoxic to endothelial cells, as are native histones but also that these citrullinated histones are not activating cellular responses related to defense against cell damage since that one of the first responses activated to cell damage is the activation of the antioxidant response to increased oxidative stress (258). With the results obtained in these *in vitro* experiments, in which endothelial cells are not activating an antioxidant response when exposed to citrullinated histones, we interpret that they are not causing oxidative damage. However, cells exposed to native histones need to activate this antioxidant response to combat the oxidative stress that they would be generating.

#### 9.4.4. EXTRACELLULAR HISTONES ALTER PROSTANOID BIOSYNTHESIS IN HUVEC

Prostanoids are molecules produced and released by endothelial cells, involved in endothelium contraction and relaxation, acting at the smooth muscle level (259). In this regard, we analyzed whether native and citrullinated extracellular histones modify normal endothelial function by exposing HUVECs to extracellular histones (native and citrullinated) and evaluating gene and protein expression levels of prostacyclin synthase (PGIS), thromboxane synthase (TBXAS), and endothelial nitric oxide synthase (eNOS).

When HUVECs were exposed to native extracellular histones, both PGIS and TBXAS dramatically increased their expression (Figure 17A). This overexpression was not observed in HUVECs exposed to citrullinated histones. Despite this, the PGI<sub>2</sub>/TBXA<sub>2</sub> ratio was not altered in either of the two cases (Figure 17).

Surprisingly, endothelial cells exposed to native histones showed reduced eNOS levels, while those exposed to citrullinated histones increased them (Figures 17A and B). In addition, gene expression changes were translated into protein expression changes (Figure 17). The increased expression of eNOS levels indicates that, despite the fact that citrullinated histones are not inducing damage in HUVECs, they are causing an effect on them.

Importantly, iNOS (inducible nitric oxide synthase) is a significant source of nitric oxide. However, numerous studies show that the activation times of this enzyme are greater than 4h, the working time of the present study. In Kroll and Waltenberger work, they exposed the HUVEC to LPS for 24h to analyze changes in iNOS expression (260), while Qi *et al* exposed the cells to changes in glucose for 3 days (261). In this regard, it is important to highlight that de Asis *et al* observed that HUVECs lose efficiency in activating iNOS over time, noting that their activation begins 12h after isolation of these cells from the umbilical cord, reaching its maximum expression at 3 days and presenting undetectable levels after 7 days (262). For this reason, it is important to emphasize that HUVECs are an *in vitro* model that represents an approximation of what happens in a complete organism but does not exactly replicate what happens. In this sense, we want to underline that despite the fact that iNOS levels were measured in HUVECs exposed to histones for 4h (results not shown), no changes in iNOS expression levels were detected.

It has been described that the oxidative stress increase causes a reduction in the bioavailability of nitric oxide, causing an alteration in vascular tone, deregulation of endothelial cells, inflammation, apoptosis, and alterations in the extracellular matrix (263). The results obtained in this work agree with this study, in addition to making sense of the increase in oxidative stress

caused by extracellular histones in native conditions on HUVEC cells and the decrease in eNOS observed in these cells. However, here it is necessary to indicate that patients with sepsis usually have a drop-in mean arterial pressure, and therefore need to maintain it with the use of vasopressors (16,42,215), so the role of eNOS is not the only one involved in this event. In this sense, iNOS has also been described as a key immune mediator during sepsis, and animal models with CLP-induced sepsis, such as mice, have been observed to show changes in cell migration and hypothermia associated with iNOS activity after 24h (264). On the other hand, the work by Konukoglu and Uzun also explains that the increase in eNOS activity would cause an antiapoptotic activity, which would explain the results we obtained when exposing cells to citrullinated histones (265), in which we observed an increase in expression of this enzyme and we did not observe a reduction in cell viability.

The different modulation suffered by eNOS as a consequence of HUVEC exposure to native or citrullinated histones, as well as the results obtained in cell viability, reinforce the idea that although ETosis may be related to thrombotic events and tissue damage (266), the citrullinated histones that are released during this process are not contributing to the damage associated with it. Similarly, native histones also affect prostanoid synthesis, increasing the expression of cyclooxygenases, prostacyclin, and thromboxane, which, together with nitric oxide, affect vascular homeostasis. As a consequence, while native histones deregulate endothelial cells, as our research group has previously shown (123,126,253), citrullinated histones do not alter endothelial function.

#### **9.4.5. EXTRACELLULAR HISTONES ACTIVATE INFLAMMATORY PATHWAYS AND MODULATE PROSTANOID BIOSYNTHESIS PATHWAYS IN HUVEC**

Cyclooxygenases (COX) are the prostanoids regulator's par excellence (267). The different COX isoforms (1 and 2) are considered important mediators of different inflammatory proteins such as interleukin (IL)-6 (268). Specifically, COX-1 modulates the synthesis of TBXA<sub>2</sub>, while COX-2 is responsible for the synthesis of PGI<sub>2</sub>, in addition to being related to inflammatory phenotypes (268). In this sense, IL-6 is one of the first cytokines to be released during inflammation, including the hyperinflammatory cascade that occurs during sepsis (269). Inflammation in the endothelium has been related to the immune response, where the intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), the vascular adhesion molecule (VCAM-1), and endothelial selectin (E-SEL) play a fundamental role in mediating leukocyte rolling, where E-SEL is involved, and transendothelial migration, in which ICAM-1 and VCAM-1 are involved (270).

As we will now see, our results showed that HUVECs exposed to native extracellular histones induced COX-1 expression, whereas cells exposed to citrullinated histones did not (Figure 18A). These results were consistent with those previously obtained with variations in prostanoid levels since their expression was increased in cells exposed to native but not citrullinated histones (Figure 17).

COX-2 levels were increased in HUVECs exposed to extracellular histones, both in their native and citrullinated forms. However, cells exposed to citrullinated histones did so to a lesser extent than those exposed to native histones (Figure 18A). The increase in COX-2 indicates that extracellular histones could be capable of inducing an inflammatory response, which was confirmed by analyzing IL-6 levels. The levels of this cytokine were found to be increased both in cells exposed to native and citrullinated histones (Figure 18B), although to a lesser extent in the case of the latter. Similarly, HUVECs exposed to native extracellular histones increased the expression levels of ICAM-1, VCAM-1, and E-SEL (Figure 18B), while those exposed to citrullinated histones increased the levels of VCAM-1 and E-SEL, but to a lesser extent, and did not change ICAM-1 expression (Figure 18B). This fact suggests that both types of extracellular histones should contribute to the recruitment of leukocytes in places where there is tissue damage or inflammation in order to achieve the production of the native immune response at the site of infection.

Other authors have associated the histones release into the bloodstream with inflammation (138). In the present work, it has been observed that both native and citrullinated histones were capable of inducing IL-6 expression, although histones under native conditions produced a greater increase in this cytokine in endothelial cells than citrullinated histones. In addition, VCAM-1, ICAM-1, and ESEL, involved in the endothelium-mediated immune response, were overexpressed in both native and citrullinated histone-exposed cells. Therefore, we propose that citrullinated histones have the ability to enhance an immune response without causing harm to the host organism, confirming our hypothesis that citrullinated histones are less cytotoxic than native histones.

With these results, we can conclude that the citrullinated histones would be mediating inflammation, as well as the activation of an immune response mediated by the endothelium. The activation of an immune response, without the activation of patterns of oxidative stress or cell death, may indicate the protective role of citrullination, since citrullinated histones would be capable of acting as a stimulus to mediate an immune response without inducing damage.

So far, we have analyzed the different molecular mechanisms that activate citrullinated histones in endothelial cells. The importance of understanding how histone citrullination works lies in the

hypothesis that a large number of histones released into the bloodstream during the onset of sepsis must be citrullinated, as a consequence of the activation of different ETosis, processes of innate immunity.

NETs, produced by neutrophil ETosis, are key mediators in the induction of pyroptosis in macrophages during septic processes, increasing the immune response at infection sites where there is a large recruitment of leukocytes (156). It should be noted that, as described by our research group, during the early stages of sepsis, systemic levels of GM-CSF rise, a key granulopoietic cytokine after infection and responsible for increasing the systemic levels of neutrophils and macrophages and directing them to the site of infection (57,157). Since the most abundant ETosis are those of neutrophils and macrophages, and these are cells that increase their population during infection, in some way due to the action of the cytokine GM-CSF, we expected to find high levels of both circulating histones and citrullinated histones in patients' plasma samples. For all these reasons, circulating histones levels and citrullinated histones in patients' plasma samples at different times during their stay in the ICU were analyzed and correlations were established between the levels obtained and the patients' clinical characteristics, in order to corroborate whether the results obtained *in vitro* could explain the different clinical phenotypes of the patients.

#### **9.4.6. CIRCULATING AND CITRULLINATED HISTONE LEVELS ARE HIGHER IN PATIENTS WITH SEVERE PHENOTYPES**

Circulating histones were measured by mass spectrometry in 88 plasma samples obtained from patients with sepsis and SS, in different clinical stages. The same 88 plasma samples were used to measure H3cit levels, in order to compare the evolution of circulating histone levels (Figure 19A-B) and circulating H3cit levels (Figure 19C-D) and to analyze how their levels varied throughout the stay of the patients in the ICU (selection of patients explained in more depth in section 5.10).

Figure 19A shows the levels of circulating histones among the different groups analyzed, finding the highest levels in patients with the worst clinical phenotype (non-surviving SS). Figure 19B shows the evolution of circulating histone levels throughout the stay in the ICU of the patients, without observing significant differences. Figure 19C presents the H3cit levels between the different groups analyzed, showing significant differences between all of them, especially between the least affected group, sepsis survivors, and the most affected group, SS non-survivors. In addition, it should be noted that histone H3cit levels increased as the patients worsened, with the group of septic patients showing the lowest H3cit levels, and the non-surviving SS group

showing higher H3cit levels. It could indicate an attempt to trigger a more active immune response to try to save the patient.

Finally, Figure 19D shows the evolution of H3cit levels throughout the patient's ICU stay, observing a significant reduction in H3cit levels as time passes. Thus, the highest levels of H3cit were found in the first sample, taken during the first 24h of the patient's admission to the ICU. This could be due to the fact that ETosis events are associated with innate immunity, which is especially active during the early stages of the infection, and as the adaptive immunity mechanisms are activated, the innate immunity reduces its activity (Figure 3) (77). All this would be in line with previously published results by our group, where high levels of GM-CSF were found in sepsis plasma samples at early times, this cytokine is capable of enhancing neutrophils and macrophages production and segregation, cells implicated in ETosis mechanisms (57).

It should be noted that, when comparing the levels of circulating histones with the levels of H3cit, it can be observed that the circulating histones levels are almost ten times higher (Figure 19A and C), reaching circulating histone levels ~1000ng/mL and H3cit ~100ng/mL. This observation allows us to conclude that only one-tenth of the histones circulating in the bloodstream of patients with sepsis are citrullinated. Therefore, those that act by deregulating endothelial activity will be mainly the native histones, (without induced modifications). This agrees with the results obtained in the *in vitro* experiments since we demonstrated that the histones that really induce tissue damage are the native histones, which present higher levels in septic patients, and even more so in patients with SS.

When the levels of circulating and citrullinated histones are studied in the different patient groups to analyze how they vary during the time that the patients are admitted to the ICU, we observe that patients who have survived sepsis do not show significant variations in circulating histones nor citrullinated between the different times studied (Figure 20A-B). However, patients with SS did show differences in their concentrations throughout their stay in the ICU. Those who have suffered SS but have survived reveal significant differences in H3cit levels, showing their reduction as time passes (Figure 20C-D). SS patients who died showed a similar trend to surviving patients, with H3cit levels decreasing as the disease progressed (Figure 20E-F). However, no significant differences were observed in these patients. This could be because insufficient samples from this cohort were included to be able to see a statistical difference, which is a limitation of the study.

Although H3cit levels are time-reduced, circulating histone levels are not significantly reduced at any time during the disease. However, when the circulating histone levels of each group of patients are compared (Figure 20), we observe that the less affected patients (the surviving septic

patients) present much lower histone levels (~1500ng/mL) than the most severe patients. Thus, as the clinical phenotype became more severe, histone levels increased, reaching levels of up to ~6000ng/mL for surviving SS patients and up to ~20000ng/mL for SS patients who died (Figure 20). Therefore, circulating histone levels correlate with the most disease-severe phenotypes (271) and could serve as a prognostic marker, since higher histone levels in the first sample taken are related to worse evolution. In addition, it should be noted that the initial levels of circulating histones remain constant throughout the period of ICU stay.

Interestingly, H3cit levels are also lower in sepsis patients than in SS patients, rising from ~80ng/mL to ~300ng/mL respectively (Figure 20), suggesting that the immune response activated by each group of patients is different. Since ETosis events are activated when they need to fight infection and the immune system is not able to fight it with less aggressive mechanisms (146), it is expected that these defense mechanisms are more active in the most severe patients. In addition, patients with SS have greater organic damage compared to septic patients, so the activation of their immune system is greater in these patients. Circulating H3cit levels, unlike those observed in circulating histones, were reduced as the length of ICU stay increased. This reduction can be explained by the decrease in innate immunity activity as adaptive immunity is activated (96) (Figure 3), and the decrease in innate immunity events such as ETosis, the main causes of increased levels from H3cit. Another hypothesis for this reduction in H3cit levels would be the reduction of cells capable of inducing ETosis, either because they have been destroyed as the previous ETosis processes have been activated, or because the patient's immune response may be compromised as the patient requires more time to overcome sepsis. Some authors have described that as the disease progresses, the patient's immune system becomes exhausted, reducing its activity and leading to immunoparalysis (62,272,273), thus reducing these ETosis events that release citrullinated histones.

#### **9.4.7. CORRELATIONS BETWEEN CLINICAL FEATURES AND CIRCULATING HISTONES AND CITRULLINATED H3 LEVELS**

After studying the variation of circulating histones levels and circulating H3cit between the different patient groups and throughout their ICU stay, we carried out a series of correlation analyses between the clinical parameters, the mass spectrometry values obtained for the circulating histones, and the values obtained for the H3cit analysis of each patient. In this way, we calculated the Spearman correlation coefficient for the clinical parameters in all the study cases, including patients with sepsis and SS. The statistical values (correlation coefficients and p-value) are shown as heat maps in Figures 21, 22, and 23. The tables presenting the statistical



values, including the value of the correlation coefficients and the p-value, are shown in supplementary tables S2 to S10 in the annexes section.

#### 9.4.7.1. CORRELATIONS IN PATIENTS SURVIVING A SEPSIS EPISODE

Focusing on the group of patients who survived an episode of sepsis (Figure 21), some significant correlations were found (Tables S2-S4, Annexes I) during the first 24h after admission to the ICU of the patients (1st sample) (Figure 21A), as is the case of the correlation between circulating histones and circulating H3cit (Spearman  $r=0.451$ ,  $p=0.05$ ). In addition, a moderate positive correlation was found between circulating histones and quick SOFA (Spearman  $r=-0.525$ ,  $p=0.021$ ), lactate (Spearman  $r=0.668$ ,  $p=0.002$ ), leukocytes, and PMNs (polymorphonuclear cells). (Spearman  $r=0.658$ ,  $p=0.002$  and Spearman  $r=0.451$ ,  $p=0.05$ , respectively). Circulating histones also correlated with total prothrombin (Prot Tot) (Spearman  $r=0.47$ ,  $p=0.042$ ), Activated Protein C (APC) (Spearman  $r=-0.83$ ,  $p=0.000$ ), and Functional Protein C (ProtFuncC) (Spearman  $r=-0.574$ ,  $p=0.010$ ). Likewise, some correlations were also found between circulating H3cit and lactate (Spearman  $r=0.772$ ,  $p=0.000$ ), and with activated partial thromboplastin time (APTT) (Spearman  $r=0.542$ ,  $p=0.016$ ). When observing the heat maps obtained for the 2nd and 3rd samples (corresponding to the samples obtained on days 3 and 5 in the ICU) in the group of patients with sepsis (Figures 21B and 21C), no correlations were found for circulating histones, nor for circulating H3cit.

In the correlations obtained in the surviving septic patient's group, it was observed that, despite the fact that many of the clinical variables showed considerable alteration in these patients at the onset of the disease, most of these variables reestablished over time (Figure 21). In fact, in the samples obtained during the third day of ICU admission (Figure 21B), no correlations were observed between the circulating histones with the different clinical and biochemical parameters measured in patients, nor were there any correlations between the circulating histone H3cit and these parameters. However, correlations of circulating histones and histone H3cit with clinical parameters and biochemical markers that define the phenotype of a septic patient were observed in the first sample obtained. Some of these clinical parameters are elevated lactate levels, indicating organic damage associated with sepsis, and correlations with leukocytes and PMN indicating the activation of the immune system to try to recover the body's homeostasis, fighting the pathogens that cause the infection. Likewise, a positive correlation was observed with Total Prothrombin and a negative correlation with the PCA protein, indicating that there are alterations in the common coagulation pathway and that the anticoagulant response is not properly activated. However, reinforcing our hypothesis on the protective role exerted by histone citrullination, a strong positive correlation with APTT was observed, which would indicate that a longer time is required for thrombus formation (Figure 21A). All these observations are reinforced by the fact

that no correlations were identified throughout the ICU stay of the surviving septic patients, probably due to a better evolution of the disease and the discharge of these patients after a short ICU stay.

#### 9.4.7.2. CORRELATIONS IN PATIENTS SURVIVING A SEPTIC SHOCK EPISODE

In SS survivors' group (Figure 22; Tables S5-S7, Annexes I), the different correlations were studied during the first 24h after ICU admission (1st sample; Figure 22A). Circulating H3cit correlated with Lactate (Spearman  $r=0.0486$ ,  $p=0.035$ ), while circulating histones showed correlations with quick SOFA (Spearman  $r=-0.777$ ,  $p=0.000$ ), SOFA Tot (Spearman  $r=0.456$ ,  $p=0.050$ ), Lactate (Spearman  $r=-0.465$ ,  $p=0.045$ ), C-Reactive Protein (CRP) (Spearman  $r=-0.505$ ,  $p=0.027$ ), Platelets (Spearman  $r=-0.561$ ,  $p=0.012$ ), Total Prothrombin (Spearman  $r=0.498$ ,  $p=0.030$ ), Ultra Sensitive Troponin (TropUS) (Spearman  $r=0.716$ ,  $p=0.001$ ), D-Dimer (DD) (Spearman  $r=0.661$ ,  $p=0.002$ ), ATTP (Spearman  $r=0.600$ ,  $p=0.007$ ), PCA (Spearman  $r=-0.632$ ,  $p=0.004$ ), and Functional Protein C (Spearman  $r=-0.726$ ,  $p=0.000$ ). In Figure 22B, 2nd sample obtained during the third day of ICU admission, circulating histones correlated with APTT (Spearman  $r=-0.841$ ,  $p=0.036$ ) and PCT (Procalcitonin) (Spearman  $r=0.714$ ,  $p=0.014$ ); and circulating H3cit correlated only with total Prothrombin (Spearman  $r=-0.663$ ,  $p=0.0226$ ). In the 3rd sample (obtained during the 5th day of ICU admission) (Figure 22C) circulating histones correlated with CRP (Spearman  $r=0.745$ ,  $p=0.017$ ) and with Leukocytes (Spearman  $r=0.758$ ,  $p=0.015$ ), while H3cit correlated with Total Prothrombin (Spearman  $r=-0.611$ ,  $p=0.049$ ).

These patients belong to the group with the most severe sepsis phenotype, SS, but they survived. However, it is important to note that sepsis has frequently been associated with long-term comorbidities and, in fact, a large percentage of septic survivors are at high risk of death within 2 years of their septic episode (274,275). Some of the correlations found could explain these outcomes.

Among the correlations observed in the surviving patients with SS, all the parameters related to coagulation stood out, since positive correlations were found for all the factors involved in coagulation (total prothrombin, TropUS, DD, and APTT) and negative correlations with the anticoagulant factors (PCA and functional Prot C). This is especially interesting because numerous authors have linked histones with coagulopathies, especially histone H3, as well as with an increased risk of death (276,277). In addition, it was observed that the APTT correlated negatively with the second sample, probably contributing to the development of DIC (Disseminated Intravascular Coagulation). Some authors have associated DIC with sepsis, affecting up to 35% of patients (278), and this may be the reason for the observed correlations,

especially since it has been related to low platelet levels (we observed a negative correlation with histones), elevated thrombin levels, as well as a hypercoagulable state (278,279).

Histone H3cit showed a correlation with Total Prothrombin that was maintained over time in the ICU of the patients, a factor highly related to coagulation. However, H3cit did not present significant correlations with other factors related to this process. In addition, the correlations were negative and, since H3cit levels were observed to decrease over time (Figure 20), we can state that lower H3cit levels correlated with a procoagulant state, corroborating our hypothesis that histone citrullination could have a protective role since their decrease was observed in those patients who showed clinical worsening. In addition, since the H3cit levels decreased in those patients with higher levels of coagulation-related factors, we can state that despite the fact that the extracellular traps released by different cells can cause coagulation problems, it is not the H3cit histones that cause the damage.

#### 9.4.7.3. CORRELATIONS IN PATIENTS' NON-SURVIVORS TO A SEPTIC SHOCK EPISODE

The most severe group of patients were those diagnosed with SS non-survivors (Figure 23; Tables S8-S10 - Annexes I). This patient group showed correlations at all times studied. During the first 24h after admission to the ICU (1st sample; Figure 23A), a very high correlation was observed between circulating histones and H3cit (Spearman  $r=0.914$ ,  $p=0.000$ ), a result that suggests that these patients are activating ETosis processes, responsible for releasing a large amount of H3cit, and other cell death mechanisms, such as apoptosis (123), autophagy (126) or pyroptosis (253), which produce the release of histones into the bloodstream. In addition, we observed correlations between circulating histones and quick SOFA (Spearman  $r=-0.614$ ,  $p=0.005$ ), Lactate 6 hours after ICU admission (Lac6H) (Spearman  $r=0.542$ ,  $p=0.017$ ), Lactate (Spearman  $r=0.851$ ,  $p=0.000$ ), Leukocytes (Spearman  $r=0.803$ ,  $p=0.000$ ), PMN (Polymorphonuclear Cells) (Spearman  $r=-0.619$ ,  $p=0.005$ ) and age (Spearman  $r=-0.865$ ,  $p=0.000$ ). In these same samples, correlations were found between circulating H3cit and quick SOFA (Spearman  $r=-0.489$ ,  $p=0.034$ ), Lac6H (Spearman  $r=0.473$ ,  $p=0.041$ ), Lactate (Spearman  $r=0.696$ ,  $p=0.001$ ), Leukocytes (Spearman  $r=0.629$ ,  $p=0.004$ ), PMN (Spearman  $r=-0.572$ ,  $p=0.011$ ) and age (Spearman  $r=-0.954$ ,  $p=0.000$ ). In the 2nd sample, taken 3 days after ICU admission (Figure 23B), circulating histones also correlated with H3cit (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ), with TropUS (Spearman  $r=-1$ ,  $p=0.022$ ) and with total prothrombin (Spearman  $r=1$ ,  $p=0.022$ ). At this same time, a high positive correlation was also observed between circulating H3cit and Leukocytes (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ) and high negative correlations between H3cit and TropUS (Spearman  $r=-1$ ,  $p=0.022$ ), PCT (Spearman  $r=-0.8$ ,  $p=0.038$ ) and age (Spearman  $r=-0.8$ ,  $p=0.038$ ). Finally, in the 3rd sample (Figure 23C), taken after 5 days of admission to the ICU, circulating

histones correlated positively with the APACHE II scale (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ), PCR (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ), Leukocytes (Spearman  $r=1$ ,  $p=0.001$ ), Platelets (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ), ATPP (Spearman  $r=1$ ,  $p=0.022$ ), ProtFuncC (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ) and with age (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ); while the H3cit correlated positively with the SOFA Tot scale (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ), the Lac6H (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ), the Lactate (Spearman  $r=0.8$ ,  $p=0.038$ ), the APTT (Spearman  $r=1$ ,  $p=0.022$ ), and negatively with PCA (Spearman  $r=-0.8$ ,  $p=0.038$ ) and PCT (Spearman  $r=-0.8$ ,  $p=0.038$ ).

Circulating histones and H3cit correlation ceased to be significant throughout the patient's ICU stay. This is interesting because H3cit could be a powerful prognostic biomarker in septic patients. Furthermore, it should be noted that the highest levels of circulating histones and H3cit were found in this group. In this sense, the literature has related high plasma histone levels with the severity of sepsis due to the ability of extracellular histones to cause cell damage and inflammation (139,143,282), ultimately leading to organ failure. These results are aligned with all the results obtained so far in the *in vitro* experiments in this study, but also with the results observed in samples from patients with sepsis and SS with different prognoses, since circulating histones showed positive correlations with markers of organic damage and severity such as lactate and the APACHE II clinical scale.

It should be noted that in the non-surviving SS patients' group, numerous correlations were found between circulating histones and factors related to coagulation, emphasizing that deregulation and endothelial dysfunction play a fundamental role in this area. Our group has described how histones cause endothelial dysfunction through mechanisms of apoptosis (123), autophagy (126), and, more recently, pyroptosis (253), contributing to inflammatory processes and endothelial death (128). In addition, some authors have linked NETosis events with the appearance of thrombi (283), which agrees with the correlations found, as well as with the high levels of H3cit found in this group. However, H3cit did not correlate with coagulation markers, beyond TropUS, suggesting that the factor inducing coagulopathies during ETosis processes would be caused by proteins other than H3cit. Despite the fact that it has been described that the networks themselves caused by ETosis processes can serve as a scaffold for thrombi to occur during coagulation (284). Proteins such as PAD, necessary for ETosis processes to begin, have also been described as causing thrombotic phenomena (285–289). In addition, our *in vitro* results demonstrated that histone citrullination has a protective role, especially in comparison with native histones, so everything seems to indicate that histone H3cit released during ETosis processes would not be the cause of events related to coagulation.

It is interesting to note that circulating histones and H3cit, in the group of non-surviving SS patients, presented a negative correlation with PMN, a cell group that includes neutrophils and

mast cells, among others, because they are polymorphonuclear cells. Some of the cell types included in PMNs can suffer from ETosis (257), and since the highest levels of H3cit were found in this group of patients, specifically in the first sample taken, the negative correlation could be due to a decrease in these cell types in the plasma of septic patients, as a consequence of the increase in ETosis events that produce cell rupture. This is also consistent with greater activation of the innate immune system during the onset of the disease (57). Thus, the correlations obtained in the surviving septic patients also correlated with histones, leukocytes, and PMN, being positive correlations in all cases. In line with what we have just described and taking into account that ETosis is activated especially when the immune system needs to act more potently against a pathogen and that the lowest levels of H3cit were found in the group of surviving septic patients, we propose that these patients are activating to a much lesser extent the ETosis mechanisms to counteract the infection, which would indicate that patients with the worst clinical course could have an exacerbated and uncontrolled immune response in the early stages of infection (292).

#### **9.4.8. DIFFERENCES IN CLINICAL CHARACTERISTICS OF SEPTIC PATIENTS AND CLINICAL SUBTYPES CCI AND PICS.**

Patients with sepsis, especially those over 65 years old, can develop different clinical subtypes, including Chronic Critically Ill (CCI) and Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome (PICS). According to the Sepsis-3 Consensus criteria, a patient is diagnosed with sepsis if they exhibit at least two of the following symptoms: fever above 38°C or below 36°C, systolic blood pressure  $\leq 100$ mmHg, and leukocyte count greater than 12,000/mm<sup>3</sup> or less than 4,000/mm<sup>3</sup> (1). Patients with sepsis who remain in the ICU for 7 days with organ dysfunction and require mechanical ventilation are classified as CCI (79). Finally, following the criteria established by Gentile et al. (84), patients with CCI who remain hospitalized in the ICU for 14 days or more and meet the following parameters: weight loss (more than 10% during the hospitalization), muscle mass loss below 18, albumin below 3mg/dL, prealbumin below 10mg/dL, C-reactive protein (CRP) greater than 1.5mg/L, and a total lymphocyte count below 800/mm<sup>3</sup> (84); would be clinically classified as patients with PICS (Figure 4 in the introduction and 13 in material and methods).

Patients classified as sepsis, CCI, and PICS that we present in Table 13, belonged to an independent cohort from those analyzed in the previous sections (Figure 11 in materials and methods). This cohort (see detailed description in section 5.10 of materials and methods) was composed of 42 patients meeting the following clinical phenotypes: 21 septic patients, 10 CCI patients, and 11 PICS patients (Figure 11). These patients were used to analyze miRNA expression changes and DNA methylation profiles of leukocytes in order to obtain differential

expression patterns that could identify metabolic (catabolism) or immune system (persistent inflammation and immunosuppression) alterations that characterize patients with CCI and, essentially, with PICS (Figure 13).

The average length of stay in ICU was higher in the PICS phenotype compared to uncomplicated sepsis:  $22.2 \pm 7.8$  vs  $3.3 \pm 1.6$  days ( $p < 0.0001$ ). Similarly, the organ failure of patients, and therefore the severity, was also significantly higher in patients with PICS compared to uncomplicated sepsis; SOFA score:  $11.8 \pm 4.6$  vs  $6.9 \pm 3.2$  ( $p < 0.0001$ ).

#### **9.4.9. SEPTIC, ECC, AND PICS PATIENTS PRESENT DIFFERENT MICRORNA EXPRESSION PATTERNS.**

Understanding the changes related to miRNA expression and methylation patterns in these patients, especially at early stages, could help to establish appropriate follow-up protocols for these patients, in order to reduce the high mortality and improve the quality of life of septic patients who survive a sepsis episode.

The analysis of the circulating miRNome was performed on samples from patients admitted to the ICU, categorized as septic, ECC, and PICS patients. The samples used for the analysis of miRNA patterns were: 21 samples from septic patients, 10 samples from ECC patients, and 11 samples from PICS patients, all obtained during the first day of admission to the ICU. In addition, 4 of the PICS patients analyzed at early stages were also analyzed after 14 days of admission to the ICU (4 PICS samples obtained after 14 days of admission to the ICU), in order to monitor changes in miRNA expression.

After processing, normalizing, filtering, and removing outliers from the data, the readings of the miRNAs included in the miRbase database were recorded. All miRNAs that did not have at least 16 counts per million in at least 20% of the samples from the group with the smallest sample size were eliminated, resulting in 196 significant miRNAs to continue with the study. When the data was plotted in normalized multidimensional scaling (MDS) graphs (Figure 24), it was observed that the distribution of points grouped the PICS and Sepsis patients (Figure 24A), except for cases 133 and 154. Similarly, a grouping of samples corresponding to patients with PICS and ECC was also observed in the comparison of these two groups (Figure 24C), apart from these same patients (133 and 154). This could indicate that these patients initially suffer less alteration in the expression patterns of circulating miRNAs compared to other PICS patients. When comparing the PICS samples obtained at different times (Figure 24D), a good grouping was observed, although patients 133 and 154, at initial times, do not seem to be as separated as the others.

Normalized MDS graphs of ECC vs Sepsis patients did not separate the groups from each other (Figure 24B).

Next, the edgeR bioinformatics analysis was performed to obtain the differential expression of each miRNA. At this point, it should be pointed out that, to establish the established significance cutoff, FDR (false discovery rate) values less than 0.1 were considered, which implied a 90% confidence and a 10% assumed error. Table 14 describes the number of significant miRNAs in each case, with the comparison over time of the PICS group showing the most significant miRNAs ([https://n9.cl/anexosphd\\_rov](https://n9.cl/anexosphd_rov)).

#### 9.4.9.1. ANALYSIS OF DIFFERENTIAL EXPRESSION AND BIOLOGICAL CONTEXTUALIZATION BETWEEN ECC AND SEPSIS.

##### 9.4.9.1.1. DIFFERENCES IN MIRNA EXPRESSION BETWEEN ECC AND SEPSIS.

When comparing the groups of patients with ECC (septic patients admitted for at least 7 days in the ICU and in need of mechanical ventilation (79)) and patients with uncomplicated sepsis, 5 miRNAs were found to be differentially and significantly regulated with an FDR<0.1. The compared samples were obtained during the first 24 hours of admission to the ICU (see Figure 11 in materials and methods). Table 15 shows the miRNAs found, whose positive logFC values indicate that they are overexpressed in cases of ECC compared to patients with sepsis.

When the different miRNAs with significant differential expression obtained in this comparison were represented as a heatmap (Figure 25), it was observed that there was no clear separation between the two compared groups, since the hierarchy of the upper part is not able to group patients according to whether they are Sepsis or ECC.

Among the miRNAs obtained in the comparison between patients with ECC and patients with Sepsis, was found the miR-122-5p, which has been previously described in sepsis for its ability to regulate coagulation and inflammation (289), problems that can be exacerbated by activated ETosis in these patients, and by histone release. In fact, some authors such as Wang et al. described that this miRNA has low expression levels in septic patients classified with DIC, and is capable of downregulating IL-6 and IL-1 $\beta$  levels, thereby controlling systemic inflammation (289).

Another miRNA found is miR-1282, which has been described as a possible biomarker for monitoring the evolution of patients with SIRS (290). However, miR-10401-5p has not been related to sepsis or chronic critical illness patients so far, nor has miR-412-5p, which although

not directly related to sepsis, has been found in plasma samples from patients with SARS-CoV-2 infection (291).

*9.4.9.1.2. FUNCTIONAL ENRICHMENT ANALYSIS WITH DIFFERENTIALLY EXPRESSED MIRNAS BETWEEN ECC AND SEPSIS.*

For the differentially expressed miRNAs, target genes were searched for in the miRTarBase database, performing two enrichment analyses to obtain enriched KEGG pathways and GO terms from the obtained list of miRNAs with differential expression. The applied adjusted p-value was 0.1.

When comparing between ECC and Sepsis patients, no significant KEGG pathways or GO terms were obtained with the significant miRNAs obtained from the ORA analysis. However, when a broader analysis was performed using a GSEA-based biostatistical analysis, which is less restrictive, KEGG pathways and GO terms were found (Figures 26 and 27, respectively).

In the enrichment analysis using GSEA shown in Figure 26, it is noteworthy the identification of the KEGG pathway related to the formation of NETs.

The Figure 27 shows the overexpression of miRNAs involved in cellular signaling, both at transmembrane and cellular receptor levels. In addition, mechanisms related to the extracellular matrix are also observed, which may be related to the glycocalyx, which has also been described as altered in sepsis (292,293), as well as mechanisms related to the formation and organization of nucleosomes.

Immune cell receptors are responsible for recognizing PAMPs and DAMPs that initiate cellular and immune responses against infectious processes, so alterations in receptors can be problematic when defending the body against a pathogen during an infection (294). It is widely known that Toll-like receptors (TLRs) activation induces the expression of certain miRNAs and regulates different cellular responses through them (295). However, a recent finding has shown that miRNAs can act at the level of TLRs, not only by regulating the expression of the TLRs themselves but also by interacting as ligands directly with these receptors, initiating a signaling cascade that controls the immune response (296–298). In this sense, an overexpression of miRNAs capable of controlling TLR activation could cause a reduction in cellular response against infection, contributing to its propagation and compromising the clinical evolution of patients (296).

Regarding the extracellular matrix, it is known that monocytes and macrophages are capable of binding to the extracellular matrix through integrins expressed on their cell surface and migrate



to sites of infection. To do this, it has been found that the glycocalyx of endothelial cells plays an important role in regulating the movement of immune cells on the surface of endothelial cells (processes of contact, rolling, adhesion, and migration) (292). Alteration of receptors that allow for the development of the immune response, as well as the plasma membrane and its relationship to the migration and rolling of immune cells to sites of infection, may be one of the key alterations contributing to poor prognosis in septic patients.

The formation and organization of nucleosomes, formed by different histone isoforms, is also another mechanism identified as altered as a result of differential miRNA expression in this comparison of patients. This is interesting because circulating nucleosomes have been described as predictors of sepsis progression, due to their direct relationship with organ dysfunction in critically ill patients and systemic inflammation (299,300).

#### 9.4.9.2. ANALYSIS OF DIFFERENTIAL EXPRESSION AND BIOLOGICAL CONTEXTUALIZATION BETWEEN PICS AND SEPSIS.

##### 9.4.9.2.1. DIFFERENCES IN MIRNA EXPRESSION BETWEEN PICS AND SEPSIS.

When comparing samples obtained during the first 24 hours of ICU admission between the group of patients with PICS (patients with sepsis admitted for at least 14 days in the ICU and who meet specific immune and metabolic characteristics (84)) vs. patients with uncomplicated sepsis (see Figure 13), 7 miRNAs were found to be differentially and significantly expressed with an FDR<0.1. The values obtained for logFC were positive, indicating an overexpression of these miRNAs in patients with PICS compared to patients with uncomplicated sepsis during their ICU stay (Table 16).

When representing the different miRNAs with differential expression obtained in this comparison as a heatmap (Figure 28), we observed that there were miRNAs that positively correlated (blue color) between the cases (patients with PICS) and the reference group (patients with sepsis). On the other hand, other miRNAs negatively correlated (red color) in cases compared to the reference group. In addition, in Figure 28, we can also observe that the top-down hierarchical clustering allowed us to discern two groups, classifying most PICS patients to the right of the figure, while most septic patients were distributed on the left side of the clustering map.

In this analysis of differential expression, comparing PICS patients with septic patients, 7 miRNAs with differential expression were obtained, involved in relevant molecular pathways (Table 16), including several isoforms of miR-122, previously obtained in the comparison of ECC vs sepsis patients. Recall that the literature proposes it as a miRNA with the ability to stratify sepsis patients with worse prognostic risk, and elevated levels of miR-122 have been related to

early mortality in patients (201,289,301–303). Since our results showed elevated levels of this miRNA in both ECC and PICS patients, in the plasma sample taken during the first 24 hours after admission to the ICU, and it has been established that both groups of patients have a high short-term mortality rate (304), it could contribute to the clinical monitoring of these patients and monitor a greater likelihood of clinical complications such as ECC or PICS.

miR-10395-3p was also found to be overexpressed in the cohort of PICS patients compared to uncomplicated septic patients. Currently, there is not much information about this miRNA, although elevated levels of this miRNA have been observed in those patients with higher SOFA scores (305). In fact, in the cohort of patients used for this study, it was observed that PICS patients with higher expression of this miRNA had a 25% higher SOFA score than septic patients (Table 13), validating the results obtained by Meidert et al (305).

It has been described that miRNA-27b-3p is capable of regulating the "Jumonji domain-containing protein D3" (JMJD3), which is a lysine-specific demethylase 6B (KDM6B), and the cytokine NF- $\kappa$ B at the promoter level, reducing its expression. Moreover, it is important to highlight that the JMJD gene is an important epigenetic regulator belonging to the family of Lys27 histone demethylases in histone H3, which participates in the differentiation of monocytes into M2 macrophages (215). M2 macrophages are essential in the release of mediators involved in attenuating the inflammatory response and in the repair of damaged tissues (306). Therefore, the finding of overexpressed miR-27b in PICS patients could explain the dysregulation in the inflammatory response and the limitation in these patients' ability to repair damaged tissues during the hyperinflammatory phase.

Finally, miR-192-5p has been associated with cardiac damage, being related to the prognosis of different diseases (307), but not specifically in sepsis.

These results suggest that including miR-10395-3p together with miR-122 in a miRNA signature could help in the differential diagnosis of patients who will have a worse outcome, and even identify at admission those patients who will develop PICS. Additionally, including miR-27b in this miRNA signature could help to discern whether patients who develop PICS will suffer from long-term immunosuppression.

*9.4.9.2.2. FUNCTIONAL ENRICHMENT ANALYSIS WITH DIFFERENTIALLY EXPRESSED MIRNAS BETWEEN PICS AND SEPSIS.*

Using significantly differentially expressed miRNAs, target genes were searched for in the miRTarBase database, performing two enrichment analyses to obtain enriched KEGG pathways and GO terms. The adjusted p-value applied was 0.1.

In Figures 29 and 30, can be seen the main KEGG and GO terms, respectively, obtained from the ORA analysis. Some miRNAs related to the function of the cell cycle, cellular senescence, and the TGF- $\beta$  signaling pathway were identified, factors that have previously been associated with sepsis. Yang Q-h et al. described in a mouse model that inducing sepsis through CLP resulted in renal damage, a common damage associated with sepsis, and this damage was associated with cell cycle arrest in G1 phase, through the increase of p53 and p21. However, they observed that after 48 hours of CLP, renal function was restored, which was related to cell cycle progression (308). This could indicate that patients who suffer from renal damage associated with sepsis will have a more complicated disease development due to cell cycle arrest during a period of time. Interestingly, it has been described that mitochondria are also related to the regulation of the cell cycle and act by inducing cell cycle arrest as a protective mechanism (309). In addition, it is known that during the different phases of mitosis (another pathway related to the miRNAs described in this comparison (Figure 30)), the cell has specific checkpoints to ensure that it is able to proceed to the next phase. The G1-S checkpoint seems to be important from an energetic point of view since it is the stage where mitochondria come together to provide the energy that the cell needs for DNA replication during the G2 phase (310, 311).

Another overexpressed pathway among the KEGG pathways found (Figure 29) was cellular senescence. This pathway has been related to PICS. Both cellular and organelle senescence, especially of the mitochondria, can cause a much greater increase in reactive oxygen species in elderly patients than in young patients, contributing to a more accelerated development of the disease (312). It should be noted that chronic hyperinflammation, a characteristic of PICS patients, is closely related to cellular senescence in all tissues (313), and therefore the deregulation of this cellular senescence pathway may be related to PICS patients. On the other hand, TGF- $\beta$  is a cytokine whose role has been related to wound healing, angiogenesis, and immunoregulation (314). In fact, it has been related to negative modulation of the T cell-mediated response in sepsis (315).

In Figure 31, the main KEGG terms obtained from the GSEA analysis are described. The only pathway directly related to sepsis was the pathway that involves gene alteration by *Staphylococcus aureus* infection, an organism capable of causing infections in the body that can

lead to sepsis. In fact, in a study conducted a few years ago in murine models injected with *S. aureus* to determine the parameters observed after infection, inflammatory markers such as TNF- $\alpha$ , IL-6, or C-reactive protein were found to be increased. Additionally, in this study, the authors also found elevated levels of procalcitonin in the plasma of mice that had been injected with *S. aureus*, indicating that the mice had developed sepsis (316). In this study, they also observed that *S. aureus* infection caused an increase in the population of monocytes and neutrophils, which was reduced at 96 hours after infection (316).

In Figure 32, the main GO terms obtained from the GSEA analysis are presented, and several pathways involved in sodium ion transport, which is fundamental for the proper functioning of the heart and brain, organs affected in patients after suffering an episode of sepsis, especially the heart (34,317), can be observed.

The role of sodium in cardiac physiology has been widely described since it is an essential ion for maintaining adequate blood volume and pressure. However, elevated plasma sodium concentrations have been associated with an increase in  $\beta$ -myosin heavy chain protein expression, an increase in myocyte enhancer factor 2/nuclear factor of activated T-cells factor transcriptional activity, and an increase in kinase 1 expression, leading to altered mechanical performance of the myocardium, which can lead to heart failure (318). In addition, high levels of intracellular sodium have also been associated with the alteration of several proteins responsible for calcium homeostasis in myocardial contraction (318). Regarding sepsis, it has been described that the cardiac failure observed in these patients could be avoided by inhibiting the function of the Na/H pump, as demonstrated by Sikes et al. in mouse animal models a few years ago (317).

On the other hand, it has been described that patients with sepsis at the time of admission often suffer from hypernatremia (319,320). Elevated blood sodium concentrations can serve as an immunological defense mechanism in inflammatory states such as those that occur during infection or during the development of sepsis. In fact, sodium has been related to the ability to enhance the function of macrophages and T lymphocytes (319,321,322). However, it should be noted that prolonged catabolic situations can lead to hypernatremia through osmotic diuresis induced by urea. In fact, recently Rugg et al. have linked hypernatremia to the development of PICS (323). This finding may result in positive feedback since hypernatremia can lead to inflammation and catabolism through hyperosmolarity stress. What is evident from the work of Rugg et al. is that acquired hypernatremia in the ICU is associated with PICS (323).

#### 9.4.9.3. ANALYSIS OF DIFFERENTIAL EXPRESSION AND BIOLOGICAL CONTEXTUALIZATION BETWEEN PICS AND ECC.

##### 9.4.9.3.1. DIFFERENCES IN MIRNA EXPRESSION BETWEEN PICS AND ECC.

When comparing samples obtained during the first 24 hours of admission to the ICU between the PICS (patients with sepsis admitted for at least 14 days in the ICU and meeting the characteristics described by Gentile et al. (84)) and ECC (septic patients admitted for at least 7 days in the ICU and requiring mechanical ventilation (79)) groups, 5 miRNAs were found to be differentially and significantly regulated with an  $FDR < 0.1$  (Table 17). Positive  $\log_{2}FC$  values indicated overexpression of the miRNAs in PICS cases compared to ECC patients. Conversely, negative  $\log_{2}FC$  values indicate underexpression of the miRNAs in PICS cases compared to ECC cases.

When representing the different miRNAs with differential expression obtained in this comparison as a heatmap (Figure 33), a very clear separation of the two compared groups was observed, with all PICS patients on the left and all ECC patients on the right, except for a single PICS case that was classified in the group of ECC patients. Likewise, in the hierarchy presented on the left of Figure 33, two well-separated groups are shown, with the underexpressed miRNAs in the upper part and the overexpressed miRNAs in the lower part.

Some of the miRNAs that appeared in this comparison between PICS and ECC were also found to be dysregulated in the comparison between ECC and sepsis, such as miR-412, miR-1281, or miR-10401. These miRNAs have not been directly related to sepsis, although miR-412 has been found in plasma samples from patients with SARS-CoV-2 infection (291), and miR-1282 has been described as a possible biomarker to monitor the evolution of patients with SIRS (290). Similarly, miR-10395-5p appears with differential expression in the PICS vs sepsis comparison. As mentioned earlier, although there is currently not much information about this miRNA, elevated levels of this miRNA have been observed in patients with higher SOFA scores (305). This is consistent with the results observed in this study, as patients with PICS, who showed higher expression of this miRNA in both comparisons, had a higher SOFA score than the other patient groups (Table 13).

##### 9.4.9.3.2. FUNCTIONAL ENRICHMENT ANALYSIS WITH DIFFERENTIALLY EXPRESSED MIRNAS BETWEEN PICS AND ECC.

For the miRNAs that were found to be differentially and significantly expressed in this comparison, their target genes were searched in the miRTarBase database, and two enrichment analyses were performed to obtain enriched KEGG pathways and GO terms from the obtained list. The adjusted p-value applied was 0.1.

In this comparison between PICS and ECC, no significant KEGG pathways were obtained in the ORA analysis performed, but pathways were obtained for the enriched GO terms (Figure 34).

In Figure 34A, we can observe pathways involved in the regulation of the cell cycle and chromosome organization. It is important to highlight that this figure shows the pathways involved in the overexpression of the miRNAs, which generally implies a reduction in the event they regulate, so many of the pathways shown are related to negative regulation, thus mediating an overexpression of this pathway.

On the other hand, the miRNAs that were found to be underexpressed (Figure 34B) showed some pathways related to the generation of reactive oxygen species, such as the pathway of superoxide radical generation through NAD(P)H oxidase activity. Consistent with this, our group has previously described that extracellular histones are capable of producing cellular oxidative stress at the endothelial level (128). Similarly, other studies have described that the generation of free radicals is important in the host's response to an infection (324), the regulation of vascular tone, and the modification of cellular adhesions (325), processes altered during sepsis. In fact, it has been reported that during sepsis, there is an increase in the levels of reactive oxygen species, including superoxide ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and hydroxyl radicals ( $HO$ ) (326, 327).

In the GSEA analysis, 24 KEGG pathways (Figure 35) and 14 GO terms (Figure 36) were found. This analysis revealed that patients with PICS showed a reduced TGF- $\beta$  pathway due to the overexpression of regulatory miRNAs (Figure 35A). Since TGF- $\beta$  is a cytokine related to immunosuppression and capable of controlling T lymphocytes, these results suggest a relationship between miRNA deregulation and immune system dysregulation. In this regard, Zou et al. corrected the immunosuppression phenomena in a rat model of sepsis through TGF- $\beta$  inhibition (328). However, Bae et al. associated TGF- $\beta$  with an increase in severe vascular damage during the inflammatory response, as is the case in sepsis (329).

Noteworthy, from among the pathways regulated by miRNA underexpression (Figure 35B), the formation of NETs appears again, indicating that this pathway would be favored in patients with PICS during the early stages of sepsis.

When observing the pathways that appear when performing the GO term analysis, we see that the main terms obtained for underexpressed miRNAs (Figure 36B) are related to nucleosome formation and organization, which is consistent with previous results such as the formation of NETs. Among the pathways that appear is chromatin remodeling, where histone PTMs play a fundamental role, being one of the main pillars of this work.

**9.4.9.4. ANALYSIS OF DIFFERENTIAL EXPRESSION AND BIOLOGICAL CONTEXTUALIZATION BETWEEN PATIENTS WITH PICS AT 24 HOURS OF ADMISSION (PICS-A) AND PATIENTS WITH PICS AT 14 DAYS OF ADMISSION TO THE ICU (PICS-C).**

**9.4.9.4.1. DIFFERENCES IN miRNA EXPRESSION BETWEEN PICS-C AND PICS-A.**

The last comparison in search of differential miRNA expression was performed with samples obtained at different times in patients from the same group. The compared patients were those with PICS (patients with sepsis admitted for at least 14 days in the ICU and who meet specific immune and metabolic characteristics (84)). The compared times were the "C" time, corresponding to the sample taken on the 14th day of ICU admission, and the "A" time, corresponding to the sample taken during the first 24 hours after the same patient's admission.

When comparing the PICS groups, 40 differentially expressed miRNAs were obtained with an  $FDR < 0.1$ . Among the miRNAs found, 18 showed positive values for logFC, indicating overexpression (Table 19), while 22 of the obtained miRNAs showed negative values for the same variable, indicating underexpression (Table 18). Likewise, a more restrictive analysis was performed to find those miRNAs with greater variation, applying an  $FDR < 0.05$ , where 28 significant miRNAs were obtained (Tables 18 and 19).

When representing miRNAs in a heatmap (Figure 37), a very clear separation can be observed between both patient groups, with samples obtained during patient evolution (PICS-C) grouped on the left side, and samples obtained at early time points (PICS-A), within the first 24 hours after admission to the ICU, grouped on the right side. The expression profile of patient 133 was very similar for both the sample taken at 24 hours and the sample taken at 14 days. It is also worth noting, as shown in the left-hand clustering of Figure 37, that the groups are clearly separated into two populations through the classification provided by differentially expressed miRNAs: those that are under-expressed are grouped in the upper part, and those that are overexpressed are in the lower part.

Among the miRNAs found in this analysis, some miRNAs not previously described in sepsis coincide with the previous comparisons between the different groups of patients studied, such as miR-412-5p or miR-1282, which were deregulated in the PICS vs ECC and ECC vs Sepsis comparisons (Table 17). Others of the miRNAs that appear in this comparison between the PICS group at 14 days and the PICS group after admission to the ICU have been previously described in sepsis, either for their ability to be diagnostic biomarkers (miR-328, miR-29c-3p, miR-342-3p, miR-let-7d-3p) or prognosis in sepsis (miR-25b, miR-3180, miR-206, miR-133), or for the role

they play in the immune system (miR-335, miR-150-5p, miR-29c-3p, miR-584, miR-25b, miR-25a, miR-301a-3p, miR-4512) or affected organs during the course of the disease (e.g. miR-1-3p, miR-25b, miR-133, miR-584, miR-301a-3p, miR-3200-5p, miR-150-5p, miR-550a, miR-550b). The function of these miRNAs is described in more detail in the following sections (Figure 38).

Among the different miRNAs with differential expression found in this comparison, some stand out that have been associated with clinical diagnostic value (miR-let-7d-3p) as well as clinical severity (miR-3180, miR-206 or miR-133). Finding altered miRNAs that have been previously described by other authors validates our studies and reinforces the idea of the diagnostic and prognostic value of the new miRNAs found.

MiR-let-7d-3p and miR-let7a-5p have been shown to be elevated in patients with sepsis compared to healthy controls, suggesting they could be early biomarkers of sepsis (330). The results obtained in this thesis also identified altered miR-let-7d-3p and miR-let7a-5p in patients with PICS after 14 days in the ICU, compared to the sample taken at admission. Therefore, we suggest that in addition to being an early biomarker of sepsis, it could also be used as a prognostic biomarker. Especially miR-let-7a-5p, which was found to be altered in patients with sepsis (330) and was increased in the group of patients who developed PICS.

The literature shows that miR-29c-3p is overexpressed in patients with sepsis (331), which is consistent with our results, as we found it overexpressed in patients with more advanced sepsis (PICS admitted for 14 days in the ICU). Zhang et al. showed in a mouse model of sepsis that this miRNA could be used for the diagnosis of sepsis, and that modulating the levels of expression of miR-29c-3p reduces the inflammatory response and sepsis-induced cardiac dysfunction in septic mice (331).

MiR-3180 has not been directly related to septic patients but has been described in patients with COVID-19. MiR-3180 has been associated with a poor evolutionary prognosis of the disease and a decreased probability of survival at 90 days after detection (291). Since it has been described that patients with COVID-19 developed viral-origin sepsis in many cases (332), we suggest that the finding of this miRNA in septic patients' plasma could be related to a poor evolutionary prognosis. In our results, we found it overexpressed in those patients with PICS who have been in the ICU for longer, compared to the sample taken at the beginning of their hospital stay, which could indicate high short-term mortality in these patients. Likewise, miR-133a has been described as elevated in sepsis, which is consistent with our results, and has been related to predicting mortality in critically ill patients (333). In addition, miR-133a has been linked to the worsening of inflammatory responses in sepsis through SIRT1, and blocking this miRNA inhibits lung, kidney, and liver damage induced by sepsis in mouse models with CLP-induced sepsis (334).



Another of the relevant miRNAs found in our comparison of patients with PICS at different times (14 days vs initial) is miR-206. Liang et al. found miR-206 to be overexpressed in patients with sepsis compared to a control population, and it was positively correlated with the SOFA score of those patients (335). This miRNA could be used as a diagnostic and prognostic biomarker in sepsis. In our study, we found very high levels of miR-206 when comparing patients with PICS at 14 days to these same patients at the initial time point, which confirms its potential as a biomarker of severity and the evolution of sepsis. In addition, patients with PICS showed a higher SOFA score than the other patient groups compared in this study (ECC and sepsis; Table 13), which supports the ability of this miRNA to indicate severity and prognosis in sepsis.

Finally, miR-328, in addition to being proposed as a diagnostic biomarker, has also been related to inflammation and cardiac damage (336), serving as a link between the functions of the miRNAs described so far and those that will be described below. Sun et al. demonstrated that miR-328 could be used for the diagnosis of sepsis with a sensitivity and specificity of 87.6% and 86.36%, respectively (337), and they linked elevated levels of miR-328 with increased inflammation and cardiac dysfunction in septic mice (337). Additionally, another study linked miR-328 with the development of myocardial fibrosis through paracrine regulation of cardiomyocytes (336) and by stimulating the TGF- $\beta$  pathway that promotes collagen production (338).

#### *9.4.9.4.1.1. MIRNAS WITH FUNCTION ON THE IMMUNE SYSTEM*

Among all the miRNAs identified in this comparison of PICS patients at different times, those that have a function on the immune system are highlighted, as it is one of the main characteristics of this group of patients described as persistent inflammation, catabolism activation, and immunosuppression syndrome.

miR-125a and miR-125b have been associated with the severity of septic patients. While miR-125b, under-expressed in PICS\_C, correlates with inflammatory molecules in septic patients, such as IL-6, IL-17, IL-23, and inflammatory molecules such as PCR (339,340), miR-125a did not show these interactions, indicating that miR-25b levels could indicate immunosuppression in these patients with more disease progression. In addition, elevated levels of miR-125b have been associated with short-term mortality (28 days) in septic patients (339,340), but not in miR-125a, overexpressed in our results of PICS patients after 14 days of ICU admission. Likewise, miR-125b-5p has been found to be decreased in LPS-exposed PBMCs and in the plasma of septic patients (341,342). Regarding the molecular mechanism, Antonakos et al. have described that miR-125b-5p, released via exosomes by endothelial cells, increases VEGF levels, protecting against sepsis-induced lung injury. This could explain the low levels of this miRNA found in septic patients' plasma, as well as indicating possible therapeutic value against sepsis (343). In

relation to the therapeutic value offered by this miRNA, a very recent study describes how positive regulation of miR-125b-5p alleviates acute liver failure during sepsis by regulating the Keap1/Nrf2/HO-1 pathway (344).

Another miRNA related to the immune system is miR-4512. Recently, miR-4512 has been linked to the activation of monocytes and macrophages. In fact, it has been observed that decreased levels of miR-4512 activate innate immunity, including NETosis mechanisms, through the TLR4-CXCL2 pathway (345). Since we found elevated levels of this miRNA in PICS patients after 14 days of ICU admission compared to the sample taken on the first day in our work, the process of immunosuppression experienced by these patients is corroborated. Furthermore, overexpression of miR-4512 reinforces our hypothesis that the reduction of H3cit we observed (section 5.6) is related to a reduction in ETosis events.

miR-150-5p is capable of regulating the STAT3 gene, involved in the maturation of some immune cells, especially in the adaptive immune system (346). This miRNA has also been linked to macrophage apoptosis (347). Therefore, the levels of this miRNA could be crucial for modulating the immune response. Elevated levels could favor immunosuppression through STAT3 gene blocking or macrophage apoptosis. On the other hand, if the expression levels of this miRNA were too low, excessive activation of the immune system could occur, causing persistent inflammation (348). Recall that both processes are characteristic of PICS patients. In fact, our results showed that PICS-C patients, at 14 days of admission, had lower expression of miR-150-5p than PICS patients at initial times, which could be contributing to a process of persistent inflammation.

Finally, Hazra et al. found a correlation between elevated levels of miR-301-3p and a better prognosis for disease caused by the encephalitis virus. Additionally, these authors proposed the regulatory factor INF 1 (IRF1) as one of the target genes of miR-301a-3p, regulating the immune response and apoptosis (349), which are highly dysregulated in septic patients. Our results show a decrease in the expression of this miRNA in patients with PICS on the 14th day of their stay in the ICU compared to the day of admission, which could cause dysregulation of the immune response, a characteristic of patients with PICS.

#### *9.4.9.4.1.2. MIRNAS WITH FUNCTION ON THE IMMUNE SYSTEM AND RELATED WITH ORGANIC DAMAGE.*

Other miRNAs found, in addition to being related to the immune system, have also been linked to organ damage, which could help predict some of the morbidities associated with sepsis in surviving patients, especially with PICS. The miRNAs described below demonstrate how immune

system alteration can cause alterations in different organs. Although miRNAs associated with kidney and liver damage have been found, most have been associated with cardiovascular damage, commonly affected during sepsis (33). MiR-150-5p has been associated with the immune system (347), cardiovascular (350) and renal (346) damage, which can also be monitored by miR-550 (miR-550a and miR-550b) (351). MiR-335 (352) and miR-29c-3p have been related to inflammation and cardiac dysfunction (331). Other miRNAs found in this comparison, such as miR-584 (353), miR-301a-3p (354), and miR-1-3p (355), have been associated with lung damage. Some of these miRNAs are described in more detail below (Figure 38).

#### *MIRNAS WITH CARDIOVASCULAR FUNCTION*

The miR-150-5p, in addition to being related to the immune system, has also been associated with the reduction of apoptosis in cardiac cells, relieving sepsis-induced myocardial depression (350). Zhu et al. demonstrated that miR-150-5p was under-expressed in patients with myocardial damage caused by sepsis, and showed that at the molecular level, this miRNA is capable of reducing the levels of pro-apoptotic proteins caspase-3 and Bax and increasing the levels of anti-apoptotic protein Bcl-2. In our results, this miRNA showed a reduction in its levels in patients with PICS at 14 days of ICU admission. Additionally, supporting the proposal of using miR-150-5p as a possible therapy, its role in protecting against acute kidney injury in sepsis has been described through the repression of the MEKK3/JNK pathway, reducing cellular apoptosis, inflammatory response, and oxidative stress (346).

Long et al. demonstrated how positive regulation of miR-335 exerts protective effects against sepsis-induced myocardial injury (352). The reason for this protection against cardiac damage may be that positive regulation of miRNA-335-5p reduces inflammatory responses by inhibiting FASN through activation of the AMPK/ULK1 signaling pathway, as demonstrated by Gao et al. in a septic mouse model (356). Similarly, Oliveira S et al. also demonstrated that miRNA-335-5p alleviates the inflammatory response through the regulation of LRRK2 (357). Our results suggest that this miRNA may be involved in the persistent inflammation observed in patients with PICS.

#### *miRNAs with renal and hepatic function*

The miRNAs miR-550a and miR-550b have also been linked to renal failure, another organ frequently affected in sepsis survivors, which can affect up to 40% of patients (358). Elevated levels of miR-550a and miR-550b have been correlated with sepsis-induced acute kidney injury (351). However, in our comparison of samples obtained at two different ICU stays of patients with PICS, we found a reduction in these levels as the disease progresses. Future longitudinal

studies in PICS survivors should verify whether this is a comorbidity associated with PICS, and whether the levels of miR-550a and miR-550b are related to chronic kidney disease.

On the other hand, miR-3200-5p is capable of regulating cell death through ferroptosis mechanisms via ATF4 in liver cancer cells (359). Since liver cells are capable of dying through ferroptosis mechanisms, which have also been described as involved in sepsis (360), and where miR-3200-5p appears as a regulatory element of this mechanism, our results suggest that this miRNA could be important in the development of sepsis-associated liver complications.

In conclusion, among all the miRNAs described in this section, the diagnostic role of sepsis played by miR-206 stands out, as it not only relates to disease severity, but also distinguishes between patients in the same group at different times. Furthermore, we postulate that generating a miRNA signature that includes miR-10395-3p, together with let-7d-5p and miR-133a, will help in the differential diagnosis of patients with worse outcomes, serving to identify early on which patients will progress to PICS. Additionally, including miR-27b, miR-122, and miR-4512 in this miRNA signature could help to discern whether patients who develop PICS will experience long-term immunosuppression or, on the contrary, persistent inflammation through the analysis of miR-150-5p and miRNA-335-5p expression. Validation of this miRNA signature will allow for the establishment of appropriate follow-up protocols for these patients, with the aim of reducing high mortality rates and improving the quality of life of septic patients who survive sepsis (Figure 38).

*9.4.9.4.2. FUNCTIONAL ENRICHMENT ANALYSIS WITH DIFFERENTIALLY EXPRESSED MIRNAS DURING THE CLINICAL EVOLUTION OF PATIENTS WITH PICS (BETWEEN PICS-C AND PICS-A).*

In the comparison between time points within the same group of PICS patients, 251 KEGG pathways were found when performing the ORA analysis, considering those found in overexpressed and underexpressed miRNAs (Figure 40). When performing the same analysis for GO terms, more than 3000 terms were obtained, considering all miRNAs (Figure 41).

Cellular senescence, whose importance in sepsis was described in previous sections, was observed again as one of the most relevant pathways (Figure 40), both in overexpressed and underexpressed miRNAs. Likewise, some pathways such as PI3K-Akt (Phosphatidylinositol 3-kinase/serine/threonine kinase B) or FoxO (Figure 40B), which have been shown to be involved in immune system homeostasis (361), were obtained. Specifically, the PI3K-Akt pathway is a pathway that plays a crucial role in the functions of immune cells and also in the coagulation

pathway (362). This pathway regulates processes involved in the development of cellular immunity, and in the survival, proliferation, and specific functions of immune cells (363), as well as in the inflammatory response (364). In fact, Liu et al. described that controlling the PI3K-Akt pathway could control sepsis-induced cardiac dysfunction (365). In addition, the FoxO pathway also regulates the basic progression of the cell cycle and lymphocyte homeostasis, including a critical function in the termination and resolution of an immune response (361).

Regarding the GO terms, it is interesting to note that most of the pathways related to overexpressed miRNAs are related to histone modification and chromatin remodeling, which are central themes in this work since post-translational histone modification, such as citrullination, plays a key role in chromatin packaging (131,253,366,367) and thus in gene expression regulation. Another pathway is involved in the regulation of cell adhesion mechanisms. Specifically, we found these mechanisms to be altered in vitro studies, and we observed a deregulation of V-CAM and I-CAM in endothelial cells exposed to extracellular histones both in native and citrullinated conditions (Figure 18). In this regard, our group also reported elevated levels of I-CAM and E-SEL in plasma samples from sepsis patients, demonstrating that they were ideal candidates for the diagnosis and characterization of worse patient prognosis (57).

The regulation of cell adhesion is closely related to sepsis because it is involved in the rolling and migration of immune cells to the site of infection. Among them, it has been shown that the dysregulation of interactions between endothelial cells and neutrophils plays a key role during organ damage and inflammation (368).

When the GSEA analysis was performed with an adjusted value of 0.1, a total of 4 KEGG pathways were obtained, all of them for the underexpressed miRNAs (Figure 42). Using the same analysis to obtain the GO terms, a total of 108 terms were obtained, between the overexpressed and underexpressed miRNAs (Figure 43).

The calcium signaling pathway was one of the most interesting pathways observed to be altered among the KEGG pathways (Figure 42). Alterations associated with calcium homeostasis have been described in patients with sepsis, who have lower levels of plasma calcium, especially the most critical patients (369). Müller et al. postulate that the decrease in these levels is related to calcitonin precursors (369). In fact, procalcitonin is one of the markers used in sepsis to identify if the focus of infection is bacterial, indicating the need for antibiotic use to treat the infection in these patients (370,371).

Among the pathways that appear relevant when analyzing the main GO terms (Figure 43), we find the actin binding pathway and others previously described in this work, such as the pathway

involved in cell adhesion molecules (57) or transmembrane receptor activity (such as TLRs) (295,296).

Some actin-binding proteins have been associated with the progression of sepsis to more severe phenotypes due to massive arrival of neutrophils to peripheral organs (372). It has been described that neutrophil extravasation (migration) into tissues depends on actin-binding proteins, such as cortactin, which is ubiquitously expressed in most cells except neutrophils. Endothelial cortactin is necessary for proper regulation of transendothelial migration and recruitment of neutrophils to infection sites (372), so dysregulation of the pathway involved in actin-binding proteins can cause worse outcomes in septic patients.

Other GO pathways described by GSEA analysis are related to humoral immune response and extracellular matrix, previously discussed. The humoral response is related to circulating immune cells, such as B and T lymphocytes, which have been highly dysregulated in sepsis. We observe that the miRNAs that interact with these pathways are underexpressed, increasing the levels of this immune response. This is consistent with previously published results from our group, which demonstrate that the adaptive response is activated in the later stages of sepsis (57). Additionally, it is important to note that the comparison being analyzed is between PICS patients at different times, comparing the evolution after 14 days in the ICU with the initial times of sepsis development (samples taken during the first 24 hours of ICU admission), which also agrees with the functions in which significant miRNAs are involved and with previously published results (57).

#### **9.4.10. PBMCS FROM PATIENTS WITH SEPSIS, CCI, AND PICS PRESENT DIFFERENT PATTERNS OF DNA METHYLATION**

The methylation analysis of the CpG sites was performed using the Illumina EPIC 850K array, using the same samples on which the miRNome was analyzed. These patients were admitted to the ICU of the HCUV, categorized as septic patients, ECC, and PICS. The clinical details of each group of patients are presented in section 5.10 (Figures 11 and 13 of materials and methods; Supplementary Table 1 and Table 13). Let us remember that patients with CCI (Chronic Critically Ill) are defined as patients with sepsis who have been admitted to the ICU for at least 7 days with ongoing organ failure and requiring mechanical ventilation (79). Patients with PICS (Persistent Inflammation, Activation of Catabolism, and Immunosuppression Syndrome) are patients with sepsis admitted to the ICU for at least 14 days and who meet the criteria of Gentile et al. (see the section on material and methods point 5.10) (84).

The aim of this analysis was to find differential methylation patterns both at the CpG site level (differentially methylated positions or DMP) and at the methylation region level (differentially methylated regions or DMR), with a significant statistical weight ( $FDR < 0.05$ ) between the different experimental groups to perform overrepresentation analyzes of KEGG pathways and GO terms and to understand the molecular mechanisms that are occurring during these phenotypes. The comparisons made were: ECC vs sepsis, PICS vs sepsis, ECC vs PICS, and PICS-C (3rd sample) vs PICS-A (1st sample).

First, a principal component analysis (PCA) was performed, excluding the age and sex of the patients, to observe how the samples were grouped (Figure 44). The grouping of some samples from the same experimental set, as is the case of the sepsis samples, the results obtained showed many samples were not grouped and presented a random distribution that does not separate the different patient groups. Based on these results, an analysis of positions with differential methylation was performed between the samples obtained during the first 24h, and a heat map was made with the 1000 CpG sites that present a lower adjusted p-value of Fisher's F test. Of note, although no significant probe was obtained for individual CpGs (with an  $FDR < 0.05$ ), the analysis allowed the classification of the different patient groups using all 1000 CpG sites (Figure 45). In this hierarchical analysis, it can be observed that there is an almost perfect grouping with very defined methylation patterns. Samples from PICS patients (presented in the center of Figure 45) showed greater, and more marked, methylation changes at baseline than patients with sepsis or CCI. Likewise, on the left of the figure were the patients with CCI, who also present very marked methylation changes, as shown by the red lines, much more delimited than in the case of septic patients, presented on the right of the figure under the color orange. Thus, it should be noted that patients with sepsis present very heterogeneous immune responses (373), which could explain the three septic patients that we found classified as CCI. Although CCI patients are septic patients with increased susceptibility to long-term functional conditions and comorbidities (374), changes in immune cell DNA methylation patterns could be a determining factor in understanding what happens in these patients. in the long term, using methylation changes between groups as prognostic biomarkers.

Differential methylation analyses were then carried out following the Limma package methodology for the 4 comparisons 2 to 2 indicated above, and no significant DMP was obtained. Since no DMPs were found with the Limma analysis, the entire data set was analyzed with the mCSEA method, in order to look for more subtle methylation differences between the different samples, and thus find DMRs (differentially methylated regions) between the groups. The results obtained from this analysis are shown in Table 20. As can be seen, DMRs were obtained for the 4 comparisons, the comparison of PICS vs. CCI was the one that presented more DMRs, and the

comparison of PICS vs. Sepsis the least. In this regard, it should be noted that when the pathways enriched by differential methylation in each comparison were analyzed using the KEGG and GO analyses, the comparison between PICS and sepsis did not show any pathways enriched for this clinical subtype of sepsis patient.

Later, in each comparison and in the attached documents (section 11), some of the most relevant genes obtained in each comparison are shown ([https://n9.cl/anexosphd\\_rov](https://n9.cl/anexosphd_rov)). On them, the graphs related to the mCSEA analysis were made and those that presented greater differences in methylation were selected as the most relevant. Those that presented smaller methylation differences are shown in the Annexes section (section 11).

#### **9.4.10.1. ANALYSIS OF FUNCTIONAL ENRICHMENT BETWEEN ECC AND SEPSIS**

For the analysis of KEGG pathways or GO term processes enriched in significant DMRs located in genes or promoters, ORA analysis was used. The methylation changes were analyzed and the GO terms referring to the most altered biological processes were presented (Figure 46). The first group compared were patients with CCI and patients with sepsis in samples obtained during the first 24h of admission to the ICU (see Figures 11 and 13).

In Figure 46, where some of the most relevant GO terms are shown, it can be seen that many of the most represented functions are related to the immune system. Some of these are signaling pathways mediated by cytokines, signaling pathways mediated by antigen receptors, and the regulation of the production of type I interferon, which is a type of cytokine that plays a fundamental role in the immune system activation and inflammation, as well as the activation of T cells (375), which are the lymphocytes that play a major role in adaptive immunity. In fact, some of the pathways that are presented in this figure highlight the main role of these cells, such as the activation of T cells, the positive selection of T cells in the thymus, or the signaling pathway of T cell receptors.

As can be seen (Figure 46), the greatest differential methylation changes found correspond to the positive selection pathway of T lymphocytes, specifically at the level of promoters, which indicates a potent remodeling of the production of these cells. In addition, gene-level methylation changes were found in T cell activation and in the T cell signaling pathway, supporting the idea of methylation pattern-mediated remodeling of T cells found changes in the levels of methylation in the production pathways of different cytokines, as well as with the production of type 1 interferon, which includes IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ , which play a main role in the activation of the system immune system (375). It is interesting to note that the methylation levels corresponding to non-



coding RNAs, such as miRNAs, were also found to be altered, which indicates that it is likely that the modulation of methylation levels during sepsis alters to some extent other forms of epigenetic regulation such as regulation through non-coding RNAs, as has recently been shown in some types of cancer (376).

Therefore, the main differentially altered pathways between patients with CCI and those with sepsis correspond, for the most part, to the regulation of the immune system. Mainly, adaptive immunity through the modulation of the production and activation of T lymphocytes, which directly affects the progression of the disease, as well as immunosuppression phenomena caused by an exhausted immune system.

By focusing on the KEGG pathways (Figure 47), we observed that the methylation patterns changes are very similar to those obtained in the analysis of the GO terms, highlighting the importance of T lymphocytes. However, the KEGG pathways allow us to deepen this alteration of T lymphocytes, observing that the greatest alteration in methylation levels corresponds to “helper” T lymphocytes, both at the gene and promoter levels. This is especially interesting because helper T lymphocytes (helper T cells) are considered to be the most important cells in adaptive immunity, as they are required for almost all adaptive immune responses. This is because they not only help activate B cells to secrete antibodies and activate macrophages to kill ingested microbes but also help activate cytotoxic T cells to lyse infected target cells (377). Likewise, it should be noted that the methylation levels of the NK lymphocyte response were also found to be altered between both groups, specifically at the promoter level, which supports the epigenetic remodeling at the methylation level that occurs in CCI patients.

Another of the KEGG pathways observed in this comparison is the expression of PD-L1 (programmed cell death ligand) and PD-1 checkpoint in cancer. Both PD-1 and PD-L1 are classic sites of immune inhibition, considered promising strategies for the treatment of tumors, due to their ability to inhibit certain immune responses (378). In the case of the tumor environment, it has been observed that tumor-associated macrophages play a key role in PD-1/PD-L1-regulated immunosuppression since they inhibit the recruitment and function of T cells through cytokines, exosomes, and immune ligands (378). In this sense, controlling these points of immune inhibition may be a strategy to consider to develop new therapies that allow the treatment of sepsis, since inhibiting the exacerbated response that occurs during the onset of sepsis (288) could prevent the cascade of consequent events and therefore the progression of sepsis to more severe stages such as CCI or PICS.

#### 9.4.10.1.1. PROMOTERS AND GENES WITH DIFFERENTIAL METHYLATION BETWEEN ECC AND SEPSIS

Focusing on the different promoters and genes (607 and 541, respectively; [https://n9.cl/anexosphd\\_rov](https://n9.cl/anexosphd_rov)) found within this comparison, a selection was made according to their p-value and their biological function. In addition, genes repeated in other comparisons were screened, in order to obtain those that were able to more specifically discern, during the initial stages of sepsis, patients who would develop CCI from patients with sepsis (Table 21). It is important to highlight that the 3 promoters and the 4 selected genes were found to be hypomethylated, so it would be expected to find the most expressed regulating genes.

The 3 promoters (Table 21; Supplementary Figures 1-3) and the 4 selected genes (Table 21; Figures 48-50) from this comparison were represented by mCSEA analysis and located in the reference genome in order to see where the differential DMRs were found and thus define the positions of the DMR with the greatest difference in methylation, in order to later be able to carry out a validation of this differential methylation.

All selected genes and promoters had biological functions that have previously been linked to sepsis. For example, LGALS3BP (Supplementary Figure 1) codes for a protein whose function is related to cell-cell junctions. This is very interesting because in previous results we saw that patients with sepsis present alterations in the endothelium, which may affect the union of endothelial cells (379) causing an increase in permeability, which contributes to an increase in inflammation (380,381). In addition, this gene has already been postulated by other authors as a possible biomarker for sepsis diagnosis and prognosis (382), which is consistent with our results due to the presence of differential methylation in patients with sepsis and CCI during the first 24 hours of ICU admission.

Another differentially methylated promoter studied was HLA-DMB (Supplementary Figure 3). The HLA family of genes is involved in antigen presentation. It has been described that changes in HLA expression can affect the function of T helper lymphocytes, being associated with the immunosuppression phenomena (383). In this cohort of patients, where long-term immunosuppression phenomena are one of its most relevant characteristics, this gene gains special relevance, since finding methylation differences in the initial stages of sepsis could explain the problems related to the immune system that are observed in the future.

The mCSEA plot for the IL12RB2 gene is presented in Figure 48. This gene is involved in the response of innate immunity (NK cells) and adaptive immunity (Th1 and Th2 lymphocytes). Snyder et al. found altered transcriptomic expression of this gene in children with septic shock

and related it to immunoparalysis problems (384), positioning this gene as a good candidate capable of indicating long-term immunosuppression. This correlates with our results, since we found hypomethylation of this gene in CCI patients compared to sepsis patients, indicating an overactivation of its expression levels, which can culminate in an exhausted immune system and, therefore, in long-term immunosuppression. Likewise, the work by Cazalis et al found altered expression levels of LEF1 (Figure 49) in patients with septic shock who were slow to recover. In addition, they associated the function of this gene with the activation of the immune system and cell death processes (385). Since we also found changes in the methylation of this gene, specifically lower methylation levels in patients with CCI than in patients with sepsis, we may think that this gene would also regulate long-term immunosuppression in patients with sepsis who develop CCI.

Finally, the TCF7 gene has been related to the production of inflammatory factors (386) and is key to the development and differentiation of T cells. In our results, we observed changes in the methylation of this gene (Figure 49), which could participate in the long-term immunosuppression of these patients.

As we have seen, the genes selected in this comparison are all related to adaptive immunity, more specifically to T cells, which are the main effectors of the adaptive response. In this sense, it has been postulated that adaptive immunity deficits are the ones that cause the highest mortality in patients who survive sepsis (273).

#### **9.4.10.2. ANALYSIS OF FUNCTIONAL ENRICHMENT BETWEEN PICS AND CCI**

Regarding the comparison between PICS and CCI, GO pathways were found in overregulated and underregulated biological processes (Figures 51 and 52).

In the case of hypomethylation (Figure 51), only altered promoters related to the immune system were found, as in the previous comparison. In this case, we also observed a downregulation of methylation corresponding to pathways related to T cells and a hypomethylation related to the upregulation of differentiation into T helper type 2 (Th2) cells, capable of orchestrating the protective type 2 immune responses, such as those that help repair damaged tissue. In this regard, it should be noted that the work by Ferguson et al., published in the late 1990s, already found alterations in the Th2 levels available in plasma samples from septic patients compared to controls (387). For this reason, and because these cells have also been related to the development of chronic inflammatory diseases, such as asthma or allergies (388), these altered GO pathways could be related to long-term comorbidities associated with sepsis.

Granulocyte differentiation, including neutrophils, is also another pathway that was found to be hypomethylated, indicating greater activation. In this line, the activation of neutrophils involved in the immune response was also found to be upregulated in patients with PICS at initial times. This means that in PICS patients, there is not only an alteration in the function of T lymphocytes, especially in helper T lymphocytes, but also in other immune cells such as neutrophils or dendritic cells, indicating a greater dysregulation of the system immunity in these patients. This is consistent with the clinical profile of the patients since this group of patients is characterized by profound immune dysregulation, generally associated with immunosuppression and catabolic disorders, leading to a worse prognosis.

Focusing on pathways that show increased methylation levels in PICS patients compared to CCI patients, we observed hypermethylation in promoters involved in the positive selection of T cells in the thymus (Figure 52), contrary to what we observed in the comparison between CCI and sepsis, we found this hypomethylated pathway. These results suggest that patients with PICS would be producing a lower number of T cells since hypermethylation is associated with reduced expression by chromatin compaction. This is complemented by the proliferation pathway of leukocytes, and those of activation and proliferation of T cells, which also appear hypermethylated in this comparison (Figure 52). Similarly, in this comparison, we also observed hypermethylation in the antigen receptor-mediated signaling pathway, which was also hypomethylated in the comparison of patients with CCI and sepsis. This would explain why patients with PICS have severe immunosuppression, since, as our results show, there is profound remodeling of DNA methylation in key genes included in immune system pathways. This results in a worse response mediated by antigen presentation, deactivation of T lymphocytes, and even activation problems with myeloid differentiation (macrophages and dendritic cells), as well as impaired neutrophil response.

Notably, in this comparison (Figure 52) we also observed hypermethylated genes of the B-cell activation pathway, indicating that there is considerable dysregulation in the adaptive immune system (both T cells and B cells) in PICS patients from initial times of sepsis. Measuring these parameters at the time of patient admission will provide very relevant information on the patient's condition and prognosis, since knowing that the patient is going to develop a PICS before it is even categorized as CCI, which indicates that their stay in the ICU will be at least 14 days. In addition, the risk of mortality during the following two years will be increased (389), since the dysregulation of the immune system indicates that the patient will undergo severe immune remodeling during the development of the disease, which can lead directly to immunosuppression and catabolism alterations, which is characteristic of patients with PICS (78).

Finally, among the hypermethylated pathways in this comparison (PICS vs CCI), we looked at the Fc receptor signaling pathway (Figure 52). The Fc protein is part of the light chain of the antibodies, and the alteration of the receptor of these molecules, together with an alteration of the activation of the B leukocytes in charge of releasing the antibodies, indicates a serious imbalance in these patients since all the adaptive immune response would be being compromised. In addition, Fc receptors control innate and humoral immunity, both of which are essential for responding adequately to infections and preventing chronic inflammation (390), such as that seen in PICS patients.

#### 9.4.10.2.1. PROMOTERS AND GENES WITH DIFFERENTIAL METHYLATION BETWEEN PICS AND CCI

In this comparison, 1158 promoters and 1000 genes with significant DMRs emerged ([https://n9.cl/anexosphd\\_rov](https://n9.cl/anexosphd_rov)). Based on these data, screening was carried out according to the p-value and the biological function, avoiding selecting the genes repeated in other comparisons, in order to choose only those that discerned, at initial times, the patients with sepsis who would develop CCI of those who would develop PICS. The promoters and genes selected for this comparison are shown in Table 22. After screening the data, according to their p-value and biological function, and reducing them to 7 promoters and 2 genes, the mCSEA representations of each of them were performed. them (Figures 54-58 and attached Figures 5-8) and those with the greatest methylation differences were selected (Figures 40-44).

The GD3G promoter was found to be hypermethylated (Figure 54) in PICS patients compared to CCI patients. This gene is responsible for assembling subunits of T lymphocyte receptors and deficits in the assembly of these receptors have been described as related to problems of immunodeficiency related to T lymphocytes (391). In fact, Huang et al validated the changes in GD3G expression in patients with sepsis and proposed it as a diagnostic and prognostic biomarker of sepsis, relating it to long-term immunosuppression (391). These results, together with those obtained in this work related to the hypermethylation of this gene, would indicate that there is a decrease in the expression of T cell receptors, a fact that can have very significant consequences in the development of the immune response. Likewise, the PDCD1 promoter was also observed to be hypermethylated in PICS patients compared to CCI patients (Figure 55). PDCD1 codes for the programmed cell death protein 1, which is an inhibitory receptor expressed in T cells. It is involved in the regulation of T lymphocyte functions, including CD8+ effector cells. In addition, this protein also promotes the differentiation of CD4+ cells to regulatory T cells (392). Therefore, we can say that the response of T cells will be diminished from the initial moments in patients with sepsis who will develop PICS, making the study of methylation of these two genes a good

candidate to monitor which patients with sepsis will have a worse prognosis and long-term immunosuppression.

There are different isoforms of defensins (DEFA1-4) expressed in different immune cells, such as lymphocytes, monocytes, or NK cells (393,394). Isoform 4, encoded for DEFA4, has been found expressed in neutrophil granules and is responsible for defending the host against viruses and bacteria (395). This is especially relevant in this work since we have focused on describing the role of neutrophils in innate immunity through the mechanisms of NETosis, through which the granules containing defensins would be released. In this sense, DEFA4 expression problems have been associated with diseases related to inflammation and immune dysfunction (396), as occurs in PICS patients. It is relevant to underline that the results obtained in this work showed hypomethylation of this defensin isoform, indicating an overexpression (Figure 56). Since these results were found in samples obtained during the first 24h of stay in the ICU, this could explain the greater activation of NETosis events during this period of time, as well as the fact that patients with a more complicated case of sepsis present higher levels of H3cit in plasma, as we observed in the results section 6.7, where we saw that the patients with the worst prognosis showed more levels of H3cit. Thus, those patients who show greater events of NETosis could be affected by a lack of these cells in the future, triggering different immunosuppression events, characteristic of patients with PICS.

IL-10 is the anti-inflammatory interleukin par excellence, having been found expressed in the plasma of patients with SS in the early stages of sepsis (57), explaining the CARS activated in septic patients (97) (Figure 3). The methylation changes found in these results (Figure 57) could explain why in some phenotypes of septic patients there is a maladjustment of the long-term immune response since patients with PICS show lower levels of methylation in the promoter of IL10 than CCI patients (Figure 57). This indicates that, in the initial stages, when a proinflammatory response should be activated to combat the organism causing sepsis, an anti-inflammatory response is also being activated, causing a compensatory mechanism between both responses.

Finally, it was observed that the TNFSF4 gene was hypomethylated in patients with PICS compared to patients with CCI (Figure 58). This gene is a cytokine of the TNF (tumor necrosis factor) family that functions in T cells as an antigen presenter and mediates the adhesion of activated T cells to endothelial cells (397). The hyperactivity of T cells can end up depleting them, which would cause a depleted immune system, contributing to the immunosuppression that characterizes patients with PICS.

**9.4.10.3. ANALYSIS OF FUNCTIONAL ENRICHMENT OF PICS PATIENTS DURING THEIR CLINICAL EVOLUTION (BETWEEN 24 HOURS AND 14 DAYS).**

Finally, a comparison was made between patients with PICS at different times. The comparison between the different times of clinical evolution of patients with PICS provides us with information on the differences in methylation patterns both at initial times (the first 24h after admission to the ICU) and 14 days after ICU admission. This is key since it offers us a vision of the patient's own progression over time, which helps us understand the molecular mechanisms that govern the progression of the disease, as well as offering prognostic biomarkers.

Among the pathways found after the analysis of functional enrichment, deregulation of T lymphocytes stands out again (Figure 60-62), finding hypomethylation related to these cells on day 14 compared to the day of admission to the ICU. This suggests that patients who present alterations related to the methylation of genes and promoters of genes related to the control of the immune system in the initial times develop PICS, while patients with minor alterations in the methylation profile of genes and related promoters with T lymphocytes at early times, it is likely that they will not develop this syndrome. Likewise, again, deregulation was also found in the production of cytokines, which are the immune signaler's par excellence, regulating the activation of the different cells of the immune system (398).

The hypomethylation of the genes involved in the immune system (Figure 59), when comparing the methylation profile of 14 days with respect to 24 hours, especially those related to T lymphocytes, could indicate that, as the time of uptake progresses, admission of a septic patient to the ICU, an alteration in the methylation pattern may occur in the patient's immune cells that may be linked to the alteration of the immune response of the adaptive system (77). This can lead to hypomethylation of promoters of genes key to T cell function to allow the host to counteract the infection, and hyperactivation of T cells, which can trigger an exhausted adaptive system leading to a worse prognosis for the patient (273).

Regarding the hypermethylated promoters, in addition to the regulation of the production and differentiation of T helper cells, a strong deregulation of the differentiation of myeloid cells was found, indicating alterations in the innate immune system (399), reinforced by an alteration of neutrophils, their activation, degranulation (cytotoxic capacity) being altered, and even the immunity itself mediated directly by these cells (Figure 60). This indicates a profound remodeling, at the promoters and gene methylation level of the immune system, both at the adaptive and innate immune system, which should lead to a lower systemic immune response of the patient, inducing a worse prognosis.

Finally, when analyzing the methylation differences of the main KEGG pathways between the PICS patients at baseline and the samples taken 14 days later, we again found an alteration in the methylation of the promoters and genes involved in the pathway production of T lymphocytes, mainly T helper lymphocytes, as well as an alteration of NK lymphocytes (Figure 61). Likewise, we also found an alteration in the methylation of genes and promoters involved in the production of cytokines, mainly in cytokines related to inflammation such as TNF (Figure 61). All these results confirm the results obtained previously, where it was postulated that the alteration in methylation levels is related to a worse innate and adaptive immune response, mainly from T lymphocytes (273), and within these, from T helper lymphocytes, which can lead to a depleted immune system (62,272,273). Likewise, our results also suggest the potential of analyzing methylation levels at initial times, being able to indicate the severity of the patient, as well as the progress of their disease and its prognosis, and even molecularly explaining the reasons for this evolution and forecast.

#### 9.4.10.3.1. PROMOTERS AND GENES WITH DIFFERENTIAL METHYLATION BETWEEN PICS-C AND PICS-A

In the comparison of patients diagnosed with PICS where the methylome was analyzed in the first 24 hours after admission to the ICU and 14 days after admission, 662 promoters and 733 differentially methylated genes were found ([https://n9.cl/annexesphd\\_rov](https://n9.cl/annexesphd_rov)). Reducing these data, after screening according to p-value and biological function, to 5 promoters and 2 genes (Table 23). The mCSEA analysis was performed on these prioritized promoters and genes and two promoters and one gene were discarded because they did not present relevant methylation differences in this analysis of the methylation profile of the region by mCSEA (Figures S9 - S11).

The PRTN3 promoter codes for proteinase 3, with a function in the immune system by mediating the binding of enzymes and signaling receptors (400), was found to be hypermethylated in samples from 14 days of admission to the ICU (Figure 62). In other words, we observed that patients with PICS during the first 24h of admission to the ICU present lower levels of methylation in the PRTN3 gene. These results suggest that by day 14, the immune system of the patients has undergone a change in the methylation pattern that may contribute to long-term immunosuppression since this promoter also regulates different processes such as conventional dendritic cell differentiation maturation. and neutrophil extravasation (400). In addition, previous results published by our research group have already demonstrated hypomethylation of the PRTN3 gene in patients with neonatal sepsis (220,401).

The CLEC2D promoter regulates the expression of the LLT1 gene (Induction of Lectin-like Transcript 1). LLT1 is the ligand of the CD161 receptor, located on the NK cells' surface, which



acts in an inhibitory manner, thus controlling the expression of these cells (402). Thus, hypomethylation of the CLEC2D promoter (Figure 63) indicates an overexpression of LLT1 and therefore a greater binding to the CD161 receptor, decreasing the NK cell population. It is important to highlight that NK cells work by creating positive feedback with macrophages through cytokines such as IL-12 or INF- $\gamma$  (57), so a reduction in NKs could cause a reduction in macrophages, which in turn they act on the activation of T lymphocytes (403). Therefore, changes in the methylation of this promoter would have important effects on the immune response, both innate and adaptive, of patients with sepsis. Since the methylation changes are observed in the sample from day 14 of ICU admission in patients with PICS, we can say that the methylation changes of this promoter may be involved in the immunosuppression phenomena observed in these patients. In fact, although to date it has not been directly related to sepsis, the LLT1 gene has been related to different immunosuppressive properties in different types of tumors, reinforcing the idea of the role of CLEC2D methylation in the immunosuppression observed in patients with PICS (404).

T lymphocytes have been linked to changes in long-term immunosuppression in diseases such as sepsis (273). It has been shown that CD3D is one of the main activation receptors for T cells, so the hypomethylation of this gene presented by patients with PICS admitted to the ICU for 14 days (Figure 64), would a priori result in an increased expression of the CD3D receptor, which implies an overactivation of T lymphocytes and, therefore, a greater immune response mediated by T lymphocytes. On the contrary, an overactivation that is maintained over time could end up causing immunosuppression, due to the depletion of T cells (405).

On the other hand, perforins (PRF1) are membrane proteins of T cells and NK cells, responsible for making pores in other cells and destroying them through cytolysis processes. These membrane proteins help control the population of immune cells (406). Therefore, due to the fact that hypomethylation of the gene that codes for this protein were observed in the samples from patients with PICS obtained 14 days after admission to the ICU (Figure 65), there would be a greater expression of these proteins. membrane capable of causing cytolysis in other cells.

Among all the promoters and genes that were selected, and those that were considered most relevant due to their methylation changes, it should be noted that the majority are related to the adaptive immune response and, especially, to T lymphocytes. has previously described that during sepsis, T lymphocytes are the most affected, the proper functioning of these cells being compromised, with high levels of mortality or exhausted to carry out their function correctly (273,407). For all these reasons, to analyze the methylation changes during the first 24h of admission to the ICU of the genes that have emerged as relevant in the comparisons ECC vs Sepsis (IL12RB2, LEF1, TCF7) and PICS vs ECC (CD3G, PDCD1, DEFA4, IL10, TNFSF4)

would make it possible to classify patients with sepsis that will evolve to the most severe phenotypes. Likewise, to evaluate the methylation of the genes that showed differential methylation in the comparison of patients with PICS admitted to the ICU for 14 days vs the samples of the patients taken during the first 24h after admission to the ICU (PRTN3, CLEC2D, CD3D, PRF1), would help to understand which molecular mechanisms are modified to cause the long-term immunosuppression that characterizes these patients.

#### **9.4.11. INTEGRATION OF COMMON PATHWAYS BETWEEN MIRNA AND METHYLATION CHANGES IN PATIENTS WITH PICS**

Let us remember that patients with PICS are patients with sepsis, previously categorized (7 days after admission to the ICU) as patients with CCI, who remain in the ICU for 14 days or more. PICS patients are patients who develop a syndrome of persistent inflammation, activation of catabolism, and immunosuppression. From the clinical point of view, following the criteria established by Gentile et al (84), they meet the following parameters: weight loss (more than 10% during the time of admission), loss of muscle mass below 18, albumin less than 3mg/dL, prealbumin less than 10mg/dL, C-reactive protein (CRP) greater than 1.5mg/L, and a total lymphocyte count less than 800/mm<sup>3</sup> (84); they would be clinically classified as PICS patients (Figures 4 and 13).

After jointly analyzing the changes obtained in the patterns of microRNAs and methylation in patients with PICS compared to patients with CCI or sepsis, we observed that the NET formation pathway is a pathway that is downregulated by miRNAs. In fact, although no miRNA related to this pathway turned out to be one of the most altered miRNAs in this comparison, the pathway did turn out to be one of the most altered (KEGG pathways, section 5.9.3.2), demonstrating that the alteration in this pathway is not due to a single miRNA, but there are different miRNAs that are contributing to an alteration in this pathway, such as miR-155, which regulates PAD4 (408), or miR-223 or miR-146, which inhibit the formation of NETs (409,410), most of them found to be altered in our study ([https://n9.cl/anexosphd\\_rov](https://n9.cl/anexosphd_rov)). In this same comparison, in the methylation analyses, we observed that the promoters and genes involved in granulocyte differentiation (where neutrophils are included), as well as those involved in the activation of neutrophils involved in the immune response, are hypomethylated. such as the promoter of the DEFA4 gene. The hypomethylation of these pathways, as well as the downregulation of miRNAs for these pathways, would explain the hyperactivation of neutrophils and NETosis events in these patients. This fact would be in accordance with the results previously observed, since the patients with more severe sepsis (non-surviving SS) were those who showed higher levels of H3cit in the plasma (section 5.6), an event that, as described in this work, is necessary for the activation of

NETosis. Bearing in mind that patients with PICS were hospitalized in the ICU for longer than patients with sepsis or CCI (Table 13), we can deduce that PICS patients will be the patients with the greatest comorbidities in the future.

In reference to the NET formation pathway, where many of the genes involved in this pathway should be downregulated by miRNA overexpression in the comparison of PICS vs. ECC, it should be noted that the longer the patient is hospitalized in the In the ICU (patients with PICS admitted for 14 days), changes were found in the methylation patterns of pathways related to neutrophil degranulation, activated neutrophils to mediate the immune response, and neutrophil-mediated immunity. Interestingly, these pathways were found to be hypermethylated in patients with PICS admitted to the ICU for 14 days. This would indicate that patients with PICS have greater activation of neutrophils and responses mediated by this cell type at initial times compared to other groups of patients studied, but as the patient spends more time in the ICU, the genes involved in these molecular pathways undergo changes in methylation patterns (eg PRTN3) that produce less activation of these pathways. This could explain the long-term immunosuppression phenomena observed in these patients, especially those related to innate immunity (215,411).

In the comparison of PICS vs ECC of miRNAs analysis, the molecular pathway of cell cycle function was observed to be altered, and in the comparison of PICS-C vs PICS-A, the molecular pathway of membrane receptors was observed to be altered. In the comparison of PICS-C vs PICS-A, that is, in PICS patients who have been admitted to the ICU for 14 days, different pathways related to T and B cell signaling receptors were found to be altered, as well as differentiation. of T cells. Our results suggest that as the patient is admitted to the ICU, changes occur in their epigenetic patterns involved in the differentiation mechanisms of cells related to the adaptive immune response, which would be one of the events key in the immunosuppression suffered by patients in the long term (215,411). In addition, in line with this, the genes involved in the antigen receptor signaling pathway and the differentiation of myeloid leukocytes were also found to be altered in terms of their methylation levels, in this comparison of patients who have been hospitalized for longer. Since myeloid leukocytes (macrophages and dendritic cells) are the ones that receive and display antigens, altering the mechanisms involved in antigen reception, especially in these cells, would cause myeloid cells to become inactive, considerably weakening the entire immune response (412).

The pathways involved in the regulation of cell adhesion and cell adhesion molecules were also found to be altered both at the level of miRNAs and methylation in patients admitted to the ICU for a longer time (PICS-C vs PICS-A). It has been described that cell adhesion molecules, including immunoglobulin and integrin receptors, are crucially important in mediating immune response processes (413), as well as being clearly involved in immunosuppression processes, as

is the case, for example, with ICAM-1 in MSCs cells (414). In particular, integrins play a key role in regulating all aspects of cellular immune function, such as delivery to tissues, activation of cellular effectors, and formation of the immunological synapse between immune cells or between immune cells and target cells, both during the homeostasis of the immune system and during inflammation (413). It is important to highlight that integrins are also key adhesion molecules to maintain the cell-cell union, therefore an alteration in these proteins could cause serious effects in the tissues (415).

Finally, in patients with PICS, the miRNA pathways involved in cellular senescence (miR-335 or miR-150) are altered, both at initial times compared to sepsis patients, and at more advanced times (PICS-C). PICS patients also showed this altered pathway at the methylation level during their clinical course (day 1 compared to day 14 of their ICU stay). The hypomethylation observed in these patients would indicate greater cellular senescence. Muñoz-Espín and Serrano published in Nature a few years ago that different pathological processes promote cell senescence in order to favor tissue regeneration and eliminate the etiological agent of the pathology, also activating the immune response. However, in the said study, they observed that in advanced pathological states, cellular senescence does not act effectively, and therefore aggravates the pathological manifestations (416). Extrapolating the previous results to the present work: the methylation changes in the pathways involved in cellular senescence in patients with PICS admitted to the ICU for a long time would be contributing to the pathophysiology of sepsis, explaining why these patients have a worse prognosis than patients with sepsis or CCI.

# 10. BIBLIOGRAFÍA



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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Torio CM, Andrews RM. STATISTICAL BRIEF # 160 National Inpatient Hospital Costs : The Most. *Health Cost Util Proj Stat Br #160 Natl Inpatient Hosp Costs Most Expens Cond by Payer, 2011.* 2013;31(1):1–12.
6. 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.
7. Inada-Kim M, Nsutebu E. NEWS 2: An opportunity to standardise the management of deterioration and sepsis. *BMJ.* 2018 Mar;1(360):1260–5.
8. Sepsis Trust. Screening and Action tools. UK Sepsis Trust. 2019;
9. 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.
10. Kim H Il, Park S. Sepsis: Early recognition and optimized treatment. Vol. 82, *Tuberculosis and Respiratory Diseases.* Korean National Tuberculosis Association; 2019. p. 6–14.
11. Esper AM, Moss M, Lewis CA, Nisbet R, Mannino DM, Martin GS. The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. *Crit Care Med.* 2006 Oct;34(10):2576–82.

12. Sinapidis D, Kosmas V, Vittoros V, Koutelidakis IM, Pantazi A, Stefos A, et al. Progression into sepsis: an individualized process varying by the interaction of comorbidities with the underlying infection. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):242.
13. 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.
14. Zanotti-Cavazzoni SL. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *Yearb Crit Care Med.* 2011;20(11):188–90.
15. 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).
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Siller-Ruiz M, Hernández-Egido S, Sánchez-Juanes F, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Métodos rápidos de identificación de bacterias y hongos. Espectrometría de masas MALDI-TOF, medios cromogénicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017 May;35(5):303–13.
21. Andrade SS, Bispo PJM, Gales AC. Advances in the microbiological diagnosis of sepsis. *Shock.* 2008 Oct;30(7):41–6.
22. Suberviola 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.



23. Annane D, Bellissant E, Cavaillon J-M. Septic shock. *Lancet*. 2005 Jan;365(9453):63–78.
24. Tziolos N, Giamarellos-Bourboulis EJ. Contemporary approaches to the rapid molecular diagnosis of sepsis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016 Nov 1;16(11):1201–7.
25. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: A review. *Crit Care*. 2010;14:1–18.
26. Pierrakos 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.
27. Gregoriano C, Heilmann E, Molitor A, Schuetz P. Role of procalcitonin use in the management of sepsis. *J Thorac Dis*. 2020 Feb;12(S1):S5–15.
28. 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.
29. 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.
30. Prescott HC, Osterholzer JJ, Langa KM, Angus DC, Iwashyna TJ. Late mortality after sepsis: Propensity matched cohort study. *BMJ*. 2016;353:1–8.
31. Carson WF, Cavassani KA, Dou Y, Kunkel SL. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics*. 2011;6(3):273–83.
32. 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.
33. Beltrán-García J, Osa-Verdegal R, Nácher-Sendra E, Cardona-Monzonís A, Sanchis-Gomar F, Carbonell N, et al. Role of non-coding RNAs as biomarkers of deleterious cardiovascular effects in sepsis. *Prog Cardiovasc Dis*. 2021 Sep;68:70–7.
34. Osa-Verdegal R, Beltrán-García J, Pallardó F V., García-Giménez JL. Role of microRNAs As Biomarkers in Sepsis-Associated Encephalopathy. *Mol Neurobiol*. 2021 Sep 23;58(9):4682–93.
35. Osa-Verdegal R, Beltrán-García J, Górriz JL, Martínez Jabaloyas JM, Pallardó F V., García-Giménez JL. Use of Circular RNAs in Diagnosis, Prognosis and Therapeutics of Renal Cell Carcinoma. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10(June):1–14.

36. Hollenberg SM, Singer M. Pathophysiology of sepsis-induced cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol.* 2021 Jun 20;18(6):424–34.
37. Peerapornratana S, Manrique-Caballero CL, Gómez H, Kellum JA. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. *Kidney Int.* 2019 Nov;96(5):1083–99.
38. Mankowski RT, Yende S, Angus DC. Long-term impact of sepsis on cardiovascular health. *Intensive Care Med.* 2019 Jan;45(1):78–81.
39. Ou SM, Chu H, Chao PW, Lee YJ, Kuo SC, Chen TJ, et al. Long-term mortality and major adverse cardiovascular events in sepsis survivors a nationwide population-based study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016 Jul 15;194(2):209–17.
40. Walkey AJ, Hammill BG, Curtis LH, Benjamin EJ. Long-term Outcomes Following Development of New-Onset Atrial Fibrillation During Sepsis. *Chest.* 2014 Nov;146(5):1187–95.
41. Vallabhajosyula S, Jentzer JC, Geske JB, Kumar M, Sakhuja A, Singhal A, et al. New-Onset Heart Failure and Mortality in Hospital Survivors of Sepsis-Related Left Ventricular Dysfunction. *Shock.* 2018 Feb;49(2):144–9.
42. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, et al. Septic shock in humans: Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. In: *Annals of Internal Medicine.* American College of Physicians; 1990. p. 227–42.
43. Kodali MC, Chen H, Liao F-F. Temporal unsnarling of brain's acute neuroinflammatory transcriptional profiles reveals panendothelitis as the earliest event preceding microgliosis. *Mol Psychiatry.* 2020 Dec 8;
44. Chung H-Y, Wickel J, Brunkhorst FM, Geis C. Sepsis-Associated Encephalopathy: From Delirium to Dementia? *J Clin Med.* 2020 Mar 5;9(3):703.
45. Chaudhry N, Duggal AK. Sepsis Associated Encephalopathy. *Adv Med.* 2014;2014(1):1–16.
46. Celes MRN, Malvestio LM, Suadicaní 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.
47. Kaplan JM. Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity 1. *J Immunol.* 2013;189(6):2689–95.
  48. 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.
  49. Cavallion J, Singer M, Skirecki T. Sepsis therapies: learning from 30 years of failure of translational research to propose new leads. *EMBO Mol Med.* 2020 Apr;12(4).
  50. Delano MJ, Ward PA. Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *J Clin Invest.* 2016 Jan;126(1):23–31.
  51. Davies MG, Hagen P-O. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg.* 2005 Dec 8;84(7):920–35.
  52. Jaffer U, Wade RG, Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth.* 2010;2(3):161–75.
  53. Christaki E, Anyfanti P, Opal SM. Immunomodulatory therapy for sepsis: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011 Nov 10;9(11):1013–33.
  54. Giamarellos-Bourboulis EJ, Raftogiannis M. The immune response to severe bacterial infections: consequences for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012 Mar 10;10(3):369–80.
  55. Cinel I, Opal SM. Molecular biology of inflammation and sepsis: A primer\*. *Crit Care Med.* 2009 Jan;37(1):291–304.
  56. Casey LC. IMMUNOLOGIC RESPONSE TO INFECTION AND ITS ROLE IN SEPTIC SHOCK. *Crit Care Clin.* 2000 Apr;16(2):193–213.
  57. Beltrán-García J, Osa-Verdegal R, Jávega B, Herrera G, O'Connor J-E, García-López E, et al. Characterization of Early Peripheral Immune Responses in Patients with Sepsis and Septic Shock. *Biomedicines.* 2022 Feb;10(3):2–19.
  58. 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.
59. Deguchi A, Yamamoto T, Shibata N, Maru Y. S100A8 may govern hyper-inflammation in severe COVID-19. *FASEB J*. 2021 Sep 2;35(9).
60. Opal S. Immunologic Alterations and the Pathogenesis of Organ Failure in the ICU. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011 Oct 11;32(05):569–80.
61. 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.
62. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. 2013 Mar;13(3):260–8.
63. Frazier WJ, Hall MW. Immunoparalysis and Adverse Outcomes from Critical Illness. *Pediatr Clin North Am*. 2008 Jun;55(3):647–68.
64. Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *N Engl J Med*. 2003 Jan 9;348(2):138–50.
65. 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.
66. Mathias B, Szpila BE, Moore FA, Efron PA, Moldawer LL. A Review of GM-CSF Therapy in Sepsis. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Dec;94(50):e2044.
67. Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(2):121–37.
68. 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.
69. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: From cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:862–74.
70. Tsu L, Ching TT. Sepsis: The future is bright. *Crit Care Med*. 2006;34(3):2484–5.
71. 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.

72. Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Fontes B, Banerjee A, Peterson VM. Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges. *Shock*. 1995 Mar;3(3):157–66.
73. Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Sauaia A, Banerjee A, Peterson VM. Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure. *J Trauma*. 1995 Sep;39(3):411–7.
74. Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg*. 2001 Sep;193(3):237–44.
75. Mannick JA. 15th Annual Semmelweis Lecture Surgical Infection Society-Europe. Injury-induced immune dysfunction: is the lymphocyte irrelevant? *Surg Infect (Larchmt)*. 2002;3(4):297–302.
76. Miller-Graziano CL, Szabo G, Griffey K, Mehta B, Kodys K, Catalano D. Role of elevated monocyte transforming growth factor beta (TGF beta) production in posttrauma immunosuppression. *J Clin Immunol*. 1991 Mar;11(2):95–102.
77. Rosenthal MD, Moore FA. Persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism: Evolution of multiple organ dysfunction. *Surg Infect (Larchmt)*. 2016 Apr 1;17(2):167–72.
78. 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.
79. Nelson JE, Cox CE, Hope AA, Carson SS. Chronic Critical Illness. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Aug 15;182(4):446–54.
80. Moore FA, Moore EE. The evolving rationale for early enteral nutrition based on paradigms of multiple organ failure: a personal journey. *Nutr Clin Pract*. 24(3):297–304.
81. Faist E, Baue AE, Dittmer H, Heberer G. Multiple organ failure in polytrauma patients. *J Trauma*. 1983 Sep;23(9):775–87.
82. Faist E, Mewes A, Baker CC, Strasser T, Alkan SS, Rieber P, et al. Prostaglandin E2 (PGE2)-dependent suppression of interleukin alpha (IL-2) production in patients with major trauma. *J Trauma*. 1987 Aug;27(8):837–48.

83. Faist E, Schinkel C, Zimmer S. Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. *World J Surg.* 1996 May;20(4):454–9.
84. 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.
85. Daly BJ, Douglas SL, Kelley CG, O’toole E, Montenegro H. Trial of a disease management program to reduce hospital readmissions of the chronically critically ill. *Chest.* 2005 Aug;128(2):507–17.
86. Carson SS, Bach PB. The epidemiology and costs of chronic critical illness. *Crit Care Clin.* 2002 Jul;18(3):461–76.
87. Nelson JE, Mercado AF, Camhi SL, Tandon N, Wallenstein S, August GI, et al. Communication about chronic critical illness. *Arch Intern Med.* 2007 Dec 10;167(22):2509–15.
88. Thirugnanam S, Herridge MS. Physical consequences of critical illness. *Br J Hosp Med (Lond).* 2007 Sep;68(9):477–81.
89. Daly BJ, Douglas SL, Gordon NH, Kelley CG, O’Toole E, Montenegro H, et al. Composite outcomes of chronically critically ill patients 4 months after hospital discharge. *Am J Crit Care.* 2009 Sep;18(5):456–64; quiz 465.
90. Nelson JE, Meier DE, Litke A, Natale DA, Siegel RE, Morrison RS. The symptom burden of chronic critical illness. *Crit Care Med.* 2004 Jul;32(7):1527–34.
91. Carson SS, Cox CE, Holmes GM, Howard A, Carey TS. The changing epidemiology of mechanical ventilation: a population-based study. *J Intensive Care Med.* 21(3):173–82.
92. Carson SS, Garrett J, Hanson LC, Lanier J, Govert J, Brake MC, et al. A prognostic model for one-year mortality in patients requiring prolonged mechanical ventilation. *Crit Care Med.* 2008 Jul;36(7):2061–9.
93. 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.

94. 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.
95. 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.
96. Persistent inflammatory, immunosuppressed, catabolic syndrome (PICS): A new phenotype of multiple organ failure. *J Adv Nutr Hum Metab*. 2015 May;
97. Horiguchi H, Loftus TJ, Hawkins RB, Raymond SL, Stortz JA, Hollen MK, et al. Innate Immunity in the Persistent Inflammation, Immunosuppression, and Catabolism Syndrome and Its Implications for Therapy. *Front Immunol*. 2018 Apr 4;9.
98. Rawal G, Yadav S, Kumar R. Post-intensive care syndrome: an overview. *J Transl Intern Med*. 2017 Jun;5(2):90–2.
99. Gryglewski RJ, Chłopicki S, Uracz W, Marcinkiewicz E. Significance of endothelial prostacyclin and nitric oxide in peripheral and pulmonary circulation. *Med Sci Monit*. 7(1):1–16.
100. 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.
101. 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.
102. 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.
103. Vincent J-L, Ince C, Pickkers P. Endothelial dysfunction: a therapeutic target in bacterial sepsis? *Expert Opin Ther Targets*. 2021 Oct 22;1–16.
104. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007;9:121–67.
105. 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.

106. Rubio-Gayosso I, Platts SH, Duling BR. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Jun;290(6):H2247-56.
107. Schmidt EP, Yang Y, Janssen WJ, Gandjeva A, Perez MJ, Barthel L, et al. The pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis. *Nat Med*. 2012 Aug;18(8):1217–23.
108. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Mooij HL, van Lieshout MHP, Hayden A, Levi M, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibition protects against endotoxin-induced endothelial glycocalyx perturbation. *Atherosclerosis*. 2009 Jan;202(1):296–303.
109. 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.
110. Cepinskas G, Wilson JX. Inflammatory response in microvascular endothelium in sepsis: role of oxidants. *J Clin Biochem Nutr*. 2008 May;42(3):175–84.
111. Martinez-Mier G, Toledo-Pereyra LH, Ward PA. Adhesion molecules in liver ischemia and reperfusion. *J Surg Res*. 2000 Dec;94(2):185–94.
112. Mestas J, Ley K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2008 Aug;18(6):228–32.
113. Zhong L, Simard MJ, Huot J. Endothelial microRNAs regulating the NF- $\kappa$ B pathway and cell adhesion molecules during inflammation. *FASEB J*. 2018;32(8):4070–84.
114. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013 Mar;13(3):159–75.
115. Marchick MR, Kline JA, Jones AE. The significance of non-sustained hypotension in emergency department patients with sepsis. *Intensive Care Med*. 2009 Jul;35(7):1261–4.
116. Moncada S, Vane JR. The role of prostacyclin in vascular tissue. *Fed Proc*. 1979 Jan;38(1):66–71.
117. Kirkebøen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1999 Mar;43(3):275–88.
118. Lush CW, Cepinskas G, Sibbald WJ, Kviety PR. Endothelial E- and P-selectin expression in iNOS- deficient mice exposed to polymicrobial sepsis. *Am J Physiol Gastrointest Liver*



- Physiol. 2001 Feb;280(2):G291-7.
119. Garton KJ. Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. *J Leukoc Biol.* 2006 Mar;79(6):1105–16.
  120. 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.
  121. 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.
  122. 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.
  123. 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.
  124. 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.
  125. 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.
  126. 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.
  127. Cardona-Monzonís A, Beltrán-García J, Ibañez-Cabellos JS, Pérez-Machado G, Malkani K, Sanchis-Gomar F, et al. Epigenetic biomarkers in cardiovascular disease. *J Lab Precis Med.* 2018 Mar;3:24–24.

128. Beltran-Garcia J, Ospa-Verdegál R, García-Giménez JL, Pallardó F V. Oxidative stress leads to severe phenotypes in sepsis through activation of NLRP3-pyroptosis. *Redox Exp Med.* 2022 Jul;
129. Bernstein BE, Stamatoyannopoulos JA, Costello JF, Ren B, Milosavljevic A, Meissner A, et al. The NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium. *Nat Biotechnol.* 2010 Oct;28(10):1045–8.
130. García-Giménez JL, Beltrán-García J, Ospa-Verdegál R, Pallardó F V., Ushijima T, Tollefsbol TO. Perspectives and future directions of translational epigenetics in personalized and precision medicine. In: *Epigenetics in Precision Medicine.* Elsevier; 2022. p. 1–18.
131. García-Giménez JL, Beltrán-García J, Romá-Mateo C, Seco-Cervera M, Pérez-Machado G, Mena-Mollá S. Epigenetic biomarkers for disease diagnosis. In: *Prognostic Epigenetics.* Elsevier; 2019. p. 21–44.
132. Stunnenberg HG, Hirst M, Abrignani S, Adams D, de Almeida M, Altucci L, et al. The International Human Epigenome Consortium: A Blueprint for Scientific Collaboration and Discovery. *Cell.* 2016 Nov;167(5):1145–9.
133. Eckhardt F, Beck S, Gut IG, Berlin K. Future potential of the Human Epigenome Project. *Expert Rev Mol Diagn.* 2004 Sep;4(5):609–18.
134. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science* (80- ). 2004 Oct;306(5696):636–40.
135. Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, Heravi-Moussavi A, et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature.* 2015 Feb;518(7539):317–30.
136. Dekker J, Belmont AS, Guttman M, Leshyk VO, Lis JT, Lomvardas S, et al. The 4D nucleome project. *Nature.* 2017 Sep;549(7671):219–26.
137. HIRSCH JG. Bactericidal action of histone. *J Exp Med.* 1958 Dec 1;108(6):925–44.
138. Hoeksema M, van Eijk M, Haagsman HP, Hartshorn KL. Histones as mediators of host defense, inflammation and thrombosis. *Future Microbiol.* 2016;11(3):441–53.
139. 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.
140. Chen R, Kang R, Fan X-G, Tang D. Release and activity of histone in diseases. *Cell Death Dis*. 2014;5:1–9.
141. Carson WF, Kunkel SL. Regulation of cellular immune responses in sepsis by histone modifications. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2017;106(1):191–225.
142. Silk E, Zhao H, Weng H, Ma D. The role of extracellular histone in organ injury. *Cell Death Dis*. 2017;8(5):2812.
143. Li Y, Wan D, Luo X, Song T, Wang Y, Yu Q, et al. Circulating Histones in Sepsis: Potential Outcome Predictors and Therapeutic Targets. *Front Immunol*. 2021 Mar 24;12:1–13.
144. Baka Z, György B, Géher P, Buzás EI, Falus A, Nagy G. Citrullination under physiological and pathological conditions. *Joint Bone Spine*. 2012 Oct;79(5):431–6.
145. Neeli I, Radic M. Knotting the NETs: Analyzing histone modifications in neutrophil extracellular traps. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(2):115.
146. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Wardini AB, Pinto-da-Silva LH, Saraiva EM. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. *J Parasitol Res*. 2012;2012:1–11.
147. Mao L, Mostafa R, Ibili E, Fert-Bober J. Role of protein deimination in cardiovascular diseases: potential new avenues for diagnostic and prognostic biomarkers. *Expert Rev Proteomics*. 2021 Dec 2;18(12):1059–71.
148. Yipp BG, Kubes P. NETosis : how vital is it ? *Blood*. 2013;122(16):2784–95.
149. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) as markers of disease severity in COVID-19. *medRxiv Prepr Serv Heal Sci*. 2020 Apr 14;1:1–23.
150. Chaput C, Zychlinsky A. Sepsis: the dark side of histones. *Nat Med*. 2009 Nov;15(11):1245–6.
151. Wartha F, Henriques-Normark B. ETosis: A Novel Cell Death Pathway. *Sci Signal*. 2008 May 27;1(21).

152. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Aug;5(8):577–82.
153. Sollberger G. Approaching Neutrophil Pyroptosis. *J Mol Biol*. 2022 Feb;434(4):167335.
154. Chen KW, Groß CJ, Sotomayor FV, Stacey KJ, Tschopp J, Sweet MJ, et al. The Neutrophil NLR4 Inflammasome Selectively Promotes IL-1 $\beta$  Maturation without Pyroptosis during Acute Salmonella Challenge. *Cell Rep*. 2014 Jul;8(2):570–82.
155. Robinson N, Ganesan R, Hegedűs C, Kovács K, Kufer TA, Virág L. Programmed necrotic cell death of macrophages: Focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos. *Redox Biol*. 2019 Sep;26:101239.
156. Chen L, Zhao Y, Lai D, Zhang P, Yang Y, Li Y, et al. Neutrophil extracellular traps promote macrophage pyroptosis in sepsis. *Cell Death Dis*. 2018 Jun 22;9(6):597.
157. Boettcher S, Gerosa RC, Radpour R, Bauer J, Ampenberger F, Heikenwalder M, et al. Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. *Blood*. 2014 Aug 28;124(9):1393–403.
158. von Köckritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*. 2008 Mar 15;111(6):3070–80.
159. Zhang X, Bolt M, Guertin MJ, Chen W, Zhang S, Cherrington BD, et al. Peptidylarginine deiminase 2-catalyzed histone H3 arginine 26 citrullination facilitates estrogen receptor target gene activation. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(33):13331–6.
160. Cherrington BD, Zhang X, McElwee JL, Morency E, Anguish LJ, Coonrod SA. Potential role for PAD2 in gene regulation in breast cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(7):1–12.
161. Hagiwara T, Nakashima K, Hirano H, Senshu T, Yamada M. Deimination of Arginine Residues in Nucleophosmin/B23 and Histones in HL-60 Granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jan;290(3):979–83.
162. Nakashima K, Hagiwara T, Yamada M. Nuclear Localization of Peptidylarginine Deiminase V and Histone Deimination in Granulocytes. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Dec 20;277(51):49562–8. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M208795200>

163. Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, et al. Histone Deimination Antagonizes Arginine Methylation. *Cell*. 2004 Sep;118(5):545–53.
164. Wang Y. Human PAD4 Regulates Histone Arginine Methylation Levels via Demethylation. *Science* (80- ). 2004 Oct 8;306(5694):279–83.
165. Christophorou MA, Castelo-Branco G, Halley-Stott RP, Oliveira CS, Loos R, Radziszewska A, et al. Citrullination regulates pluripotency and histone H1 binding to chromatin. *Nature*. 2014 Mar 26;507(7490):104–8.
166. 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.
167. 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.
168. 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.
169. Brentville VA, Vankemmelbeke M, Metheringham RL, Durrant LG. Post-translational modifications such as citrullination are excellent targets for cancer therapy. *Semin Immunol*. 2020 Feb;47:101393.
170. 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.
171. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*. 2020 Apr 24;1:1–11.
172. Ginsburg I, Koren E, Varani J, Kohen R. Nuclear histones: major virulence factors or just additional early sepsis markers? A comment. *Inflammopharmacology*. 2016 Oct 9;24(5):287–9.
173. Alexander M, O’Connell RM. Noncoding RNAs and chronic inflammation: Micro-managing the fire within. *BioEssays*. 2015 Sep;37(9):1005–15.
174. Chew CL, Conos SA, Unal B, Tergaonkar V. Noncoding RNAs: Master Regulators of

- Inflammatory Signaling. *Trends Mol Med*. 2018 Jan;24(1):66–84.
175. Kung JTY, Colognori D, Lee JT. Long Noncoding RNAs: Past, Present, and Future. *Genetics*. 2013 Mar 1;193(3):651–69.
176. Fang Y, Fullwood MJ. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2016 Feb;14(1):42–54.
177. Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer. *RNA Biol*. 2012 Jun 27;9(6):703–19.
178. Brunner AL, Beck AH, Edris B, Sweeney RT, Zhu SX, Li R, et al. Transcriptional profiling of long non-coding RNAs and novel transcribed regions across a diverse panel of archived human cancers. *Genome Biol*. 2012;13(8):R75.
179. Lu F, Hong Y, Liu L, Wei N, Lin Y, He J, et al. Long noncoding RNAs: A potential target in sepsis-induced cellular disorder. *Exp Cell Res*. 2021 Sep;406(2):112756.
180. Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nat Biotechnol*. 2014 May;32(5):453–561.
181. Patop IL, Wüst S, Kadener S. Past, present, and future of circ RNA s. *EMBO J*. 2019 Aug 15;38(16).
182. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*. 2013 Mar 21;495(7441):333–8.
183. Salzman J. Circular RNA Expression: Its Potential Regulation and Function. *Trends Genet*. 2016 May;32(5):309–16.
184. Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA [Internet]*. 2013 Feb [cited 2021 May 9];19(2):141–57. Available from: [/pmc/articles/PMC3543092/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/234092/)
185. Beltrán-García J, Osa-Verdegal R, Nacher-Sendra E, Pallardó F V., García-Giménez JL. Circular RNAs in Sepsis: Biogenesis, Function, and Clinical Significance. *Cells*. 2020 Jun 25;9(6):1544.
186. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004 Jul;5(7):522–31.

187. Shah MY, Calin GA. The mix of two worlds: non-coding RNAs and hormones. *Nucleic Acid Ther.* 2013;23(1):2–8.
188. Roderburg C, Benz F, Vargas-Cardenas D, Koch A, Janssen J, Vucur M, et al. Elevated miR-122 serum levels are an independent marker of liver injury in inflammatory diseases. *Liver Int.* 2015 Apr;35(4):1172–84.
189. Boomer JS, To K, Chang KC, Ii SDJ, Kreisel D, Krupnock AS, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *Jama.* 2011;306(23):2594–605.
190. Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Tudor S, Veronese A, Ferracin M, et al. MicroRNA Fingerprints Identify miR-150 as a Plasma Prognostic Marker in Patients with Sepsis. Gold JA, editor. *PLoS One.* 2009 Oct 12;4(10):1–19.
191. Tudor S, Giza DE, Lin HY, Fabris L, Yoshiaki K, D’Abundo L, et al. Cellular and Kaposi’s sarcoma-associated herpes virus microRNAs in sepsis and surgical trauma. *Cell Death Dis.* 2014 Dec 4;5(12):e1559.
192. Ma Y, Vilanova D, Atalar K, Delfour O, Edgeworth J, Ostermann M, et al. Genome-Wide Sequencing of cellular microRNAs identifies a combinatorial expression signature diagnostic of sepsis. Eberl M, editor. *PLoS One.* 2013 Oct 16;8(10):e75918.
193. Giza DE, Fuentes-Mattei E, Bullock MD, Tudor S, Goblirsch MJ, Fabbri M, et al. Cellular and viral microRNAs in sepsis: Mechanisms of action and clinical applications. *Cell Death Differ.* 2016;23(12):1906–18.
194. Caserta S, Kern F, Cohen J, Drage S, Newbury SF, Llewelyn MJ. Circulating plasma microRNAs can differentiate human sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). *Sci Rep.* 2016;6(15):1–13.
195. Wang J, Yu M, Yu G, Bian J, Deng X, Wan X, et al. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Mar 26;394(1):184–8.
196. Wu Y, Li C, He Y, Li Q, Wang G, Wen P, et al. Relationship between expression of microRNA and inflammatory cytokines plasma level in pediatric patients with sepsis. *Chinese J Pediatr.* 2014 Jan;52(1):28–33.
197. Wang H, Zhang P, Chen W, Feng D, Jia Y, Xie LX. Evidence for serum miR-15a and miR-16 levels as biomarkers that distinguish sepsis from systemic inflammatory response

- syndrome in human subjects. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50(8):1423–8.
198. Wang X, Wang X, Liu X, Wang X, Xu J, Hou S, et al. miR-15a/16 are upregulated in the serum of neonatal sepsis patients and inhibit the LPS-induced inflammatory pathway. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(4):5683–90.
199. Liu X-F, Wang R-Q, Hu B, Luo M-C, Zeng Q-M, Zhou H, et al. MiR-15a contributes abnormal immune response in myasthenia gravis by targeting CXCL10. *Clin Immunol*. 2016 Mar;164:106–13.
200. Wang HJ, Zhang PJ, Chen WJ, Feng D, Jia YH, Xie LX. Four serum microRNAs identified as diagnostic biomarkers of sepsis. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012;73(4):850–4.
201. Rahmel T, Schäfer ST, Frey UH, Adamzik M, Peters J. Increased circulating microRNA-122 is a biomarker for discrimination and risk stratification in patients defined by sepsis-3 criteria. *PLoS One*. 2018;13(5):e0197637.
202. Yoshikawa T, Takata A, Otsuka M, Kishikawa T, Kojima K, Yoshida H, et al. Silencing of microRNA-122 enhances interferon- $\alpha$  signaling in the liver through regulating SOCS3 promoter methylation. *Sci Rep*. 2012;2:1–10.
203. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009 Jan;10(1):57–63.
204. Pérez-Rodríguez D, López-Fernández H, Agís-Balboa RC. Application of miRNA-seq in neuropsychiatry: A methodological perspective. *Comput Biol Med*. 2021 Aug;135:104603.
205. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013 Jan;38(1):23–38.
206. Teitell M, Richardson B. Dna methylation in the immune system. *Clin Immunol*. 2003 Oct;109(1):2–5.
207. 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.
208. Busslinger M, Tarakhovsky A. Epigenetic control of immunity. *Cold Spring Harb*



- Perspect Biol. 2014 Jun 2;6(6):373–80.
209. Bierne H, Hamon M, Cossart P. Epigenetics and Bacterial Infections. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Dec;2(12):a010272–a010272.
210. 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.
211. 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.
212. 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.
213. 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.
214. 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.
215. Beltrán-García J, Osa-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.
216. Sarraf SA, Stancheva I. RETRACTED: Methyl-CpG Binding Protein MBD1 Couples Histone H3 Methylation at Lysine 9 by SETDB1 to DNA Replication and Chromatin Assembly. *Mol Cell.* 2004 Aug;15(4):595–605.
217. 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.
218. Zemmour H, Planer D, Magenheimer 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.
219. 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.
220. Lorente-Pozo S, Navarrete P, Garzón MJ, Lara-Cantón I, Beltrán-García J, Ospa-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.
221. 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.
222. 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.
223. 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.
224. 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.
225. 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.
226. 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.
227. 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.

228. 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.
229. 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.
230. 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.
231. 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.
232. 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.
233. 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.
234. 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.
235. 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.
236. 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.
237. 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.
238. Sido JM, Yang X, Nagarkatti PS, Nagarkatti M.  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol-mediated epigenetic modifications elicit myeloid-derived suppressor cell activation via

- STAT3/S100A8. *J Leukoc Biol.* 2015 Apr;97(4):677–88.
239. 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/>
240. Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc.* 2007;2:1445–57.
241. Noble JE, Bailey MJA. Chapter 8 Quantitation of Protein. In 2009. p. 73–95.
242. 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.
243. Yu G. Statistical analysis and visualization of functional profiles for genes and gene clusters [Internet]. 2022. Available from: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/clusterProfiler/inst/doc/clusterProfiler.html>
244. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci.* 2005 Oct 25;102(43):15545–50.
245. Maksimovic J, Phipson B, Oshlack A. A cross-package Bioconductor workflow for analysing methylation array data. *F1000Research.* 2016;5:1281.
246. 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.
247. Fortin J-P, Triche TJ, Hansen KD. Preprocessing, normalization and integration of the Illumina HumanMethylationEPIC array with minfi. *Bioinformatics.* 2016 Dec;btw691.
248. 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.
249. 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.
250. 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.
251. Zhu D, Zhang Y, Wang S. Histone citrullination: a new target for tumors. *Mol Cancer*. 2021 Dec 11;20(1):90.
252. Hagiwara T, Hidaka Y, Yamada M. Deimination of Histone H2A and H4 at Arginine 3 in HL-60 Granulocytes. *Biochemistry*. 2005 Apr 1;44(15):5827–34.
253. Beltrán-García J, Osa-Verdegal R, Pérez-Cremades D, Novella S, Hermenegildo C, Pallardó F V, et al. Extracellular Histones Activate Endothelial NLRP3 Inflammasome and are Associated with a Severe Sepsis Phenotype. *J Inflamm Res*. 2022 Jul;Volume 15:4217–38.
254. Clancy KW, Russell A-M, Subramanian V, Nguyen H, Qian Y, Campbell RM, et al. Citrullination/Methylation Crosstalk on Histone H3 Regulates ER-Target Gene Transcription. *ACS Chem Biol*. 2017 Jun 16;12(6):1691–702.
255. Foote CA, Soares RN, Ramirez-Perez FI, Ghiarone T, Aroor A, Manrique-Acevedo C, et al. Endothelial Glycocalyx. In: *Comprehensive Physiology*. Wiley; 2022. p. 3781–811.
256. Walter FR, Santa-Maria AR, Mészáros M, Veszélka S, Dér A, Deli MA. Surface charge, glycocalyx, and blood-brain barrier function. *Tissue Barriers*. 2021 Jul 3;9(3).
257. Radic M. NETosis and ETosis: Incompletely Understood Types of Granulocyte Death and their Proposed Adaptive Benefits and Costs. In: *Apoptosis and Beyond*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. - Hoboken, NJ, USA; 2018. p. 511–34.
258. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1–13.
259. Levine AB, Punihale D, Levine TB. Characterization of the Role of Nitric Oxide and Its Clinical Applications. *Cardiology*. 2012;122(1):55–68.
260. Kroll J, Waltenberger J. VEGF-A Induces Expression of eNOS and iNOS in Endothelial Cells via VEGF Receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Nov;252(3):743–6.

261. Qi J, Wu Q, Cheng Q, Chen X, Zhu M, Miao C. High Glucose Induces Endothelial COX2 and iNOS Expression via Inhibition of Monomethyltransferase SETD8 Expression. *J Diabetes Res.* 2020 Feb 24;2020:1–10.
262. Cristina de Assis M, Cristina Plotkowski M, Fierro IM, Barja-Fidalgo C, de Freitas MS. Expression of inducible nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells during primary culture. *Nitric Oxide.* 2002 Dec;7(4):254–61.
263. Schulz E, Gori T, Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res.* 2011 Jun 21;34(6):665–73.
264. Takatani Y, Ono K, Suzuki H, Inaba M, Sawada M, Matsuda N. Inducible nitric oxide synthase during the late phase of sepsis is associated with hypothermia and immune cell migration. *Lab Investig.* 2018 May;98(5):629–39.
265. Konukoglu D, Uzun H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. In 2016. p. 511–40.
266. Pertiwi KR, de Boer OJ, Gabriels PAM, van der Wal AC. Etosis, rather than apoptosis or cell proliferation, typifies thrombus progression – An immunohistochemical study of coronary aspirates. *IJC Hear Vasc.* 2020 Feb;26:100439.
267. Tyagi A, Kamal MA, Poddar NK. Integrated Pathways of COX-2 and mTOR: Roles in Cell Sensing and Alzheimer’s Disease. *Front Neurosci.* 2020 Jul 9;14.
268. Seibert K, Masferrer J, Zhang Y, Gregory S, Olson G, Häuser S, et al. Mediation of Inflammation by Cyclooxygenase-2. In: *Novel Molecular Approaches to Anti-Inflammatory Therapy.* Basel: Birkhäuser Basel; 1995. p. 41–50.
269. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Sep 4;6(10):a016295.
270. Dayang E-Z, Plantinga J, ter Ellen B, van Meurs M, Molema G, Moser J. Identification of LPS-Activated Endothelial Subpopulations With Distinct Inflammatory Phenotypes and Regulatory Signaling Mechanisms. *Front Immunol.* 2019 May 24;10:1–12.
271. 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.
272. Boomer JS, Green JM, Hotchkiss RS. The changing immune system in sepsis. *Virulence.* 2014 Jan 25;5(1):45–56.

273. Brady J, Horie S, Laffey JG. Role of the adaptive immune response in sepsis. *Intensive Care Med Exp*. 2020 Dec 18;8(S1):20.
274. Shankar-Hari M, Rubenfeld GD. Understanding Long-Term Outcomes Following Sepsis: Implications and Challenges. *Curr Infect Dis Rep*. 2016 Nov 6;18(11):37.
275. Courtright KR, Jordan L, Murtaugh CM, Barrón Y, Deb P, Moore S, et al. Risk Factors for Long-term Mortality and Patterns of End-of-Life Care Among Medicare Sepsis Survivors Discharged to Home Health Care. *JAMA Netw Open*. 2020 Feb 26;3(2):e200038.
276. Vught LA, Uhel F, Ding C, van't Veer C, Scicluna BP, Peters-Sengers H, et al. Consumptive coagulopathy is associated with a disturbed host response in patients with sepsis. *J Thromb Haemost*. 2021 Apr 17;19(4):1049–63.
277. Yokoyama Y, Ito T, Yasuda T, Furubeppu H, Kamikokuryo C, Yamada S, et al. Circulating histone H3 levels in septic patients are associated with coagulopathy, multiple organ failure, and death: a single-center observational study. *Thromb J*. 2019 Dec 14;17(1):1.
278. Semeraro N, Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M. Sepsis-associated disseminated intravascular coagulation and thromboembolic disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2010;2(3):201–24.
279. Delabranche X, Quenot J-P, Lavigne T, Mercier E, François B, Severac F, et al. Early Detection of Disseminated Intravascular Coagulation During Septic Shock. *Crit Care Med*. 2016 Oct;44(10):e930–9.
280. Mao J-Y, Zhang J-H, Cheng W, Chen J-W, Cui N. Effects of Neutrophil Extracellular Traps in Patients With Septic Coagulopathy and Their Interaction With Autophagy. *Front Immunol*. 2021;12:757041.
281. Jackson Chornenki NL, Dwivedi DJ, Kwong AC, Zamir N, Fox-Robichaud AE, Liaw PC, et al. Identification of hemostatic markers that define the pre-DIC state: A multi-center observational study. *J Thromb Haemost*. 2020 Oct;18(10):2524–31.
282. Ekane ML, Otto GP, Sossdorf M, Sponholz C, Boehringer M, Loesche W, et al. Impact of plasma histones in human sepsis and their contribution to cellular injury and inflammation. *Crit Care*. 2014;18(5):1–9.

283. Ling S, Xu J-W. NETosis as a Pathogenic Factor for Heart Failure. Daiber A, editor. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Feb 23;2021:1–24.
284. de Bont CM, Boelens WC, Pruijn GJM. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cell Mol Immunol*. 2019 Jan 23;16(1):19–27.
285. Borissoff JI, Joosen IA, Versteyleen MO, Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Elevated Levels of Circulating DNA and Chromatin Are Independently Associated With Severe Coronary Atherosclerosis and a Prothrombotic State. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Aug;33(8):2032–40.
286. Varjú I, Sorvillo N, Cherpokova D, Farkas ÁZ, Farkas VJ, Komorowicz E, et al. Citrullinated Fibrinogen Renders Clots Mechanically Less Stable, but Lysis-Resistant. *Circ Res*. 2021 Jul 9;129(2):342–4.
287. Knight JS, Luo W, O'Dell AA, Yalavarthi S, Zhao W, Subramanian V, et al. Peptidylarginine Deiminase Inhibition Reduces Vascular Damage and Modulates Innate Immune Responses in Murine Models of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2014 Mar 14;114(6):947–56.
288. Martinod K, Witsch T, Erpenbeck L, Savchenko A, Hayashi H, Cherpokova D, et al. Peptidylarginine deiminase 4 promotes age-related organ fibrosis. *J Exp Med*. 2017 Feb 1;214(2):439–58.
289. Tilwala R, Nemmara V V., Reyes AC, Sorvillo N, Salinger AJ, Cherpokova D, et al. The role of SERPIN citrullination in thrombosis. *Cell Chem Biol*. 2021 Dec;28(12):1728-1739.e5.
290. Noubouossie DF, Whelihan MF, Yu Y-B, Sparkenbaugh E, Pawlinski R, Monroe DM, et al. In vitro activation of coagulation by human neutrophil DNA and histone proteins but not neutrophil extracellular traps. *Blood*. 2017 Feb 23;129(8):1021–9.
291. Schulz C, Massberg S. Demystifying the prothrombotic role of NETs. *Blood*. 2017 Feb 23;129(8):925–6.
292. Delano MJ, Ward PA. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. Vol. 274, *Immunological Reviews*. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 330–53.
293. Wang H, Zhang C, Zhang C, Wang Y, Zhai K, Tong Z. MicroRNA-122-5p regulates



- coagulation and inflammation through MASP1 and HO-1 genes. *Infect Genet Evol.* 2022 Jun;100:105268.
294. Martucci G, Arcadipane A, Tuzzolino F, Occhipinti G, Panarello G, Carcione C, et al. Circulating miRNAs as Promising Biomarkers to Evaluate ECMO Treatment Responses in ARDS Patients. *Membranes (Basel)*. 2021 Jul 22;11(8):551.
295. Fernández-Pato A, Virseda-Berdices A, Resino S, Ryan P, Martínez-González O, Pérez-García F, et al. Plasma miRNA profile at COVID-19 onset predicts severity status and mortality. *Emerg Microbes Infect.* 2022 Dec 31;11(1):676–88.
296. Lipowsky HH. The Endothelial Glycocalyx as a Barrier to Leukocyte Adhesion and Its Mediation by Extracellular Proteases. *Ann Biomed Eng.* 2012 Apr 8;40(4):840–8.
297. Fatmi A, Saadi W, Beltrán-García J, García-Giménez JL, Pallardó F V. The Endothelial Glycocalyx and Neonatal Sepsis. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 26;24(1):364.
298. Zhang Y, Ning B. Signaling pathways and intervention therapies in sepsis. *Signal Transduct Target Ther.* 2021 Dec;6(1):407.
299. Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cell Mol Immunol.* 2011 Sep;8(5):388–403.
300. Szilágyi B, Fejes Z, Pócsi M, Kappelmayer J, Béla Nagy J. Role of sepsis modulated circulating microRNAs. *EJIFCC.* 2019;30(2):128–45.
301. Chen X-M, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF. A Cellular Micro-RNA, let-7i, Regulates Toll-like Receptor 4 Expression and Contributes to Cholangiocyte Immune Responses against *Cryptosporidium parvum* Infection. *J Biol Chem.* 2007 Sep;282(39):28929–38.
302. Bayraktar R, Bertilaccio MTS, Calin GA. The Interaction Between Two Worlds: MicroRNAs and Toll-Like Receptors. *Front Immunol.* 2019 May 14;10.
303. Chen QX, Ye L, Jin YH, Zhang N, Lou TZ, Qiu ZL, et al. Circulating nucleosomes as a predictor of sepsis and organ dysfunction in critically ill patients. *Int J Infect Dis.* 2012;16(7):558–64.
304. Zeerleder S, Zwart B, Wuillemin WA, Aarden LA, Groeneveld ABJ, Caliezi C, et al. Elevated nucleosome levels in systemic inflammation and sepsis. *Crit Care Med.*

- 2003;31(7):1947–51.
305. Song W, Zhang T, Yang N, Zhang T, Wen R, Liu C. Inhibition of micro RNA miR-122-5p prevents lipopolysaccharide-induced myocardial injury by inhibiting oxidative stress, inflammation and apoptosis via targeting GIT1. *Bioengineered*. 2021 Jan 1;12(1):1902–15.
  306. Antonakos N, Gilbert C, Théroutte C, Schrijver IT, Roger T. Modes of action and diagnostic value of miRNAs in sepsis. *Front Immunol*. 2022 Aug 5;13.
  307. Wang H, Yu B, Deng J, Jin Y, Xie L. Serum miR-122 correlates with short-term mortality in sepsis patients. *Crit Care*. 2014;18(6):704.
  308. Mankowski RT, Anton SD, Ghita GL, Brumback B, Darden DB, Bihorac A, et al. Older Adults Demonstrate Biomarker Evidence of the Persistent Inflammation, Immunosuppression, and Catabolism Syndrome (PICS) After Sepsis. Newman AB, editor. *Journals Gerontol Ser A*. 2022 Jan 7;77(1):188–96.
  309. Meidert AS, Buschmann D, Brandes F, Kanev K, Billaud J-N, Borrmann M, et al. Molecular RNA Correlates of the SOFA Score in Patients with Sepsis. *Diagnostics*. 2021 Sep 9;11(9):1649.
  310. Gordon S, Martinez FO. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity*. 2010 May;32(5):593–604.
  311. Sun F, Yuan W, Wu H, Chen G, Sun Y, Yuan L, et al. LncRNA KCNQ1OT1 attenuates sepsis-induced myocardial injury via regulating miR-192-5p/XIAP axis. *Exp Biol Med*. 2020 Apr;245(7):620–30.
  312. Yang Q, Liu D, Long Y, Liu H, Chai W, Wang X-T. Acute renal failure during sepsis: Potential role of cell cycle regulation. *J Infect*. 2009 Jun;58(6):459–64.
  313. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the Autophagy–Inflammation–Cell Death Axis in Organismal Aging. *Science (80- )*. 2011 Aug 26;333(6046):1109–12.
  314. Mitra K, Wunder C, Roysam B, Lin G, Lippincott-Schwartz J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1–S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci*. 2009 Jul 21;106(29):11960–5.
  315. Pool R, Gomez H, Kellum JA. Mechanisms of Organ Dysfunction in Sepsis. *Crit Care*

- Clin. 2018 Jan;34(1):63–80.
316. Pinheiro da Silva F, Machado MCC. Septic Shock and the Aging Process: A Molecular Comparison. *Front Immunol.* 2017 Oct 25;8.
317. Freund A, Orjalo A V., Desprez P-Y, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med.* 2010 May;16(5):238–46.
318. Prud'homme GJ. Pathobiology of transforming growth factor  $\beta$  in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab Investig.* 2007 Nov 27;87(11):1077–91.
319. Ahmad S, Choudhry MA, Shankar R, Sayeed MM. Transforming growth factor- $\beta$  negatively modulates T-cell responses in sepsis. *FEBS Lett.* 1997 Jan 27;402(2–3):213–8.
320. Marques LM. Sepsis Induced by *Staphylococcus aureus*: Participation of Biomarkers in a Murine Model. *Med Sci Monit.* 2015;21:345–55.
321. Sikes PJ, Zhao P, Maass DL, White J, Horton JW. Sodium/hydrogen exchange activity in sepsis and in sepsis complicated by previous injury:  $^{31}\text{P}$  and  $^{23}\text{Na}$  NMR study\*. *Crit Care Med.* 2005 Mar;33(3):605–15.
322. Patel Y, Joseph J. Sodium Intake and Heart Failure. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 13;21(24).
323. De Freitas G, Gudur A, Vela-Ortiz M, Jodelka J, Livert D, Krishnamurthy M. Where there is sodium there may be sepsis. *J community Hosp Intern Med Perspect.* 2019;9(4):296–9.
324. Quinn JW, Sewell K, Simmons DE. Recommendations for active correction of hypernatremia in volume-resuscitated shock or sepsis patients should be taken with a grain of salt: A systematic review. *SAGE Open Med.* 2018 Jan 1;6:205031211876204.
325. De Freitas G, Gudur A, Vela-Ortiz M, Jodelka J, Livert D, Krishnamurthy M. Where there is sodium there may be sepsis. *J Community Hosp Intern Med Perspect.* 2019 Jul 4;9(4):296–9.
326. Schatz V, Neubert P, Schröder A, Binger K, Gebhard M, Müller DN, et al. Elementary immunology:  $\text{Na}^+$  as a regulator of immunity. *Pediatr Nephrol.* 2017 Feb 26;32(2):201–10.
327. Rugg C, Ströhle M, Treml B, Bachler M, Schmid S, Kreutziger J. ICU-Acquired

- Hypernatremia Is Associated with Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome. *J Clin Med*. 2020 Sep 18;9(9):3017.
328. Webster NR, Nunn JF. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br J Anaesth*. 1988 Jan;60(1):98–108.
329. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*. 2002 Jan 1;82(1):47–95.
330. Mantzaris K, Tsolaki V, Zakynthinos E. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1–10.
331. Victor V, Esplugues J, Hernandez-Mijares A, Rocha M. Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis: A Potential Therapy with Mitochondria-Targeted Antioxidants. *Infect Disord - Drug Targets*. 2009 Aug 1;9(4):376–89.
332. Zhou M, Aziz M, Ochani M, Wang P. Correction of immunosuppression in aged septic rats by human ghrelin and growth hormone through the vagus nerve-dependent inhibition of TGF- $\beta$  production. *Mol Med*. 2020 Dec 16;26(1):71.
333. Bae J-S, Lee W, Nam J-O, Kim J-E, Kim S-W, Kim I-S. Transforming Growth Factor  $\beta$ -induced Protein Promotes Severe Vascular Inflammatory Responses. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Apr 1;189(7):779–86.
334. Zhang Z, Luo H, Li C, Liang Z. Evidence for the circulating microRNA hsa-let-7d-3p as a potential new biomarker for sepsis in human subjects. *Eur J Med Res*. 2022 Dec 30;27(1):137.
335. Zhang B, Yu L, Sheng Y. Clinical value and role of microRNA-29c-3p in sepsis-induced inflammation and cardiac dysfunction. *Eur J Med Res*. 2021 Dec 10;26(1):90.
336. Beltrán-García J, Osa-Verdegal R, Pallardó F V., Ferreres J, Rodríguez M, Mulet S, et al. Oxidative Stress and Inflammation in COVID-19-Associated Sepsis: The Potential Role of Anti-Oxidant Therapy in Avoiding Disease Progression. *Antioxidants*. 2020 Sep 29;9(10):936.
337. Tacke F, Roderburg C, Benz F, Cardenas DV, Luedde M, Hippe HJ, et al. Levels of circulating mir-133a are elevated in sepsis and predict mortality in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2014;42(5):1096–104.

338. Chen L, Xie W, Wang L, Zhang X, Liu E, Kou Q. MiRNA-133a aggravates inflammatory responses in sepsis by targeting SIRT1. *Int Immunopharmacol*. 2020 Nov;88:106848.
339. Liang G, Wu Y, Guan Y, Dong Y, Jiang L, Mao G, et al. The correlations between the serum expression of miR-206 and the severity and prognosis of sepsis. *Ann Palliat Med*. 2020 Sep;9(5):3222–34.
340. Zhao D, Li C, Yan H, Li T, Qian M, Zheng N, et al. Cardiomyocyte Derived miR-328 Promotes Cardiac Fibrosis by Paracrinely Regulating Adjacent Fibroblasts. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1555–65.
341. Sun B, Luan C, Guo L, Zhang B, Liu Y. Low expression of microRNA-328 can predict sepsis and alleviate sepsis-induced cardiac dysfunction and inflammatory response. *Brazilian J Med Biol Res*. 2020 Aug;53(8).
342. Du W, Liang H, Gao X, Li X, Zhang Y, Pan Z, et al. MicroRNA-328, a Potential Anti-Fibrotic Target in Cardiac Interstitial Fibrosis. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39(3):827–36.
343. Zhao D, Li S, Cui J, Wang L, Ma X, Li Y. Plasma miR-125a and miR-125b in sepsis: Correlation with disease risk, inflammation, severity, and prognosis. *J Clin Lab Anal*. 2020 Feb 19;34(2).
344. Li S, Zhao D, Cui J, Wang L, Ma X, Li Y. Correlation of microRNA-125a/b with acute respiratory distress syndrome risk and prognosis in sepsis patients. *J Clin Lab Anal*. 2020 Mar;34(3).
345. Zhang F, Fan X, Bai Y, Lu J, Zheng M, Chen J, et al. miR-125b regulates procalcitonin production in monocytes by targeting Stat3. *Microbes Infect*. 2016 Feb;18(2):102–8.
346. Le Y, Chen T, Xun K, Ding T. Expression of the Long Intergenic Non-Coding RNA (lincRNA) of the NED25 Gene Modulates the microRNA-125b, STAT3, Nitric Oxide, and Procalcitonin Signaling Pathways in Patients with Sepsis. *Med Sci Monit*. 2018 Jul 2;24:4555–66.
347. Antonakos N, Gilbert C, Théroude C, Schrijver IT, Roger T. Modes of action and diagnostic value of miRNAs in sepsis. *Front Immunol*. 2022;13:951798.
348. Tao Y-C, Wang Y-H, Wang M-L, Jiang W, Wu D-B, Chen E-Q, et al. Upregulation of microRNA-125b-5p alleviates acute liver failure by regulating the Keap1/Nrf2/HO-1 pathway. *Front Immunol*. 2022 Oct 4;13.

349. Yang B, Huang X, Xu S, Li L, Wu W, Dai Y, et al. Decreased miR-4512 Levels in Monocytes and Macrophages of Individuals With Systemic Lupus Erythematosus Contribute to Innate Immune Activation and Neutrophil NETosis by Targeting TLR4 and CXCL2. *Front Immunol.* 2021 Oct 14;12.
350. Shi L, Zhang Y, Xia Y, Li C, Song Z, Zhu J. MiR-150-5p protects against septic acute kidney injury via repressing the MEKK3/JNK pathway. *Cell Signal.* 2021 Oct;86:110101.
351. Deng X, Lin Z, Zuo C, Fu Y. Upregulation of miR-150-5p alleviates LPS-induced inflammatory response and apoptosis of RAW264.7 macrophages by targeting Notch1. *Open Life Sci.* 2020 Jul 28;15(1):544–52.
352. Liu D, Huang S-Y, Sun J-H, Zhang H-C, Cai Q-L, Gao C, et al. Sepsis-induced immunosuppression: mechanisms, diagnosis and current treatment options. *Mil Med Res.* 2022 Oct 9;9(1):56.
353. Hazra B, Kumawat KL, Basu A. The host microRNA miR-301a blocks the IRF1-mediated neuronal innate immune response to Japanese encephalitis virus infection. *Sci Signal.* 2017 Feb 14;10(466).
354. Zhu XG, Zhang TN, Wen R, Liu CF. Overexpression of miR-150-5p Alleviates Apoptosis in Sepsis-Induced Myocardial Depression. *Biomed Res Int.* 2020 Aug 30;2020:1–10.
355. Ge Q-M, Huang C-M, Zhu X-Y, Bian F, Pan S-M. Differentially expressed miRNAs in sepsis-induced acute kidney injury target oxidative stress and mitochondrial dysfunction pathways. Fan G-C, editor. *PLoS One.* 2017 Mar 15;12(3):e0173292.
356. Long X, Huang Y, He J, Zhang X, Zhou Y, Wei Y, et al. Upregulation of miR-335 exerts protective effects against sepsis-induced myocardial injury. *Mol Med Rep.* 2021 Sep 17;24(5):806.
357. Zhang B, Zhang Q, Yang L, Zheng H, Pang G, Zhao M, et al. Role of miR-584-5p in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Bronchial Epithelial Cell Inflammation and Apoptosis. Zhang Z, editor. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2022 Apr 11;2022:1–10.
358. Hou J, He M, Chen Q, Liang S. LncRNA H19 acts as miR-301a-3p sponge to alleviate lung injury in mice with sepsis by regulating *Adcy1*. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2022 Aug;44(4):565–73.

359. Gao M, Yu T, Liu D, Shi Y, Yang P, Zhang J, et al. Sepsis plasma-derived exosomal miR-1-3p induces endothelial cell dysfunction by targeting SERP1. *Clin Sci*. 2021 Jan 29;135(2):347–65.
360. Gao X-L, Li J-Q, Dong Y-T, Cheng E-J, Gong J-N, Qin Y-L, et al. Upregulation of microRNA-335-5p reduces inflammatory responses by inhibiting FASN through the activation of AMPK/ULK1 signaling pathway in a septic mouse model. *Cytokine*. 2018 Oct;110:466–78.
361. Oliveira SR, Dionísio PA, Gaspar MM, Correia Guedes L, Coelho M, Rosa MM, et al. miR-335 Targets LRRK2 and Mitigates Inflammation in Parkinson’s Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jun 15;9.
362. Alliance S. Sepsis Alliance - Kidney Failure [Internet]. *Kidney Failure*. 2023. Available from: <https://www.sepsis.org/sepsisand/kidney-failure/#:~:text=According to the National Kidney,cases were caused by sepsis>.
363. Guan L, Wang F, Wang M, Han S, Cui Z, Xi S, et al. Downregulation of HULC Induces Ferroptosis in Hepatocellular Carcinoma via Targeting of the miR-3200-5p/ATF4 Axis. Ciccarone F, editor. *Oxid Med Cell Longev*. 2022 May 16;2022:1–18.
364. Liu Y, Tan S, Wu Y, Tan S. The Emerging Role of Ferroptosis in Sepsis. *DNA Cell Biol*. 2022 Apr 1;41(4):368–80.
365. Dejean AS, Hedrick SM, Kerdiles YM. Highly Specialized Role of Forkhead Box O Transcription Factors in the Immune System. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Feb 15;14(4):663–74.
366. Schabbauer G, Tencati M, Pedersen B, Pawlinski R, Mackman N. PI3K-Akt Pathway Suppresses Coagulation and Inflammation in Endotoxemic Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Oct;24(10):1963–9.
367. Deane JA, Fruman DA. P <sc>hosphoinositide</sc> 3-K <sc>inase</sc> : Diverse Roles in Immune Cell Activation. *Annu Rev Immunol*. 2004 Apr 1;22(1):563–98.
368. Zhou T, Shi J, Li X. [Role of PI3K/Akt signaling pathway in the innate immune of sepsis]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2018 Nov;30(11):1091–4.
369. Liu J, Li J, Tian P, Guli B, Weng G, Li L, et al. H2S attenuates sepsis-induced cardiac dysfunction via a PI3K/Akt-dependent mechanism. *Exp Ther Med*. 2019 Mar 26;

370. 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.
371. Ospa-Verdegal R, Beltrán-García J, Paes AB, Nacher-Sendra E, Novella S, Hermenegildo C, et al. Histone Citrullination Mediates a Protective Role in Endothelium and Modulates Inflammation. *Cells*. 2022 Dec 15;11(24):4070.
372. Kilpatrick LE, Kiani MF. Experimental Approaches to Evaluate Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in Sepsis and Inflammation. *Shock*. 2020;53(5):585–95.
373. Müller B, Becker KL, Kränzlin M, Schächinger H, Huber PR, Nylén ES, et al. Disordered calcium homeostasis of sepsis: association with calcitonin precursors. *Eur J Clin Invest*. 2000 Sep;30(9):823–31.
374. Vijayan AL, Vanimaya, Ravindran S, Saikant R, Lakshmi S, Kartik R, et al. Procalcitonin: a promising diagnostic marker for sepsis and antibiotic therapy. *J intensive care*. 2017;5:51.
375. Gregoriano C, Heilmann E, Molitor A, Schuetz P. Role of procalcitonin use in the management of sepsis. *J Thorac Dis*. 2020 Feb;12(Suppl 1):S5–15.
376. Lartey NL, Vargas-Robles H, Guerrero-Fonseca IM, García-Ponce A, Salinas-Lara C, Rottner K, et al. The Actin-Binding Protein Cortactin Promotes Sepsis Severity by Supporting Excessive Neutrophil Infiltration into the Lung. *Biomedicines*. 2022 Apr 28;10(5):1019.
377. Leligdowicz A, Matthay MA. Heterogeneity in sepsis: new biological evidence with clinical applications. *Crit Care*. 2019 Dec 9;23(1):80.
378. Hawkins RB, Raymond SL, Stortz JA, Horiguchi H, Brakenridge SC, Gardner A, et al. Chronic Critical Illness and the Persistent Inflammation, Immunosuppression, and Catabolism Syndrome. *Front Immunol*. 2018 Jul 2;9.
379. Biron CA. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN- $\alpha/\beta$ ), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin Immunol*. 1998 Oct;10(5):383–90.
380. Recalde M, Gárate-Rascón M, Herranz JM, Elizalde M, Azkona M, Unfried JP, et al. DNA Methylation Regulates a Set of Long Non-Coding RNAs Compromising Hepatic Identity



- during Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2022 Apr 19;14(9):2048.
381. Alberts B, Johnson A, Lewis J. Helper T Cells and Lymphocyte Activation. In: *Molecular Biology of the Cell* [Internet]. 4th ed. New York; 2002. p. online. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26827/>
382. Pu Y, Ji Q. Tumor-Associated Macrophages Regulate PD-1/PD-L1 Immunosuppression. *Front Immunol*. 2022;13:874589.
383. Piccolo E, Tinari N, Semeraro D, Traini S, Fichera I, Cumashi A, et al. LGALS3BP, lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein, induces vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells and promotes angiogenesis. *J Mol Med*. 2013 Jan 5;91(1):83–94.
384. Dolmatova E V, Wang K, Mandavilli R, Griendling KK. The effects of sepsis on endothelium and clinical implications. *Cardiovasc Res*. 2021 Jan 1;117(1):60–73.
385. Lee WL, Slutsky AS. Sepsis and Endothelial Permeability. *N Engl J Med*. 2010 Aug 12;363(7):689–91.
386. Luo M, Zhang Q, Hu Y, Sun C, Sheng Y, Deng C. LGALS3BP: A Potential Plasma Biomarker Associated with Diagnosis and Prognosis in Patients with Sepsis. *Infect Drug Resist*. 2021 Jul;Volume 14:2863–71.
387. Xu J, Li J, Xiao K, Zou S, Yan P, Xie X, et al. Dynamic changes in human HLA-DRA gene expression and Th cell subsets in sepsis: Indications of immunosuppression and associated outcomes. *Scand J Immunol*. 2020 Jan 10;91(1).
388. Snyder A, Jedreski K, Fitch J, Wijeratne S, Wetzel A, Hensley J, et al. Transcriptomic Profiles in Children With Septic Shock With or Without Immunoparalysis. *Front Immunol*. 2021 Oct 1;12.
389. Cazalis M-A, Lepape A, Venet F, Frager F, Mouglin 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 20;2(1):20.
390. Zhu Y, Wang W, Wang X. Roles of transcriptional factor 7 in production of inflammatory factors for lung diseases. *J Transl Med*. 2015 Dec 20;13(1):273.
391. Ferguson NR, Galley HF, Webster NR. T helper cell subset ratios in patients with severe

- sepsis. *Intensive Care Med.* 1999 Jan 26;25(1):106–9.
392. Walker JA, McKenzie ANJ. TH2 cell development and function. *Nat Rev Immunol.* 2018 Feb;18(2):121–33.
393. Inoue S, Nakanishi N, Sugiyama J, Moriyama N, Miyazaki Y, Sugimoto T, et al. Prevalence and Long-Term Prognosis of Post-Intensive Care Syndrome after Sepsis: A Single-Center Prospective Observational Study. *J Clin Med.* 2022 Sep 6;11(18):5257.
394. Ben Mkaddem S, Benhamou M, Monteiro RC. Understanding Fc Receptor Involvement in Inflammatory Diseases: From Mechanisms to New Therapeutic Tools. *Front Immunol.* 2019 Apr 12;10.
395. Huang X, Tan J, Chen X, Zhao L. Identifying Potential Effective Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Sepsis by Bioinformatics Analysis and Validation. *Int J Gen Med.* 2022 Jul;Volume 15:6055–71.
396. National library of medicine. PDCD1 - programmed cell death 1. *Gene - NIH.* 2023.
397. Hancock REW, Haney EF, Gill EE. The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat Rev Immunol.* 2016 May 18;16(5):321–34.
398. Rodríguez-García M, Oliva H, Climent N, García F, Gatell JM, Gallart T. Human immature monocyte-derived dendritic cells produce and secrete  $\alpha$ -defensins 1-3. *J Leukoc Biol.* 2007 Nov;82(5):1143–6.
399. CG W, JE G, MN M, JL S, RW S. Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family. *J Biol Chem.* 1989;264(19):11200–3.
400. Basingab F, Alsaiahy A, Almontashri S, Alrofaiidi A, Alharbi M, Azhari S, et al. Alterations in Immune-Related Defensin Alpha 4 (DEFA4) Gene Expression in Health and Disease. Zan H, editor. *Int J Inflamm.* 2022 May 28;2022:1–15.
401. National library of medicine. TNFSF4 - TNF superfamily member 4 [Internet]. NIH. 2022 [cited 2023 Jan 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7292>
402. Chen W, Wu J, Xie A. Cytokine regulation of immune tolerance. *Burn Trauma.* 2014;2(1):11.
403. Venet F, Demaret J, Gossez M, Monneret G. Myeloid cells in sepsis-acquired immunodeficiency. *Ann N Y Acad Sci.* 2021 Sep 23;1499(1):3–17.

404. Resources A of G. PRTN3 Gene - Proteinase 3 [Internet]. The human gene database. 2022 [cited 2023 Feb 12]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PRTN3>
405. Navarrete P, Garzón MJ, Lorente-Pozo S, Mena-Mollá S, Vento M, Pallardó F V., et al. Use of Two Complementary Bioinformatic Approaches to Identify Differentially Methylated Regions in Neonatal Sepsis. *Open Bioinforma J*. 2021 Nov 25;14(1):144–52.
406. Germain C, Guillaudeux T, Galsgaard ED, Hervouet C, Tekaya N, Gallouet A-S, et al. Lectin-like transcript 1 is a marker of germinal center-derived B-cell non-Hodgkin's lymphomas dampening natural killer cell functions. *Oncoimmunology*. 2015 Aug 3;4(8):e1026503.
407. Guerriero JL. Macrophages: Their Untold Story in T Cell Activation and Function. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2019;342:73–93.
408. Sun Y, Malaer JD, Mathew PA. Lectin-like transcript 1 as an natural killer cell-mediated immunotherapeutic target for triple negative breast cancer and prostate cancer. *J Cancer Metastasis Treat*. 2019 Dec 17;2019.
409. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015 Aug 24;15(8):486–99.
410. Liang G, Li J, Pu S, He Z. Screening of Sepsis Biomarkers Based on Bioinformatics Data Analysis. Shaikh A, editor. *J Healthc Eng* [Internet]. 2022 Sep 26;2022:1–10. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jhe/2022/6788569/>
411. Jensen IJ, Sjaastad F V., Griffith TS, Badovinac VP. Sepsis-Induced T Cell Immunoparalysis: The Ins and Outs of Impaired T Cell Immunity. *J Immunol*. 2018 Mar 1;200(5):1543–53.
412. Hawez A, Al-Haidari A, Madhi R, Rahman M, Thorlacius H. MiR-155 Regulates PAD4-Dependent Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol*. 2019 Nov 1;10.
413. Liao T-L, Chen Y-M, Tang K-T, Chen P-K, Liu H-J, Chen D-Y. MicroRNA-223 inhibits neutrophil extracellular traps formation through regulating calcium influx and small extracellular vesicles transmission. *Sci Rep*. 2021 Aug 3;11(1):15676.
414. Hsieh Y-T, Chou Y-C, Kuo P-Y, Tsai H-W, Yen Y-T, Shiau A-L, et al. Down-regulated miR-146a expression with increased neutrophil extracellular traps and apoptosis

- formation in autoimmune-mediated diffuse alveolar hemorrhage. *J Biomed Sci.* 2022 Aug 26;29(1):62.
415. Wu D, Shi Y, Zhang H, Miao C. Epigenetic mechanisms of Immune remodeling in sepsis: targeting histone modification. *Cell Death Dis.* 2023 Feb 11;14(2):112.
416. Parker KH, Beury DW, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. *Adv Cancer Res.* 2015;128:95–139.
417. Harjunpää H, Lloret Asens M, Guenther C, Fagerholm SC. Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2019 May 22;10.
418. Liu S, Liu F, Zhou Y, Jin B, Sun Q, Guo S. Immunosuppressive Property of MSCs Mediated by Cell Surface Receptors. *Front Immunol.* 2020 Jul 28;11.
419. Pulous FE, Petrich BG. Integrin-dependent regulation of the endothelial barrier. *Tissue Barriers.* 2019 Oct 2;7(4):1685844.
420. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Jul 23;15(7):482–96.

# 11. ANEXOS



**11.1. ANEXO I: RESULTADOS ANEXOS (TABLAS Y FIGURAS SUPLEMENTARIAS)**

## ➤ SELECCIÓN DE PACIENTES (APARTADO 4.10)

**Tabla Suplementaria 1.** Características clínicas de los pacientes con sepsis, ECC y PICS. Abreviaturas: PCR: Proteína C reactiva; NA: No aplicable.

Grupo	Nº Caso	Días UCI	1ª toma:			3ª toma:		
			24h de ingreso en UCI			14º día de ingreso en UCI		
			PCR >15	Linfocitos <800	Albúmina <3	PCR >15	Linfocitos <800	Albúmina <3
Sepsis	130	2	392	210	2.2	14	1330	NA
	131	3	90	660	2.7	NA	NA	NA
	132	2	294	1120	2.8	NA	NA	NA
	136	2	30.8	1000	3.7	NA	NA	NA
	137	6	512	980	3.1	77	2720	3.1
	138	4	262	940	3.2	6.9	1980	3.9
	141	3	91.9	670	2.1	NA	NA	NA
	142	2	170	1190	2.7	NA	NA	NA
	143	3	368	410	2.3	85	390	2.8
	144	4	422	110	2.7	20	260	3.5
	146	2	136	150	2.8	NA	NA	NA
	147	5	359	1880	2.9	21.4	NA	3.3
	149	2	350	490	2.5	NA	NA	NA
	150	6	122.4	740	3.2	NA	NA	NA
	151	5	108.9	520	2.8	4	690	2.5
	152	3	202	470	2.2	48.5	2870	1.8
	158	6	451	50	2.7	NA	NA	NA
	160	5	256	790	3.5	NA	NA	NA
161	2	290	880	3.1	NA	NA	NA	
162	1	431	730	2.5	NA	NA	NA	
164	2	401	560	2.4	5.1	2040	4.4	
165	4	181	1320	3.4	42	1780	3.5	
166	2	125	1200	2.5	NA	NA	NA	
ECC	129	10	26	3470	2,6	25.8	5400	0
	134	7	56,2	1550	2,7	87	2120	1
	135	8	16,9	360	2,4	10.6	1160	1
	139	11	59	1060	2,8	NA	NA	NA
	140	8	85,9	1050	1,8	93	1540	2.2
	145	7				NA	NA	NA
	153	8	88	1070	2,5	76	990	2.9
	155	8	148	810	1,7	101	1370	1
	159	11	273		2,1	395	1210	1
	163	10	133,4	740	3	13.9	2060	1
PICS	133	24	2,9	1050	2,6	34	730	2.8
	154	32	125	760	3,1	231	920	2.9
	156	18	19,5	440	3,5	15.7	360	2.6
	157	14	38,2	580	2,4	129	510	2.8
	68	22	21	1370	2,9	25	1180	2.9
	74	23	94	1280	2,3	94	1280	2.3
	75	22	105	250	2,35	69	300	2.4
	85	15	2,4	630	3,1	3.7	480	3.1
	104	16	57	610	3	65	440	2.4
	115	18	38	400	2.8	35	690	2.8
126	40	121	500	1,9	119	290	3.3	



- CORRELACIONES ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y LOS NIVELES DE HISTONAS CIRCULANTES Y DE H3 CITRULINADA (APARTADO 5.7)

Tabla Suplementaria 2. Correlaciones de Spearman y p-valor obtenidos en el grupo de pacientes de sepsis supervivientes; 1ª muestra colectada (Referente a la figura 21A)

		CirchHist (A)	CitrH3 (A)	Quick (A)	SOFA <sub>Tot</sub> (A)	APACHEII	Lac6H	Lactate (A)	PCR (A)	Leuco (A)	PMN (A)	Plaq (A)	ProtrombTo	TropUS (A)	DD (A)	APTT (A)	PCA (A)	FuncProtC	PCT (A)	Age
CirchHist (A)	correlation coefficient	1,000	0,451	-0,525	-0,125	0,156	-0,325	0,668	-0,186	0,658	0,451	-0,305	0,470	-0,035	0,349	0,244	-0,830	-0,574	-0,056	-0,119
	significance		0,053	0,021	0,611	0,523	0,175	0,002	0,446	0,002	0,053	0,204	0,042	0,887	0,143	0,314	0,000	0,010	0,819	0,627
CitrH3 (A)	correlation coefficient	0,451	1,000	0,074	-0,125	0,175	0,100	0,772	-0,279	0,372	0,035	-0,154	0,063	0,105	-0,214	0,542	-0,251	-0,346	0,421	0,309
	significance	0,053		0,764	0,611	0,473	0,684	0,000	0,247	0,117	0,887	0,528	0,797	0,668	0,379	0,016	0,300	0,147	0,073	0,198
Quick (A)	correlation coefficient	-0,525	0,074	1,000	-0,002	-0,377	0,084	-0,098	-0,044	-0,360	-0,233	0,058	-0,260	-0,112	-0,265	0,189	0,514	0,561	0,181	0,086
	significance	0,021	0,764		0,994	0,111	0,732	0,689	0,858	0,130	0,336	0,814	0,283	0,647	0,273	0,437	0,024	0,012	0,459	0,726
SOFA <sub>Tot</sub> (A)	correlation coefficient	-0,125	-0,125	-0,002	1,000	0,596	-0,425	-0,360	-0,465	-0,170	-0,472	-0,526	0,295	0,554	0,068	-0,453	0,075	0,198	-0,756	0,470
	significance	0,611	0,611	0,994		0,007	0,070	0,130	0,045	0,486	0,041	0,021	0,221	0,014	0,781	0,052	0,759	0,416	0,000	0,042
APACHEII	correlation coefficient	0,156	0,175	-0,377	0,596	1,000	0,081	0,089	-0,386	-0,030	-0,561	-0,393	0,193	0,874	-0,195	-0,168	-0,125	-0,242	-0,196	0,632
	significance	0,523	0,473	0,111	0,007		0,743	0,716	0,103	0,904	0,012	0,096	0,429	0,000	0,424	0,491	0,611	0,318	0,420	0,004
Lac6H	correlation coefficient	-0,325	0,100	0,084	-0,425	0,081	1,000	0,191	0,096	-0,502	-0,421	0,081	-0,182	0,312	-0,579	0,337	0,295	-0,170	0,675	0,088
	significance	0,175	0,684	0,732	0,070	0,743		0,433	0,694	0,029	0,073	0,743	0,455	0,193	0,009	0,158	0,221	0,486	0,002	0,721
Lactate (A)	correlation coefficient	0,668	0,772	-0,098	-0,360	0,089	0,191	1,000	-0,312	0,356	0,147	-0,098	0,079	0,061	-0,242	0,716	-0,500	-0,528	0,504	0,032
	significance	0,002	0,000	0,689	0,130	0,716	0,433		0,193	0,135	0,547	0,689	0,748	0,803	0,318	0,001	0,029	0,020	0,028	0,898
PCR (A)	correlation coefficient	-0,186	-0,279	-0,044	-0,465	-0,386	0,096	-0,312	1,000	0,056	0,435	0,233	0,058	-0,432	0,454	0,074	0,091	0,012	0,074	-0,589
	significance	0,446	0,247	0,858	0,045	0,103	0,694	0,193		0,819	0,063	0,336	0,814	0,065	0,051	0,764	0,710	0,960	0,764	0,008
Leuco (A)	correlation coefficient	0,658	0,372	-0,360	-0,170	-0,030	-0,502	0,356	0,056	1,000	0,695	0,144	0,042	-0,398	0,409	-0,065	-0,618	-0,335	-0,002	-0,168
	significance	0,002	0,117	0,130	0,486	0,904	0,029	0,135	0,819		0,001	0,557	0,864	0,091	0,082	0,792	0,005	0,161	0,994	0,491
PMN (A)	correlation coefficient	0,451	0,035	-0,233	-0,472	-0,561	-0,421	0,147	0,435	0,695	1,000	0,228	0,163	-0,768	0,637	0,091	-0,481	-0,191	0,005	-0,616
	significance	0,053	0,887	0,336	0,041	0,012	0,073	0,547	0,063	0,001		0,348	0,505	0,000	0,003	0,710	0,037	0,433	0,983	0,005
Plaq (A)	correlation coefficient	-0,305	-0,154	0,058	-0,526	-0,393	0,081	-0,098	0,233	0,144	0,228	1,000	-0,835	-0,435	-0,146	-0,102	0,323	0,340	0,440	-0,088
	significance	0,204	0,528	0,814	0,021	0,096	0,743	0,689	0,336	0,557	0,348		0,000	0,063	0,552	0,679	0,178	0,154	0,059	0,721
ProtrombTo	correlation coefficient	0,470	0,063	-0,260	0,295	0,193	-0,182	0,079	0,058	0,042	0,163	-0,835	1,000	0,223	0,504	0,114	-0,453	-0,316	-0,463	-0,158
	significance	0,042	0,797	0,283	0,221	0,429	0,455	0,748	0,814	0,864	0,505	0,000		0,359	0,028	0,642	0,052	0,188	0,046	0,519
TropUS (A)	correlation coefficient	-0,035	0,105	-0,112	0,554	0,874	0,312	0,061	-0,432	-0,398	-0,768	-0,435	0,223	1,000	-0,365	-0,025	0,153	-0,009	-0,112	0,635
	significance	0,887	0,668	0,647	0,014	0,000	0,193	0,803	0,065	0,091	0,000	0,063	0,359		0,124	0,920	0,533	0,972	0,647	0,003
DD (A)	correlation coefficient	0,349	-0,214	-0,265	0,068	-0,195	-0,579	-0,242	0,454	0,409	0,637	-0,146	0,504	-0,365	1,000	-0,321	-0,456	-0,089	-0,574	-0,404
	significance	0,143	0,379	0,273	0,781	0,424	0,009	0,318	0,051	0,082	0,003	0,552	0,028	0,124		0,180	0,050	0,716	0,010	0,087
APTT (A)	correlation coefficient	0,244	0,542	0,189	-0,453	-0,168	0,337	0,716	0,074	-0,065	0,091	-0,102	0,114	-0,025	-0,321	1,000	-0,053	-0,247	0,575	-0,205
	significance	0,314	0,016	0,437	0,052	0,491	0,158	0,001	0,764	0,792	0,710	0,679	0,642	0,920	0,180		0,831	0,307	0,010	0,399
PCA (A)	correlation coefficient	-0,830	-0,251	0,514	0,075	-0,125	0,295	-0,500	0,091	-0,618	-0,481	0,323	-0,453	0,153	-0,456	-0,053	1,000	0,775	0,189	0,282
	significance	0,000	0,300	0,024	0,759	0,611	0,221	0,029	0,710	0,005	0,037	0,178	0,052	0,533	0,050	0,831		0,000	0,437	0,241
FuncProtC	correlation coefficient	-0,574	-0,346	0,561	0,198	-0,242	-0,170	-0,528	0,012	-0,335	-0,191	0,340	-0,316	-0,009	-0,089	-0,247	0,775	1,000	-0,130	0,205
	significance	0,010	0,147	0,012	0,416	0,318	0,486	0,020	0,960	0,161	0,433	0,154	0,188	0,972	0,716	0,307	0,000		0,596	0,399
PCT (A)	correlation coefficient	-0,056	0,421	0,181	-0,756	-0,196	0,675	0,504	0,074	-0,002	0,005	0,440	-0,463	-0,112	-0,574	0,575	0,189	-0,130	1,000	0,068
	significance	0,819	0,073	0,459	0,000	0,420	0,002	0,028	0,764	0,994	0,983	0,059	0,046	0,647	0,010	0,010	0,437	0,596		0,781
Age	correlation coefficient	-0,119	0,309	0,086	0,470	0,632	0,088	0,032	-0,589	-0,168	-0,616	-0,088	-0,158	0,635	-0,404	-0,205	0,282	0,205	0,068	1,000
	significance	0,627	0,198	0,726	0,042	0,004	0,721	0,898	0,008	0,491	0,005	0,721	0,519	0,003	0,087	0,399	0,241	0,399	0,781	

Tabla suplementaria 3. Correlaciones de Spearman y p-valor obtenidos en el grupo de pacientes de sepsis supervivientes; 2ª muestra colectada (Referente a la figura 21B)

		CirchHist (B)	CitrH3 (B)	Quick (B)	SOFA Tot (B)	APACHEII	Lac6H	Lactate (B)	PCR (B)	Leuco (B)	PMN (B)	Plaq (B)	ProtrombTo	TropUS (B)	DD (B)	APTT (B)	PCA (B)	FuncProtC	PCT (B)	Age
CirchHist (B)	correlation coefficient	1,000	0,504	-0,543	0,000	-0,134	-0,437	-0,114	0,200	0,167	0,025	0,167	-0,048	-1,000		0,500	-0,350	-0,267	-0,333	0,269
	significance		0,170	0,297	1,000	0,733	0,240	0,789	0,613	0,678	0,957	0,678	0,935	0,333		1,000	0,359	0,493	0,428	0,481
CitrH3 (B)	correlation coefficient	0,504	1,000	-0,486	0,313	0,398	-0,059	-0,039	-0,084	-0,244	0,072	-0,462	0,349	-1,000		1,000	0,445	-0,076	0,323	0,665
	significance	0,170		0,356	0,419	0,284	0,879	0,938	0,834	0,524	0,855	0,212	0,393	0,333		0,333	0,230	0,849	0,432	0,057
Quick (B)	correlation coefficient	-0,543	-0,486	1,000	-0,706	-0,667	0,257	-0,224	-0,486	-0,257	0,290	0,086	-0,800	0,500		-0,500	0,257	0,257	-0,314	-0,657
	significance	0,297	0,356		0,144	0,161	0,658	1,000	0,356	0,658	0,600	0,919	0,133	1,000		1,000	0,658	0,658	0,564	0,175
SOFA Tot (B)	correlation coefficient	0,000	0,313	-0,706	1,000	0,470	-0,418	0,098	-0,069	0,552	-0,017	-0,449	0,701	0,500		0,000	0,380	-0,242	0,200	-0,017
	significance	1,000	0,419	0,144		0,211	0,271	0,821	0,890	0,136	0,983	0,243	0,073	1,000		1,000	0,334	0,556	0,675	0,980
APACHEII	correlation coefficient	-0,134	0,398	-0,667	0,470	1,000	0,144	0,096	0,479	-0,185	-0,506	-0,143	0,024	0,500		0,500	0,269	-0,101	0,747	0,665
	significance	0,733	0,284	0,161	0,211		0,710	0,811	0,195	0,634	0,166	0,714	0,968	1,000		1,000	0,482	0,800	0,040	0,056
Lac6H	correlation coefficient	-0,437	-0,059	0,257	-0,418	0,144	1,000	0,520	0,109	-0,655	-0,152	0,210	-0,347	-1,000		0,500	-0,050	-0,328	0,611	0,136
	significance	0,240	0,879	0,658	0,271	0,710		0,198	0,782	0,062	0,692	0,586	0,400	0,333		1,000	0,902	0,386	0,118	0,724
Lactate (B)	correlation coefficient	-0,114	-0,039	-0,224	0,098	0,096	0,520	1,000	-0,342	0,038	-0,166	0,419	-0,296			0,866	0,051	-0,571	0,185	-0,064
	significance	0,789	0,938	1,000	0,821	0,811	0,198		0,412	0,930	0,696	0,311	0,531			0,667	0,899	0,149	0,714	0,889
PCR (B)	correlation coefficient	0,200	-0,084	-0,486	-0,069	0,479	0,109	-0,342	1,000	-0,117	-0,452	0,383	-0,190	0,500		-0,500	-0,617	-0,350	0,476	0,286
	significance	0,613	0,834	0,356	0,890	0,195	0,782	0,412		0,776	0,224	0,313	0,665	1,000		1,000	0,086	0,359	0,243	0,454
Leuco (B)	correlation coefficient	0,167	-0,244	-0,257	0,552	-0,185	-0,655	0,038	-0,117	1,000	0,351	0,200	0,024	0,500		-0,500	0,017	-0,200	-0,333	-0,622
	significance	0,678	0,524	0,658	0,136	0,634	0,062	0,930	0,776		0,352	0,613	0,977	1,000		1,000	0,982	0,613	0,428	0,081
PMN (B)	correlation coefficient	0,025	0,072	0,290	-0,017	-0,506	-0,152	-0,166	-0,452	0,351	1,000	-0,134	0,119	0,500		1,000	0,310	0,159	0,012	-0,473
	significance	0,957	0,855	0,600	0,983	0,166	0,692	0,696	0,224	0,352		0,731	0,793	1,000		0,333	0,415	0,683	0,990	0,199
Plaq (B)	correlation coefficient	0,167	-0,462	0,086	-0,449	-0,143	0,210	0,419	0,383	0,200	-0,134	1,000	-0,810	-0,500		-0,500	-0,533	-0,383	-0,119	-0,235
	significance	0,678	0,212	0,919	0,243	0,714	0,586	0,311	0,313	0,613	0,731		0,022	1,000		1,000	0,148	0,313	0,793	0,541
ProtrombTo	correlation coefficient	-0,048	0,349	-0,800	0,701	0,024	-0,347	-0,296	-0,190	0,024	0,119	-0,810	1,000	0,500		0,500	0,167	0,190	0,000	0,157
	significance	0,935	0,393	0,133	0,073	0,968	0,400	0,531	0,665	0,977	0,793	0,022		1,000		1,000	0,703	0,665	1,000	0,711
TropUS (B)	correlation coefficient	-1,000	-1,000	0,500	0,500	0,500	-1,000		0,500	0,500	0,500	-0,500	0,500	1,000			0,500	1,000	0,500	-0,500
	significance	0,333	0,333	1,000	1,000	1,000	0,333		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000				1,000	0,333	1,000	1,000
DD (B)	correlation coefficient																			
	significance																			
APTT (B)	correlation coefficient	0,500	1,000	-0,500	0,000	0,500	0,500	0,866	-0,500	-0,500	1,000	-0,500	0,500			1,000	0,500	0,500	1,000	1,000
	significance	1,000	0,333	1,000	1,000	1,000	1,000	0,667	1,000	1,000	0,333	1,000	1,000	0,000			1,000	1,000	0,333	0,333
PCA (B)	correlation coefficient	-0,350	0,445	0,257	0,380	0,269	-0,050	0,051	-0,617	0,017	0,310	-0,533	0,167	0,500		0,500	1,000	0,383	0,262	0,143
	significance	0,359	0,230	0,658	0,334	0,482	0,902	0,899	0,086	0,982	0,415	0,148	0,703	1,000		1,000	0,313	0,536	0,715	
FuncProtC	correlation coefficient	-0,267	-0,076	0,257	-0,242	-0,101	-0,328	-0,571	-0,350	-0,200	0,159	-0,383	0,190	1,000		0,500	0,383	1,000	-0,286	0,193
	significance	0,493	0,849	0,658	0,556	0,800	0,386	0,149	0,359	0,613	0,683	0,313	0,665	0,333		1,000	0,313		0,501	0,616
PCT (B)	correlation coefficient	-0,333	0,323	-0,314	0,200	0,747	0,611	0,185	0,476	-0,333	0,012	-0,119	0,000	0,500		1,000	0,262	-0,286	1,000	0,395
	significance	0,428	0,432	0,564	0,675	0,040	0,118	0,714	0,243	0,428	0,990	0,793	1,000	1,000		0,333	0,536	0,501		0,335
Age	correlation coefficient	0,269	0,665	-0,657	-0,017	0,665	0,136	-0,064	0,286	-0,622	-0,473	-0,235	0,157	-0,500		1,000	0,143	0,193	0,395	1,000
	significance	0,481	0,057	0,175	0,980	0,056	0,724	0,889	0,454	0,081	0,199	0,541	0,711	1,000		0,333	0,715	0,616	0,335	

Tabla Suplementaria 4. Correlaciones de Spearman y p-valor obtenidos en el grupo de pacientes de sepsis supervivientes; 3ª muestra colectada (Referente a la figura 21C)

		Circhist (C)	CitrH3 (C)	Quick (C)	SOFATot (C)	APACHEII	Lac6H	Lactate (C)	PCR (C)	Leuco (C)	PMN (C)	Plaq (C)	ProtrombTot	TropUS-C	DD (C)	APTT (C)	PCA (C)	FuncProtC	PCT (C)	Age
Circhist (C)	correlation coefficient	1,000	0,418	-0,800	0,771	0,437	0,580	0,029	-0,086	0,029	-0,029	-0,257	-0,524			-0,500	-0,017	0,000	0,200	0,563
	significance		0,262	0,333	0,103	0,241	0,108	0,978	0,919	1,000	0,983	0,658	0,197			1,000	0,982	1,000	0,783	0,121
CitrH3 (C)	correlation coefficient	0,418	1,000	-0,800	0,486	0,030	0,283	0,324	-0,143	-0,143	0,232	-0,543	0,192			-0,500	-0,259	-0,184	0,200	0,173
	significance	0,262		0,333	0,356	0,943	0,453	0,556	0,803	0,803	0,650	0,297	0,647			1,000	0,497	0,633	0,783	0,652
Quick (C)	correlation coefficient	-0,800	-0,800	1,000	-0,400	-0,316	0,400	-0,316	0,400	-0,200	0,400	0,400	0,500			1,000	0,400	0,200	0,400	-0,400
	significance	0,333	0,333		0,750	1,000	0,750	1,000	0,750	0,917	0,750	0,750	1,000			0,333	0,750	0,917	0,750	0,750
SOFATot (C)	correlation coefficient	0,771	0,486	-0,400	1,000	0,464	-0,029	0,029	-0,543	-0,200	-0,145	-0,371	-0,100			0,500	0,657	0,200	-0,600	0,086
	significance	0,103	0,356	0,750		0,372	0,983	0,978	0,297	0,714	0,778	0,497	0,950			1,000	0,175	0,714	0,350	0,919
APACHEII	correlation coefficient	0,437	0,030	-0,316	0,464	1,000	0,144	-0,851	0,261	0,377	0,074	0,116	0,024			0,866	0,067	-0,101	-0,359	0,665
	significance	0,241	0,943	1,000	0,372		0,710	0,044	0,617	0,472	0,886	0,839	0,968			0,667	0,868	0,800	0,633	0,056
Lac6H	correlation coefficient	0,580	0,283	0,400	-0,029	0,144	1,000	-0,015	0,348	0,232	-0,397	0,580	-0,347			-0,500	-0,412	-0,328	0,700	0,136
	significance	0,108	0,453	0,750	0,983	0,710		0,967	0,494	0,650	0,428	0,244	0,400			1,000	0,271	0,386	0,233	0,724
Lactate (C)	correlation coefficient	0,029	0,324	-0,316	0,029	-0,851	-0,015	1,000	-0,647	-0,618	-0,015	-0,500	0,462			-0,500	0,029	0,618	0,000	-0,206
	significance	0,978	0,556	1,000	0,978	0,044	0,967	0,178	0,200	0,967	0,300	0,433			1,000	0,978	0,200	1,000	0,711	
PCR (C)	correlation coefficient	-0,086	-0,143	0,400	-0,543	0,261	0,348	-0,647	1,000	0,714	0,029	0,657	-0,600			-0,500	-0,714	-0,714	0,700	-0,143
	significance	0,919	0,803	0,750	0,297	0,617	0,494	0,178		0,136	0,983	0,175	0,350			1,000	0,136	0,136	0,233	0,803
Leuco (C)	correlation coefficient	0,029	-0,143	-0,200	-0,200	0,377	0,232	-0,618	0,714	1,000	-0,580	0,829	-0,500			-0,500	-0,543	-1,000	0,200	-0,200
	significance	1,000	0,803	0,917	0,714	0,472	0,650	0,200	0,136		0,244	0,058	0,450			1,000	0,297	0,003	0,783	0,714
PMN (C)	correlation coefficient	-0,029	0,232	0,400	-0,145	0,074	-0,397	-0,015	0,029	-0,580	1,000	-0,667	0,154			1,000	0,029	0,580	0,300	0,609
	significance	0,983	0,650	0,750	0,778	0,886	0,428	0,967	0,983	0,244		0,161	0,833			0,333	0,983	0,244	0,683	0,211
Plaq (C)	correlation coefficient	-0,257	-0,543	0,400	-0,371	0,116	0,580	-0,500	0,657	0,829	-0,667	1,000	-0,500			-0,500	-0,371	-0,829	0,300	-0,600
	significance	0,658	0,297	0,750	0,497	0,839	0,244	0,300	0,175	0,058	0,161		0,450			1,000	0,497	0,058	0,683	0,242
ProtrombTot	correlation coefficient	-0,524	0,192	0,500	-0,100	0,024	-0,347	0,462	-0,600	-0,500	0,154	-0,500	1,000			0,500	0,000	0,190	-1,000	0,157
	significance	0,197	0,647	1,000	0,950	0,968	0,400	0,433	0,350	0,450	0,833	0,450				1,000	1,000	0,665	0,083	0,711
TropUS-C	correlation coefficient																			
	significance																			
DD (C)	correlation coefficient																			
	significance																			
APTT (C)	correlation coefficient	-0,500	-0,500	1,000	0,500	0,866	-0,500	-0,500	-0,500	-0,500	1,000	-0,500	0,500			1,000	1,000	0,500	-0,500	0,500
	significance	1,000	1,000	0,333	1,000	0,667	1,000	1,000	1,000	1,000	0,333	1,000	1,000				0,333	1,000	1,000	1,000
PCA (C)	correlation coefficient	-0,017	-0,259	0,400	0,657	0,067	-0,412	0,029	-0,714	-0,543	0,029	-0,371	0,000			1,000	1,000	0,667	-0,700	-0,059
	significance	0,982	0,497	0,750	0,175	0,868	0,271	0,978	0,136	0,297	0,983	0,497	1,000			0,333	0,333	0,059	0,233	0,888
FuncProtC	correlation coefficient	0,000	-0,184	0,200	0,200	-0,101	-0,328	0,618	-0,714	-1,000	0,580	-0,829	0,190			0,500	0,667	1,000	-0,200	0,193
	significance	1,000	0,633	0,917	0,714	0,800	0,386	0,200	0,136	0,003	0,244	0,058	0,665			1,000	0,059		0,783	0,616
PCT (C)	correlation coefficient	0,200	0,200	0,400	-0,600	-0,359	0,700	0,000	0,700	0,200	0,300	0,300	-1,000			-0,500	-0,700	-0,200	1,000	-0,400
	significance	0,783	0,783	0,750	0,350	0,633	0,233	1,000	0,233	0,783	0,683	0,683	0,083			1,000	0,233	0,783		0,517
Age	correlation coefficient	0,563	0,173	-0,400	0,086	0,665	0,136	-0,206	-0,143	-0,200	0,609	-0,600	0,157			0,500	-0,059	0,193	-0,400	1,000
	significance	0,121	0,652	0,750	0,919	0,056	0,724	0,711	0,803	0,714	0,211	0,242	0,711			1,000	0,888	0,616	0,517	

Tabla Suplementaria 5. Correlaciones de Spearman y p-valor obtenidos en el grupo de pacientes de SS supervivientes; 1ª muestra colectada (Referente a la figura 22A)

		CircHist (A)	CitrH3 (A)	Quick (A)	SOFATot (A)	APACHEII	Lac6H	Lactate (A)	PCR (A)	Leuco (A)	PMN (A)	Plaq (A)	ProtrombTo	TropUS (A)	DD (A)	APTT (A)	PCA (A)	FuncProtC	PCT (A)	Age
CircHist (A)	correlation coefficient	1,000	-0,205	-0,777	0,456	0,047	0,037	-0,465	-0,505	-0,153	0,107	-0,561	0,498	0,716	0,661	0,600	-0,632	-0,726	-0,256	0,133
	significance		0,399	0,000	0,050	0,847	0,881	0,045	0,027	0,533	0,663	0,012	0,030	0,001	0,002	0,007	0,004	0,000	0,290	0,586
CitrH3 (A)	correlation coefficient	-0,205	1,000	0,095	0,156	0,309	0,172	0,486	-0,016	0,339	-0,016	0,453	-0,151	-0,354	-0,312	-0,258	0,370	0,446	-0,302	-0,133
	significance	0,399		0,700	0,523	0,198	0,482	0,035	0,949	0,156	0,949	0,052	0,538	0,137	0,193	0,286	0,119	0,056	0,209	0,586
Quick (A)	correlation coefficient	-0,777	0,095	1,000	-0,700	-0,219	0,198	0,451	0,818	0,370	0,039	0,765	-0,484	-0,658	-0,746	-0,602	0,861	0,804	0,482	-0,072
	significance	0,000	0,700		0,001	0,367	0,416	0,053	0,000	0,119	0,875	0,000	0,036	0,002	0,000	0,006	0,000	0,000	0,036	0,770
SOFATot (A)	correlation coefficient	0,456	0,156	-0,700	1,000	0,561	-0,240	-0,072	-0,518	-0,532	0,305	-0,605	0,468	0,442	0,642	0,270	-0,679	-0,656	-0,477	0,191
	significance	0,050	0,523	0,001		0,012	0,322	0,770	0,023	0,019	0,204	0,006	0,043	0,058	0,003	0,263	0,001	0,002	0,039	0,433
APACHEII	correlation coefficient	0,047	0,309	-0,219	0,561	1,000	-0,635	-0,325	-0,442	-0,016	0,612	0,046	0,477	-0,261	0,279	-0,446	-0,114	-0,146	-0,123	0,651
	significance	0,847	0,198	0,367	0,012		0,003	0,175	0,058	0,949	0,005	0,853	0,039	0,280	0,247	0,056	0,642	0,552	0,616	0,003
Lac6H	correlation coefficient	0,037	0,172	0,198	-0,240	-0,635	1,000	0,574	0,465	0,025	-0,516	0,042	-0,495	0,274	-0,388	0,525	0,168	0,177	-0,130	-0,604
	significance	0,881	0,482	0,416	0,322	0,003		0,010	0,045	0,920	0,024	0,864	0,031	0,257	0,101	0,021	0,491	0,468	0,596	0,006
Lactate (A)	correlation coefficient	-0,465	0,486	0,451	-0,072	-0,325	0,574	1,000	0,565	-0,077	-0,284	0,282	-0,516	-0,156	-0,505	-0,089	0,400	0,465	-0,242	-0,646
	significance	0,045	0,035	0,053	0,770	0,175	0,010		0,012	0,753	0,238	0,241	0,024	0,523	0,027	0,716	0,090	0,045	0,318	0,003
PCR (A)	correlation coefficient	-0,505	-0,016	0,818	-0,518	-0,442	0,465	0,565	1,000	0,056	0,014	0,402	-0,574	-0,263	-0,605	-0,205	0,567	0,479	0,335	-0,249
	significance	0,027	0,949	0,000	0,023	0,058	0,045	0,012		0,819	0,955	0,088	0,010	0,276	0,006	0,399	0,011	0,038	0,161	0,304
Leuco (A)	correlation coefficient	-0,153	0,339	0,370	-0,532	-0,016	0,025	-0,077	0,056	1,000	0,072	0,767	0,019	-0,435	-0,216	-0,351	0,667	0,656	0,453	0,246
	significance	0,533	0,156	0,119	0,019	0,949	0,920	0,753	0,819		0,770	0,000	0,937	0,063	0,375	0,141	0,002	0,002	0,052	0,311
PMN (A)	correlation coefficient	0,107	-0,016	0,039	0,305	0,612	-0,516	-0,284	0,014	0,072	1,000	0,079	0,491	-0,011	0,270	-0,363	0,091	-0,058	0,365	0,693
	significance	0,663	0,949	0,875	0,204	0,005	0,024	0,238	0,955	0,770		0,748	0,033	0,966	0,263	0,126	0,710	0,814	0,124	0,001
Plaq (A)	correlation coefficient	-0,561	0,453	0,765	-0,605	0,046	0,042	0,282	0,402	0,767	0,079	1,000	-0,244	-0,777	-0,602	-0,714	0,933	0,896	0,428	0,114
	significance	0,012	0,052	0,000	0,006	0,853	0,864	0,241	0,088	0,000	0,748		0,314	0,000	0,006	0,001	0,000	0,000	0,067	0,642
ProtrombTo	correlation coefficient	0,498	-0,151	-0,484	0,468	0,477	-0,495	-0,516	-0,574	0,019	0,491	-0,244	1,000	0,298	0,714	-0,046	-0,267	-0,368	0,012	0,505
	significance	0,030	0,538	0,036	0,043	0,039	0,031	0,024	0,010	0,937	0,033	0,314		0,215	0,001	0,853	0,270	0,121	0,960	0,027
TropUS (A)	correlation coefficient	0,716	-0,354	-0,658	0,442	-0,261	0,274	-0,156	-0,263	-0,435	-0,011	-0,777	0,298	1,000	0,612	0,828	-0,677	-0,723	-0,202	-0,144
	significance	0,001	0,137	0,002	0,058	0,280	0,257	0,523	0,276	0,063	0,966	0,000	0,215		0,005	0,000	0,001	0,000	0,408	0,557
DD (A)	correlation coefficient	0,661	-0,312	-0,746	0,642	0,279	-0,388	-0,505	-0,605	-0,216	0,270	-0,602	0,714	0,612	1,000	0,365	-0,702	-0,756	-0,049	0,379
	significance	0,002	0,193	0,000	0,003	0,247	0,101	0,027	0,006	0,375	0,263	0,006	0,001	0,005		0,124	0,001	0,000	0,842	0,110
APTT (A)	correlation coefficient	0,600	-0,258	-0,602	0,270	-0,446	0,525	-0,089	-0,205	-0,351	-0,363	-0,714	-0,046	0,828	0,365	1,000	-0,651	-0,609	-0,251	-0,275
	significance	0,007	0,286	0,006	0,263	0,056	0,021	0,716	0,399	0,141	0,126	0,001	0,853	0,000	0,124		0,003	0,006	0,300	0,254
PCA (A)	correlation coefficient	-0,632	0,370	0,861	-0,679	-0,114	0,168	0,400	0,567	0,667	0,091	0,933	-0,267	-0,677	-0,702	-0,651	1,000	0,951	0,419	-0,025
	significance	0,004	0,119	0,000	0,001	0,642	0,491	0,090	0,011	0,002	0,710	0,000	0,270	0,001	0,001	0,003		0,000	0,074	0,920
FuncProtC	correlation coefficient	-0,726	0,446	0,804	-0,656	-0,146	0,177	0,465	0,479	0,656	-0,058	0,896	-0,368	-0,723	-0,756	-0,609	0,951	1,000	0,328	-0,163
	significance	0,000	0,056	0,000	0,002	0,552	0,468	0,045	0,038	0,002	0,814	0,000	0,121	0,000	0,000	0,006	0,000		0,170	0,505
PCT (A)	correlation coefficient	-0,256	-0,302	0,482	-0,477	-0,123	-0,130	-0,242	0,335	0,453	0,365	0,428	0,012	-0,202	-0,049	-0,251	0,419	0,328	1,000	0,456
	significance	0,290	0,209	0,036	0,039	0,616	0,596	0,318	0,161	0,052	0,124	0,067	0,960	0,408	0,842	0,300	0,074	0,170		0,050
Age	correlation coefficient	0,133	-0,133	-0,072	0,191	0,651	-0,604	-0,646	-0,249	0,246	0,693	0,114	0,505	-0,144	0,379	-0,275	-0,025	-0,163	0,456	1,000
	significance	0,586	0,586	0,770	0,433	0,003	0,006	0,003	0,304	0,311	0,001	0,642	0,027	0,557	0,110	0,254	0,920	0,505	0,050	

Tabla Suplementaria 6. Correlaciones de Spearman y p-valor obtenidos en el grupo de pacientes de SS supervivientes; 2ª muestra colectada (Referente a la figura 22B)

		CirchHist (B)	CitrH3 (B)	Quick (B)	SOFATot (B)	APACHEII	Lac6H	Lactate (B)	PCR (B)	Leuco (B)	PMN (B)	Plaq (B)	ProtrombTo	TropUS (B)	DD (B)	APTT (B)	PCA (B)	FuncProtC	PCT (B)	Age
CirchHist (B)	correlation coefficient	1,000	0,343	0,032	0,574	-0,487	-0,014	0,055	0,550	-0,176	0,174	0,134	-0,114	0,801	-0,577	-0,841	0,132	-0,269	0,714	-0,187
	significance		0,302	0,925	0,083	0,129	0,969	0,881	0,080	0,605	0,608	0,695	0,740	0,104	0,608	0,036	0,699	0,425	0,014	0,583
CitrH3 (B)	correlation coefficient	0,343	1,000	0,227	0,281	-0,237	0,211	-0,344	0,086	-0,335	-0,342	-0,072	-0,663	-0,249	-0,396	-0,506	0,518	-0,100	0,301	-0,254
	significance	0,302		0,502	0,431	0,483	0,558	0,331	0,801	0,314	0,304	0,833	0,026	0,686	0,741	0,306	0,103	0,769	0,368	0,451
Quick (B)	correlation coefficient	0,032	0,227	1,000	-0,555	0,167	0,397	-0,709	0,275	0,096	0,110	0,475	-0,546	-0,705	-0,479	-0,462	0,598	0,558	0,437	0,303
	significance	0,925	0,502		0,096	0,623	0,256	0,022	0,413	0,778	0,749	0,140	0,082	0,183	0,682	0,357	0,052	0,074	0,179	0,365
SOFATot (B)	correlation coefficient	0,574	0,281	-0,555	1,000	-0,054	0,059	0,620	0,416	-0,053	0,129	-0,466	0,257	0,803	0,835	0,352	-0,141	-0,672	-0,237	-0,126
	significance	0,083	0,431	0,096		0,883	0,870	0,075	0,231	0,885	0,723	0,174	0,474	0,102	0,371	0,561	0,698	0,033	0,511	0,729
APACHEII	correlation coefficient	-0,487	-0,237	0,167	-0,054	1,000	-0,238	0,030	-0,105	-0,192	0,231	-0,393	0,202	-0,703	0,837	0,663	0,246	-0,054	-0,309	0,529
	significance	0,129	0,483	0,623	0,883		0,508	0,934	0,759	0,572	0,494	0,231	0,552	0,185	0,369	0,152	0,467	0,875	0,355	0,094
Lac6H	correlation coefficient	-0,014	0,211	0,397	0,059	-0,238	1,000	-0,037	0,279	0,826	0,158	0,077	-0,104	0,557	0,292	-0,200	0,209	0,347	0,324	-0,070
	significance	0,969	0,558	0,256	0,870	0,508		0,924	0,435	0,003	0,663	0,832	0,775	0,329	0,811	0,747	0,562	0,326	0,361	0,848
Lactate (B)	correlation coefficient	0,055	-0,344	-0,709	0,620	0,030	-0,037	1,000	0,288	0,297	0,494	-0,270	0,882	0,659	0,863	0,327	-0,422	-0,317	-0,088	0,004
	significance	0,881	0,331	0,022	0,075	0,934	0,924		0,420	0,405	0,147	0,451	0,001	0,226	0,337	0,527	0,225	0,373	0,808	0,992
PCR (B)	correlation coefficient	0,550	0,086	0,275	0,416	-0,105	0,279	0,288	1,000	0,229	0,553	0,266	0,135	0,736	0,902	-0,387	0,123	0,034	0,634	0,083
	significance	0,080	0,801	0,413	0,231	0,759	0,435	0,420		0,497	0,078	0,429	0,691	0,156	0,284	0,448	0,719	0,921	0,036	0,808
Leuco (B)	correlation coefficient	-0,176	-0,335	0,096	-0,053	-0,192	0,826	0,297	0,229	1,000	0,364	0,094	0,336	0,728	0,999	0,023	-0,215	0,373	-0,017	0,030
	significance	0,605	0,314	0,778	0,885	0,572	0,003	0,405	0,497		0,271	0,783	0,312	0,163	0,028	0,966	0,526	0,259	0,962	0,930
PMN (B)	correlation coefficient	0,174	-0,342	0,110	0,129	0,231	0,158	0,494	0,553	0,364	1,000	-0,078	0,547	0,307	0,938	-0,060	0,113	0,265	0,114	0,196
	significance	0,608	0,304	0,749	0,723	0,494	0,663	0,147	0,078	0,271		0,821	0,082	0,616	0,225	0,910	0,740	0,432	0,739	0,564
Plaq (B)	correlation coefficient	0,134	-0,072	0,475	-0,466	-0,393	0,077	-0,270	0,266	0,094	-0,078	1,000	-0,099	-0,525	-0,966	-0,523	0,152	0,550	0,598	0,012
	significance	0,695	0,833	0,140	0,174	0,231	0,832	0,451	0,429	0,783	0,821		0,772	0,364	0,166	0,287	0,655	0,080	0,052	0,973
ProtrombTo	correlation coefficient	-0,114	-0,663	-0,546	0,257	0,202	-0,104	0,882	0,135	0,336	0,547	-0,099	1,000	0,398	0,756	0,368	-0,342	-0,034	-0,113	0,111
	significance	0,740	0,026	0,082	0,474	0,552	0,775	0,001	0,691	0,312	0,082	0,772		0,507	0,455	0,473	0,303	0,922	0,741	0,746
TropUS (B)	correlation coefficient	0,801	-0,249	-0,705	0,803	-0,703	0,557	0,659	0,736	0,728	0,307	-0,525	0,398	1,000		-0,247	-0,924	-0,753	-0,076	0,037
	significance	0,104	0,686	0,183	0,102	0,185	0,329	0,226	0,156	0,163	0,616	0,364	0,507		0,000	0,753	0,025	0,142	0,903	0,953
DD (B)	correlation coefficient	-0,577	-0,396	-0,479	0,835	0,837	0,292	0,863	0,902	0,999	0,938	-0,966	0,756		1,000	0,671	-0,505	0,151	0,385	0,807
	significance	0,608	0,741	0,682	0,371	0,369	0,811	0,337	0,284	0,028	0,225	0,166	0,455			0,532	0,663	0,904	0,748	0,402
APTT (B)	correlation coefficient	-0,841	-0,506	-0,462	0,352	0,663	-0,200	0,327	-0,387	0,023	-0,060	-0,523	0,368	-0,247	0,671	1,000	-0,079	-0,116	-0,779	-0,678
	significance	0,036	0,306	0,357	0,561	0,152	0,747	0,527	0,448	0,966	0,910	0,287	0,473	0,753	0,532		0,882	0,827	0,068	0,139
PCA (B)	correlation coefficient	0,132	0,518	0,598	-0,141	0,246	0,209	-0,422	0,123	-0,215	0,113	0,152	-0,342	-0,924	-0,505	-0,079	1,000	0,490	0,399	-0,232
	significance	0,699	0,103	0,052	0,698	0,467	0,562	0,225	0,719	0,526	0,740	0,655	0,303	0,025	0,663	0,882		0,126	0,225	0,493
FuncProtC	correlation coefficient	-0,269	-0,100	0,558	-0,672	-0,054	0,347	-0,317	0,034	0,373	0,265	0,550	-0,034	-0,753	0,151	-0,116	0,490	1,000	0,233	-0,190
	significance	0,425	0,769	0,074	0,033	0,875	0,326	0,373	0,921	0,259	0,432	0,080	0,922	0,142	0,904	0,827	0,126		0,490	0,576
PCT (B)	correlation coefficient	0,714	0,301	0,437	-0,237	-0,309	0,324	-0,088	0,634	-0,017	0,114	0,598	-0,113	-0,076	0,385	-0,779	0,399	0,233	1,000	-0,025
	significance	0,014	0,368	0,179	0,511	0,355	0,361	0,808	0,036	0,962	0,739	0,052	0,741	0,903	0,748	0,068	0,225	0,490		0,942
Age	correlation coefficient	-0,187	-0,254	0,303	-0,126	0,529	-0,070	0,004	0,083	0,030	0,196	0,012	0,111	0,037	0,807	-0,678	-0,232	-0,190	-0,025	1,000
	significance	0,583	0,451	0,365	0,729	0,094	0,848	0,992	0,808	0,930	0,564	0,973	0,746	0,953	0,402	0,139	0,493	0,576	0,942	

Tabla Suplementaria 7. Correlaciones de Spearman y p-valor obtenidos en el grupo de pacientes de SS supervivientes; 3ª muestra colectada (Referente a la figura 22C).

		CircHist (C)	CitrH3 (C)	Quick (C)	SOFA <sup>Tot</sup> (C)	APACHEII	Lac6H	Lactate (C)	PCR (C)	Leuco (C)	PMN (C)	Plaq (C)	ProtrombTo	TropUS-C	DD (C)	APTT (C)	PCA (C)	FuncProtC	PCT (C)	Age
CircHist (C)	correlation coefficient	1,000	-0,073	0,335	0,555	0,205	0,450	0,234	0,745	0,758	0,539	0,236	-0,352	-0,700	0,000	-0,400	0,282	-0,009	0,624	0,092
	significance		0,833	0,375	0,126	0,543	0,194	0,540	0,017	0,015	0,114	0,513	0,287	0,233	1,000	0,517	0,402	0,983	0,060	0,789
CitrH3 (C)	correlation coefficient	-0,073	1,000	-0,109	-0,262	-0,486	0,122	-0,471	0,389	-0,225	-0,486	0,419	-0,611	-0,300	-1,000	-0,051	0,128	0,292	0,182	-0,194
	significance	0,833		0,780	0,489	0,130	0,736	0,202	0,266	0,529	0,157	0,227	0,049	0,683	0,083	1,000	0,708	0,379	0,614	0,563
Quick (C)	correlation coefficient	0,335	-0,109	1,000	0,235	0,546	0,204	-0,192	0,084	0,218	0,126	0,008	-0,252	-0,400	-0,400	0,000	0,628	0,345	0,494	-0,180
	significance	0,375	0,780		0,565	0,131	0,631	0,646	0,834	0,572	0,751	0,992	0,507	0,750	0,750	1,000	0,077	0,360	0,180	0,635
SOFA <sup>Tot</sup> (C)	correlation coefficient	0,555	-0,262	0,235	1,000	-0,397	0,030	0,741	0,134	0,429	0,588	-0,563	-0,059	0,205	0,800	-0,600	0,143	-0,563	0,504	-0,664
	significance	0,126	0,489	0,565		0,286	0,943	0,041	0,732	0,250	0,102	0,120	0,881	0,733	0,333	0,350	0,713	0,120	0,170	0,056
APACHEII	correlation coefficient	0,205	-0,486	0,546	-0,397	1,000	-0,085	-0,252	0,146	0,310	0,085	0,267	0,451	-0,100	0,400	0,103	0,055	0,260	0,036	0,527
	significance	0,543	0,130	0,131	0,286		0,815	0,506	0,687	0,380	0,818	0,452	0,164	0,950	0,750	0,900	0,875	0,435	0,926	0,098
Lac6H	correlation coefficient	0,450	0,122	0,204	0,030	-0,085	1,000	-0,331	0,285	0,477	0,134	0,301	-0,541	-0,872	-0,600	-0,600	0,790	0,432	0,100	0,058
	significance	0,194	0,736	0,631	0,943	0,815		0,415	0,454	0,198	0,732	0,428	0,109	0,067	0,417	0,350	0,009	0,213	0,800	0,874
Lactate (C)	correlation coefficient	0,234	-0,471	-0,192	0,741	-0,252	-0,331	1,000	0,184	0,544	0,552	-0,444	0,515	0,400	1,000	0,200	-0,176	-0,444	0,100	-0,513
	significance	0,540	0,202	0,646	0,041	0,506	0,415		0,634	0,135	0,128	0,234	0,158	0,750	0,333	0,783	0,653	0,234	0,800	0,159
PCR (C)	correlation coefficient	0,745	0,389	0,084	0,134	0,146	0,285	0,184	1,000	0,697	0,442	0,552	-0,274	-0,700	0,000	-0,300	0,164	0,480	0,418	0,198
	significance	0,017	0,266	0,834	0,732	0,687	0,454	0,634		0,031	0,204	0,105	0,440	0,233	1,000	0,683	0,657	0,162	0,233	0,582
Leuco (C)	correlation coefficient	0,758	-0,225	0,218	0,429	0,310	0,477	0,544	0,697	1,000	0,661	0,152	0,110	-0,300	0,800	-0,100	0,467	0,413	0,382	-0,049
	significance	0,015	0,529	0,572	0,250	0,380	0,198	0,135	0,031		0,044	0,682	0,764	0,683	0,333	0,950	0,179	0,235	0,279	0,897
PMN (C)	correlation coefficient	0,539	-0,486	0,126	0,588	0,085	0,134	0,552	0,442	0,661	1,000	-0,152	0,018	0,300	1,000	-0,300	0,115	0,164	0,527	-0,031
	significance	0,114	0,157	0,751	0,102	0,818	0,732	0,128	0,204	0,044		0,682	0,966	0,683	0,083	0,683	0,759	0,649	0,123	0,938
Plaq (C)	correlation coefficient	0,236	0,419	0,008	-0,563	0,267	0,301	-0,444	0,552	0,152	-0,152	1,000	-0,378	-0,300	-0,800	0,600	0,273	0,723	-0,261	0,463
	significance	0,513	0,227	0,992	0,120	0,452	0,428	0,234	0,105	0,682	0,682		0,280	0,683	0,333	0,350	0,448	0,022	0,470	0,180
ProtrombTo	correlation coefficient	-0,352	-0,611	-0,252	-0,059	0,451	-0,541	0,515	-0,274	0,110	0,018	-0,378	1,000	0,359	1,000	0,200	-0,397	-0,201	-0,354	0,167
	significance	0,287	0,049	0,507	0,881	0,164	0,109	0,158	0,440	0,764	0,966	0,280		0,633	0,083	0,783	0,226	0,548	0,314	0,620
TropUS-C	correlation coefficient	-0,700	-0,300	-0,400	0,205	-0,100	-0,872	0,400	-0,700	-0,300	0,300	-0,300	0,359	1,000	0,500	-1,000	-1,000	-0,900	0,300	0,500
	significance	0,233	0,683	0,750	0,733	0,950	0,067	0,750	0,233	0,683	0,683	0,683	0,633		1,000	0,333	0,017	0,083	0,683	0,450
DD (C)	correlation coefficient	0,000	-1,000	-0,400	0,800	0,400	-0,600	1,000	0,000	0,800	1,000	-0,800	1,000	0,500	1,000	-0,500	-0,600	-0,600	0,200	0,000
	significance	1,000	0,083	0,750	0,333	0,750	0,417	0,333	1,000	0,333	0,083	0,333	0,083	1,000		1,000	0,417	0,417	0,917	1,000
APTT (C)	correlation coefficient	-0,400	-0,051	0,000	-0,600	0,103	-0,600	0,200	-0,300	-0,100	-0,300	0,600	0,200	-1,000	-0,500	1,000	-0,300	0,000	-0,400	-0,791
	significance	0,517	1,000	1,000	0,350	0,900	0,350	0,783	0,683	0,950	0,683	0,350	0,783	0,333	1,000		0,683	1,000	0,517	0,133
PCA (C)	correlation coefficient	0,282	0,128	0,628	0,143	0,055	0,790	-0,176	0,164	0,467	0,115	0,273	-0,397	-1,000	-0,600	-0,300	1,000	0,574	0,115	-0,309
	significance	0,402	0,708	0,077	0,713	0,875	0,009	0,653	0,657	0,179	0,759	0,448	0,226	0,017	0,417	0,683	0,069	0,759	0,353	
FuncProtC	correlation coefficient	-0,009	0,292	0,345	-0,563	0,260	0,432	-0,444	0,480	0,413	0,164	0,723	-0,201	-0,900	-0,600	0,000	0,574	1,000	0,085	0,102
	significance	0,983	0,379	0,360	0,120	0,435	0,213	0,234	0,162	0,235	0,649	0,022	0,548	0,083	0,417	1,000	0,069		0,818	0,764
PCT (C)	correlation coefficient	0,624	0,182	0,494	0,504	0,036	0,100	0,100	0,418	0,382	0,527	-0,261	-0,354	0,300	0,200	-0,400	0,115	0,085	1,000	-0,179
	significance	0,060	0,614	0,180	0,170	0,926	0,800	0,800	0,233	0,279	0,123	0,470	0,314	0,683	0,917	0,517	0,759	0,818		0,619
Age	correlation coefficient	0,092	-0,194	-0,180	-0,664	0,527	0,058	-0,513	0,198	-0,049	-0,031	0,463	0,167	0,500	0,000	-0,791	-0,309	0,102	-0,179	1,000
	significance	0,789	0,563	0,635	0,056	0,098	0,874	0,159	0,582	0,897	0,938	0,180	0,620	0,450	1,000	0,133	0,353	0,764	0,619	

Tabla Suplementaria 8. Correlaciones de Spearman y p-valor obtenidos en el grupo de pacientes de SS no supervivientes; 1ª muestra colectada (Referente a la figura 23A).

		CircHist (A)	CitrH3 (A)	Quick (A)	SOFATot (A)	APACHEII	Lac6H	Lactate (A)	PCR (A)	Leuco (A)	PMN (A)	Plaq (A)	ProtrombTot	TropUS (A)	DD (A)	APTT (A)	PCA (A)	FuncProtC	PCT (A)	Age
CircHist (A)	correlation coefficient	1,000	0,914	-0,614	-0,124	-0,284	0,542	0,851	-0,264	0,803	-0,619	-0,161	-0,160	-0,069	-0,007	0,036	-0,117	-0,284	-0,257	-0,865
	significance		0,000	0,005	0,614	0,239	0,017	0,000	0,274	0,000	0,005	0,511	0,513	0,778	0,977	0,884	0,634	0,239	0,288	0,000
CitrH3 (A)	correlation coefficient	0,914	1,000	-0,489	-0,157	-0,317	0,473	0,696	-0,199	0,629	-0,572	-0,198	-0,024	-0,199	0,065	-0,205	-0,292	-0,317	-0,241	-0,954
	significance	0,000		0,034	0,521	0,186	0,041	0,001	0,413	0,004	0,011	0,418	0,923	0,413	0,791	0,401	0,225	0,186	0,319	0,000
Quick (A)	correlation coefficient	-0,614	-0,489	1,000	0,377	0,435	-0,939	-0,874	0,700	-0,888	0,875	0,403	0,689	-0,638	0,473	-0,435	0,008	0,435	0,608	0,371
	significance	0,005	0,034		0,112	0,063	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,087	0,001	0,003	0,041	0,063	0,974	0,063	0,006	0,117
SOFATot (A)	correlation coefficient	-0,124	-0,157	0,377	1,000	0,968	-0,478	-0,159	0,816	-0,124	0,468	0,995	0,776	-0,248	0,785	0,322	0,798	0,968	0,882	0,131
	significance	0,614	0,521	0,112		0,000	0,038	0,516	0,000	0,614	0,043	0,000	0,000	0,305	0,000	0,179	0,000	0,000	0,000	0,593
APACHEII	correlation coefficient	-0,284	-0,317	0,435	0,968	1,000	-0,505	-0,259	0,789	-0,212	0,515	0,975	0,717	-0,194	0,733	0,356	0,824	1,000	0,893	0,284
	significance	0,239	0,186	0,063	0,000		0,027	0,284	0,000	0,385	0,024	0,000	0,001	0,426	0,000	0,135	0,000	0,000	0,000	0,239
Lac6H	correlation coefficient	0,542	0,473	-0,939	-0,478	-0,505	1,000	0,758	-0,784	0,745	-0,956	-0,500	-0,754	0,605	-0,581	0,266	-0,148	-0,505	-0,705	-0,342
	significance	0,017	0,041	0,000	0,038	0,027		0,000	0,000	0,000	0,000	0,029	0,000	0,006	0,009	0,271	0,544	0,027	0,001	0,152
Lactate (A)	correlation coefficient	0,851	0,696	-0,874	-0,159	-0,259	0,758	1,000	-0,464	0,986	-0,752	-0,196	-0,444	0,298	-0,163	0,401	0,078	-0,259	-0,377	-0,617
	significance	0,000	0,001	0,000	0,516	0,284	0,000		0,045	0,000	0,000	0,422	0,057	0,216	0,504	0,089	0,751	0,284	0,112	0,005
PCR (A)	correlation coefficient	-0,264	-0,199	0,700	0,816	0,789	-0,784	-0,464	1,000	-0,440	0,719	0,824	0,937	-0,591	0,832	-0,089	0,471	0,789	0,939	0,090
	significance	0,274	0,413	0,001	0,000	0,000	0,000	0,045		0,059	0,001	0,000	0,000	0,008	0,000	0,718	0,042	0,000	0,000	0,713
Leuco (A)	correlation coefficient	0,803	0,629	-0,888	-0,124	-0,212	0,745	0,986	-0,440	1,000	-0,714	-0,154	-0,436	0,354	-0,142	0,475	0,147	-0,212	-0,326	-0,561
	significance	0,000	0,004	0,000	0,614	0,385	0,000	0,000	0,059		0,001	0,530	0,062	0,137	0,561	0,040	0,549	0,385	0,174	0,012
PMN (A)	correlation coefficient	-0,619	-0,572	0,875	0,468	0,515	-0,956	-0,752	0,719	-0,714	1,000	0,494	0,702	-0,436	0,538	-0,120	0,201	0,515	0,693	0,452
	significance	0,005	0,011	0,000	0,043	0,024	0,000	0,000	0,001	0,001		0,031	0,001	0,062	0,018	0,624	0,409	0,024	0,001	0,052
Plaq (A)	correlation coefficient	-0,161	-0,198	0,403	0,995	0,975	-0,500	-0,196	0,824	-0,154	0,494	1,000	0,775	-0,255	0,777	0,312	0,791	0,975	0,902	0,159
	significance	0,511	0,418	0,087	0,000	0,000	0,029	0,422	0,000	0,530	0,031		0,000	0,291	0,000	0,194	0,000	0,000	0,000	0,516
ProtrombTot	correlation coefficient	-0,160	-0,024	0,689	0,776	0,717	-0,754	-0,444	0,937	-0,436	0,702	0,775	1,000	-0,599	0,822	-0,185	0,344	0,717	0,871	-0,054
	significance	0,513	0,923	0,001	0,000	0,001	0,000	0,057	0,000	0,062	0,001	0,000		0,007	0,000	0,449	0,150	0,001	0,000	0,827
TropUS (A)	correlation coefficient	-0,069	-0,199	-0,638	-0,248	-0,194	0,605	0,298	-0,591	0,354	-0,436	-0,255	-0,599	1,000	-0,635	0,656	0,233	-0,194	-0,466	0,343
	significance	0,778	0,413	0,003	0,305	0,426	0,006	0,216	0,008	0,137	0,062	0,291	0,007		0,003	0,002	0,338	0,426	0,044	0,150
DD (A)	correlation coefficient	-0,007	0,065	0,473	0,785	0,733	-0,581	-0,163	0,832	-0,142	0,538	0,777	0,822	-0,635	1,000	-0,061	0,418	0,733	0,876	-0,165
	significance	0,977	0,791	0,041	0,000	0,000	0,009	0,504	0,000	0,561	0,018	0,000	0,000	0,003		0,803	0,075	0,000	0,000	0,499
APTT (A)	correlation coefficient	0,036	-0,205	-0,435	0,322	0,356	0,266	0,401	-0,089	0,475	-0,120	0,312	-0,185	0,656	-0,061	1,000	0,724	0,356	0,075	0,291
	significance	0,884	0,401	0,063	0,179	0,135	0,271	0,089	0,718	0,040	0,624	0,194	0,449	0,002	0,803		0,000	0,135	0,761	0,227
PCA (A)	correlation coefficient	-0,117	-0,292	0,008	0,798	0,824	-0,148	0,078	0,471	0,147	0,201	0,791	0,344	0,233	0,418	0,724	1,000	0,824	0,614	0,363
	significance	0,634	0,225	0,974	0,000	0,000	0,544	0,751	0,042	0,549	0,409	0,000	0,150	0,338	0,075	0,000		0,000	0,005	0,127
FuncProtC	correlation coefficient	-0,284	-0,317	0,435	0,968	1,000	-0,505	-0,259	0,789	-0,212	0,515	0,975	0,717	-0,194	0,733	0,356	0,824	1,000	0,893	0,284
	significance	0,239	0,186	0,063	0,000	0,000	0,027	0,284	0,000	0,385	0,024	0,000	0,001	0,426	0,000	0,135	0,000		0,000	0,239
PCT (A)	correlation coefficient	-0,257	-0,241	0,608	0,882	0,893	-0,705	-0,377	0,939	-0,326	0,693	0,902	0,871	-0,466	0,876	0,075	0,614	0,893	1,000	0,140
	significance	0,288	0,319	0,006	0,000	0,000	0,001	0,112	0,000	0,174	0,001	0,000	0,000	0,044	0,000	0,761	0,005	0,000		0,569
Age	correlation coefficient	-0,865	-0,954	0,371	0,131	0,284	-0,342	-0,617	0,090	-0,561	0,452	0,159	-0,054	0,343	-0,165	0,291	0,363	0,284	0,140	1,000
	significance	0,000	0,000	0,117	0,593	0,239	0,152	0,005	0,713	0,012	0,052	0,516	0,827	0,150	0,499	0,227	0,127	0,239	0,569	



Tabla Suplementaria 10. Correlaciones de Spearman y p-valor obtenidos en el grupo de pacientes de SS no supervivientes; 2ª muestra colectada (Referente a la figura 23B)

		CircHist (B)	CitrH3 (B)	Quick (B)	SOFATot (B)	APACHEII	Lac6H	Lactate (B)	PCR (B)	Leuco (B)	PMN (B)	Plaq (B)	ProtrombTot	TropUS (B)	DD (B)	APTT (B)	PCA (B)	FuncProtC	PCT (B)	Age
CircHist (B)	correlation coefficient	1,000	0,800	0,000	0,400	0,400	-0,400	0,000	0,000	0,600	0,200	0,400	1,000	-1,000		-0,500	0,200	0,400	-0,600	-0,400
	significance		0,038	1,000	0,385	0,385	0,385	1,000	1,000	0,166	0,717	0,385	0,022	0,022		0,422	0,717	0,385	0,166	0,385
CitrH3 (B)	correlation coefficient	0,800	1,000	-0,400	-0,200	0,000	0,200	0,400	-0,400	0,800	-0,400	0,000	0,500	-1,000		-0,500	-0,400	0,000	-0,800	-0,800
	significance	0,038		0,385	0,717	1,000	0,717	0,385	0,385	0,038	0,385	1,000	0,422	0,022		0,422	0,385	1,000	0,038	0,038
Quick (B)	correlation coefficient	0,000	-0,400	1,000	0,800	-0,200	-0,800	-1,000	1,000	-0,800	0,400	-0,200	0,500	-0,500		-1,000	0,400	-0,200	0,800	0,200
	significance	1,000	0,385		0,038	0,717	0,038	0,001	0,001	0,038	0,385	0,717	0,422	0,422		0,022	0,385	0,717	0,038	0,717
SOFATot (B)	correlation coefficient	0,400	-0,200	0,800	1,000	0,400	-1,000	-0,800	0,800	-0,400	0,800	0,400	0,500	-1,000		-0,500	0,800	0,400	0,400	0,400
	significance	0,385	0,717	0,038		0,385	0,001	0,038	0,038	0,385	0,038	0,385	0,422	0,022		0,422	0,038	0,385	0,385	0,385
APACHEII	correlation coefficient	0,400	0,000	-0,200	0,400	1,000	-0,400	0,200	-0,200	0,400	0,800	1,000	0,500	-0,500		0,500	0,800	1,000	-0,400	0,600
	significance	0,385	1,000	0,717	0,385		0,385	0,717	0,717	0,385	0,038	0,001	0,422	0,422		0,422	0,038	0,001	0,385	0,166
Lac6H	correlation coefficient	-0,400	0,200	-0,800	-1,000	-0,400	1,000	0,800	-0,800	0,400	-0,800	-0,400	-0,500	1,000		0,500	-0,800	-0,400	-0,400	-0,400
	significance	0,385	0,717	0,038	0,001	0,385		0,038	0,038	0,385	0,038	0,385	0,422	0,022		0,422	0,038	0,385	0,385	0,385
Lactate (B)	correlation coefficient	0,000	0,400	-1,000	-0,800	0,200	0,800	1,000	-1,000	0,800	-0,400	0,200	-0,500	0,500		1,000	-0,400	0,200	-0,800	-0,200
	significance	1,000	0,385	0,001	0,038	0,717	0,038		0,001	0,038	0,385	0,717	0,422	0,422		0,022	0,385	0,717	0,038	0,717
PCR (B)	correlation coefficient	0,000	-0,400	1,000	0,800	-0,200	-0,800	-1,000	1,000	-0,800	0,400	-0,200	0,500	-0,500		-1,000	0,400	-0,200	0,800	0,200
	significance	1,000	0,385	0,001	0,038	0,717	0,038	0,001		0,038	0,385	0,717	0,422	0,422		0,022	0,385	0,717	0,038	0,717
Leuco (B)	correlation coefficient	0,600	0,800	-0,800	-0,400	0,400	0,400	0,800	-0,800	1,000	-0,200	0,400	0,500	-0,500		0,500	-0,200	0,400	-1,000	-0,400
	significance	0,166	0,038	0,038	0,385	0,385	0,385	0,038	0,038		0,717	0,385	0,422	0,422		0,422	0,717	0,385	0,001	0,385
PMN (B)	correlation coefficient	0,200	-0,400	0,400	0,800	0,800	-0,800	-0,400	0,400	-0,200	1,000	0,800	0,500	-0,500		0,500	1,000	0,800	0,200	0,800
	significance	0,717	0,385	0,385	0,038	0,038	0,038	0,385	0,385	0,717		0,038	0,422	0,422		0,422	0,001	0,038	0,717	0,038
Plaq (B)	correlation coefficient	0,400	0,000	-0,200	0,400	1,000	-0,400	0,200	-0,200	0,400	0,800	1,000	0,500	-0,500		0,500	0,800	1,000	-0,400	0,600
	significance	0,385	1,000	0,717	0,385	0,001	0,385	0,717	0,717	0,385	0,038		0,422	0,422		0,422	0,038	0,001	0,385	0,166
ProtrombTot	correlation coefficient	1,000	0,500	0,500	0,500	0,500	-0,500	-0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	1,000	-1,000		-1,000	0,500	0,500	-0,500	-0,500
	significance	0,022	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,333		0,333	0,422	0,422	0,422	0,422
TropUS (B)	correlation coefficient	-1,000	-1,000	-0,500	-1,000	-0,500	1,000	0,500	-0,500	-0,500	-0,500	-0,500	-1,000	1,000		0,500	-0,500	-0,500	0,500	0,500
	significance	0,022	0,022	0,422	0,022	0,422	0,022	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,333			0,422	0,422	0,422	0,422	0,422
DD (B)	correlation coefficient																			
	significance																			
APTT (B)	correlation coefficient	-0,500	-0,500	-1,000	-0,500	0,500	0,500	1,000	-1,000	0,500	0,500	0,500	-1,000	0,500		1,000	0,500	0,500	-0,500	1,000
	significance	0,422	0,422	0,022	0,422	0,422	0,422	0,022	0,022	0,422	0,422	0,422	0,333	0,422			0,422	0,422	0,422	0,022
PCA (B)	correlation coefficient	0,200	-0,400	0,400	0,800	0,800	-0,800	-0,400	0,400	-0,200	1,000	0,800	0,500	-0,500		0,500	1,000	0,800	0,200	0,800
	significance	0,717	0,385	0,385	0,038	0,038	0,038	0,385	0,385	0,717	0,001	0,038	0,422	0,422		0,422	0,038	0,038	0,717	0,038
FuncProtC	correlation coefficient	0,400	0,000	-0,200	0,400	1,000	-0,400	0,200	-0,200	0,400	0,800	1,000	0,500	-0,500		0,500	0,800	1,000	-0,400	0,600
	significance	0,385	1,000	0,717	0,385	0,001	0,385	0,717	0,717	0,385	0,038	0,001	0,422	0,422		0,422	0,038		0,385	0,166
PCT (B)	correlation coefficient	-0,600	-0,800	0,800	0,400	-0,400	-0,400	-0,800	0,800	-1,000	0,200	-0,400	-0,500	0,500		-0,500	0,200	-0,400	1,000	0,400
	significance	0,166	0,038	0,038	0,385	0,385	0,385	0,038	0,038	0,001	0,717	0,385	0,422	0,422		0,422	0,717	0,385		0,385
Age	correlation coefficient	-0,400	-0,800	0,200	0,400	0,600	-0,400	-0,200	0,200	-0,400	0,800	0,600	-0,500	0,500		1,000	0,800	0,600	0,400	1,000
	significance	0,385	0,038	0,717	0,385	0,166	0,385	0,717	0,717	0,385	0,038	0,166	0,422	0,422		0,022	0,038	0,166	0,385	

Tabla 24. Correlaciones de Spearman y p-valor obtenidos en el grupo de pacientes de SS no supervivientes; 3ª muestra colectada (Referente a la figura 23C)

		CircHist (C)	CitrH3 (C)	Quick (C)	SOFATot (C)	APACHEII	Lac6H	Lactate (C)	PCR (C)	Leuco (C)	PMN (C)	Plaq (C)	ProtrombTot	TropUS-C	DD (C)	APTT (C)	PCA (C)	FuncProtC	PCT (C)	Age
CircHist (C)	correlation coefficient	1,000	0,400	-0,200	0,000	0,800	0,000	0,000	-0,800	1,000	-0,400	0,800	-0,500	0,500		1,000	-0,200	0,800	-0,200	0,800
	significance		0,385	0,717	1,000	0,038	1,000	1,000	0,038	0,001	0,385	0,038	0,422	0,422		0,022	0,717	0,038	0,717	0,038
CitrH3 (C)	correlation coefficient	0,400	1,000	-0,800	-0,800	0,200	0,800	0,800	-0,200	0,400	-0,600	-0,200	-0,500	0,500		1,000	-0,800	0,200	-0,800	-0,200
	significance	0,385		0,038	0,038	0,717	0,038	0,038	0,717	0,385	0,166	0,717	0,422	0,422		0,022	0,038	0,717	0,038	0,717
Quick (C)	correlation coefficient	-0,200	-0,800	1,000	0,400	-0,400	-0,400	-0,400	0,400	-0,200	0,000	0,400	-0,500	0,500		-0,500	1,000	-0,400	1,000	0,400
	significance	0,717	0,038		0,385	0,385	0,385	0,385	0,385	0,717	1,000	0,385	0,422	0,422		0,422	0,001	0,385	0,001	0,385
SOFATot (C)	correlation coefficient	0,000	-0,800	0,400	1,000	0,400	-1,000	-1,000	-0,400	0,000	0,800	0,400	0,500	-1,000		-0,500	0,400	0,400	0,400	0,400
	significance	1,000	0,038	0,385		0,385	0,001	0,001	0,385	1,000	0,038	0,385	0,422	0,022		0,422	0,385	0,385	0,385	0,385
APACHEII	correlation coefficient	0,800	0,200	-0,400	0,400	1,000	-0,400	-0,400	-1,000	0,800	0,200	0,600	0,500	-0,500		0,500	-0,400	1,000	-0,400	0,600
	significance	0,038	0,717	0,385	0,385		0,385	0,385	0,001	0,038	0,717	0,166	0,422	0,422		0,422	0,385	0,001	0,385	0,166
Lac6H	correlation coefficient	0,000	0,800	-0,400	-1,000	-0,400	1,000	1,000	0,400	0,000	-0,800	-0,400	-0,500	1,000		0,500	-0,400	-0,400	-0,400	-0,400
	significance	1,000	0,038	0,385	0,001	0,385		0,001	0,385	1,000	0,038	0,385	0,422	0,022		0,422	0,385	0,385	0,385	0,385
Lactate (C)	correlation coefficient	0,000	0,800	-0,400	-1,000	-0,400	1,000	1,000	0,400	0,000	-0,800	-0,400	-0,500	1,000		0,500	-0,400	-0,400	-0,400	-0,400
	significance	1,000	0,038	0,385	0,001	0,385	0,001		0,385	1,000	0,038	0,385	0,422	0,022		0,422	0,385	0,385	0,385	0,385
PCR (C)	correlation coefficient	-0,800	-0,200	0,400	-0,400	-1,000	0,400	0,400	1,000	-0,800	-0,200	-0,600	-0,500	0,500		-0,500	0,400	-1,000	0,400	-0,600
	significance	0,038	0,717	0,385	0,385	0,001	0,385	0,385		0,038	0,717	0,166	0,422	0,422		0,422	0,385	0,001	0,385	0,166
Leuco (C)	correlation coefficient	1,000	0,400	-0,200	0,000	0,800	0,000	0,000	-0,800	1,000	-0,400	0,800	-0,500	0,500		1,000	-0,200	0,800	-0,200	0,800
	significance	0,001	0,385	0,717	1,000	0,038	1,000	1,000	0,038		0,385	0,038	0,422	0,422		0,022	0,717	0,038	0,717	0,038
PMN (C)	correlation coefficient	-0,400	-0,600	0,000	0,800	0,200	-0,800	-0,800	-0,200	-0,400	1,000	-0,200	1,000	-1,000		-0,500	0,000	0,200	0,000	-0,200
	significance	0,385	0,166	1,000	0,038	0,717	0,038	0,038	0,717	0,385		0,717	0,022	0,022		0,422	1,000	0,717	1,000	0,717
Plaq (C)	correlation coefficient	0,800	-0,200	0,400	0,400	0,600	-0,400	-0,400	-0,600	0,800	-0,200	1,000	-0,500	0,500		1,000	0,400	0,600	0,400	1,000
	significance	0,038	0,717	0,385	0,385	0,166	0,385	0,385	0,166	0,038	0,717		0,422	0,422		0,022	0,385	0,166	0,385	0,001
ProtrombTot	correlation coefficient	-0,500	-0,500	-0,500	0,500	0,500	-0,500	-0,500	-0,500	-0,500	1,000	-0,500	1,000	-1,000		-1,000	-0,500	0,500	-0,500	-0,500
	significance	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,022	0,422		0,333		0,333	0,422	0,422	0,422	0,422
TropUS-C	correlation coefficient	0,500	0,500	0,500	-1,000	-0,500	1,000	1,000	0,500	0,500	-1,000	0,500	-1,000	1,000		0,500	0,500	-0,500	0,500	0,500
	significance	0,422	0,422	0,422	0,022	0,422	0,022	0,422	0,422	0,422	0,022	0,422	0,333			0,422	0,422	0,422	0,422	0,422
DD (C)	correlation coefficient																			
	significance																			
APTT (C)	correlation coefficient	1,000	1,000	-0,500	-0,500	0,500	0,500	0,500	-0,500	1,000	-0,500	1,000	-1,000	0,500		1,000	-0,500	0,500	-0,500	1,000
	significance	0,022	0,022	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,022	0,422	0,022	0,333	0,422			0,422	0,422	0,422	0,022
PCA (C)	correlation coefficient	-0,200	-0,800	1,000	0,400	-0,400	-0,400	-0,400	0,400	-0,200	0,000	0,400	-0,500	0,500		-0,500	1,000	-0,400	1,000	0,400
	significance	0,717	0,038	0,001	0,385	0,385	0,385	0,385	0,385	0,717	1,000	0,385	0,422	0,422		0,422		0,385	0,001	0,385
FuncProtC	correlation coefficient	0,800	0,200	-0,400	0,400	1,000	-0,400	-0,400	-1,000	0,800	0,200	0,600	0,500	-0,500		0,500	-0,400	1,000	-0,400	0,600
	significance	0,038	0,717	0,385	0,385	0,001	0,385	0,385	0,001	0,038	0,717	0,166	0,422	0,422		0,422	0,385		0,385	0,166
PCT (C)	correlation coefficient	-0,200	-0,800	1,000	0,400	-0,400	-0,400	-0,400	0,400	-0,200	0,000	0,400	-0,500	0,500		-0,500	1,000	-0,400	1,000	0,400
	significance	0,717	0,038	0,001	0,385	0,385	0,385	0,385	0,385	0,717	1,000	0,385	0,422	0,422		0,422	0,001	0,385		0,385
Age	correlation coefficient	0,800	-0,200	0,400	0,400	0,600	-0,400	-0,400	-0,600	0,800	-0,200	1,000	-0,500	0,500		1,000	0,400	0,600	0,400	1,000
	significance	0,038	0,717	0,385	0,385	0,166	0,385	0,385	0,166	0,038	0,717	0,001	0,422	0,422		0,022	0,385	0,166	0,385	

➤ PROMOTORES Y GENES CON METILACIÓN DIFERENCIAL ENTRE ECC Y SEPSIS  
(APARTADO 5.10.1.1.)

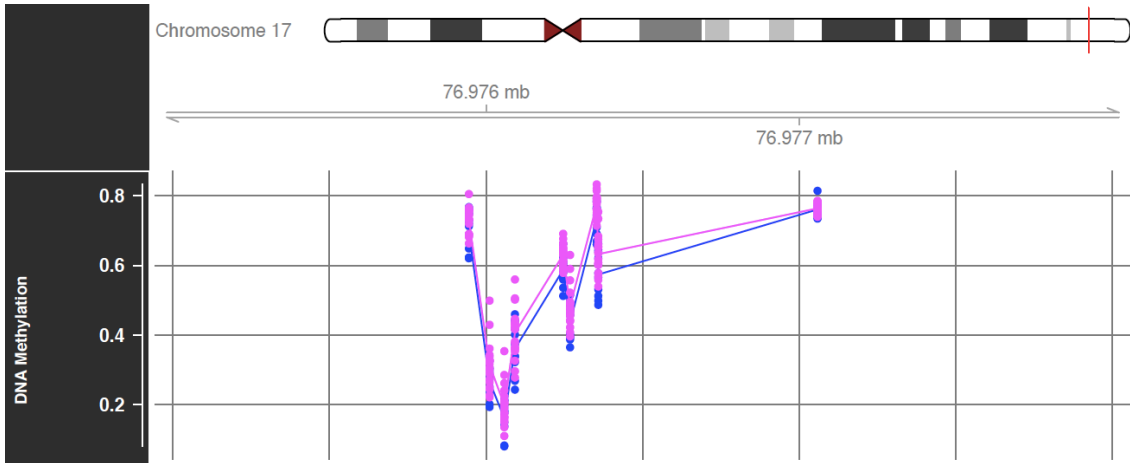


Figura Suplementaria 1. Representación mCSEA para el promotor *LGALS3BP*. El color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con ECC, el color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con sepsis.

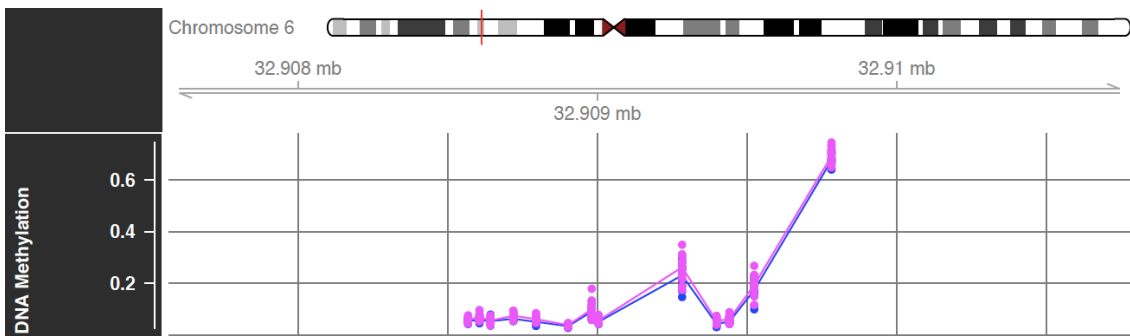
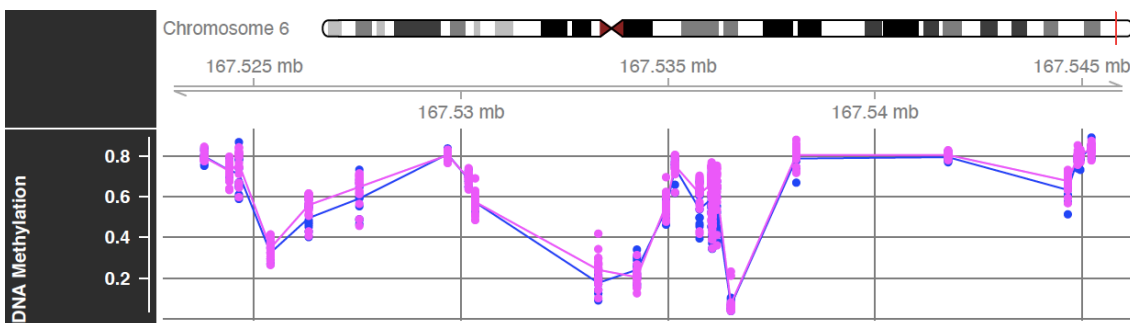
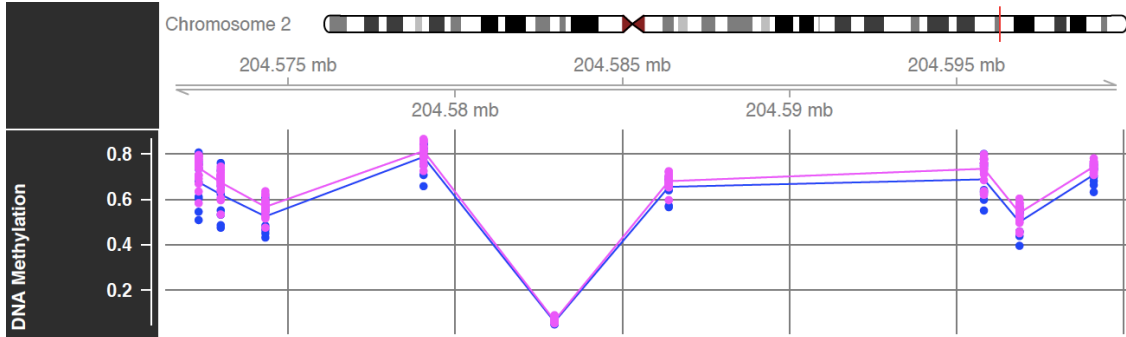


Figura Suplementaria 2. Representación mCSEA para el promotor *HLA-DMB*. El color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con ECC, el color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con sepsis.



**Figura Suplementaria 3. Representación mCSEA para el promotor *CCR6*.** El color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con ECC, el color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con sepsis.



**Figura anexa 1. Representación mCSEA para el gen *CD28*.** El color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con ECC, el color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con sepsis.

➤ PROMOTORES Y GENES CON METILACIÓN DIFERENCIAL ENTRE PICS Y ECC  
(APARTADO 5.10.2.1)

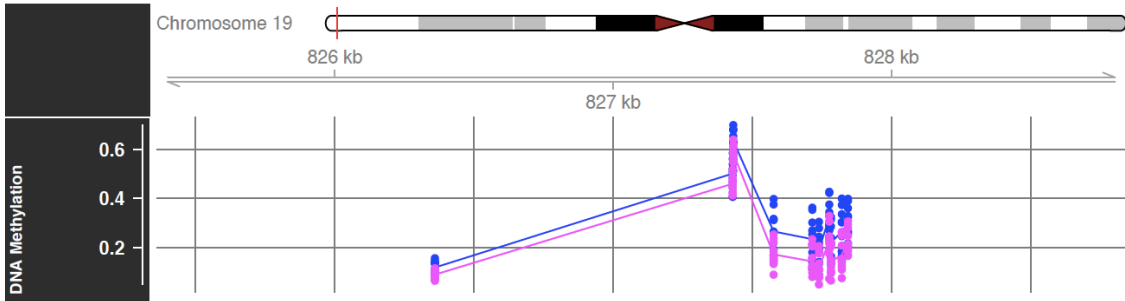


Figura Suplementaria 5. Representación mCSEA para el promotor *AZU1*. El color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con PICS, el color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con ECC.

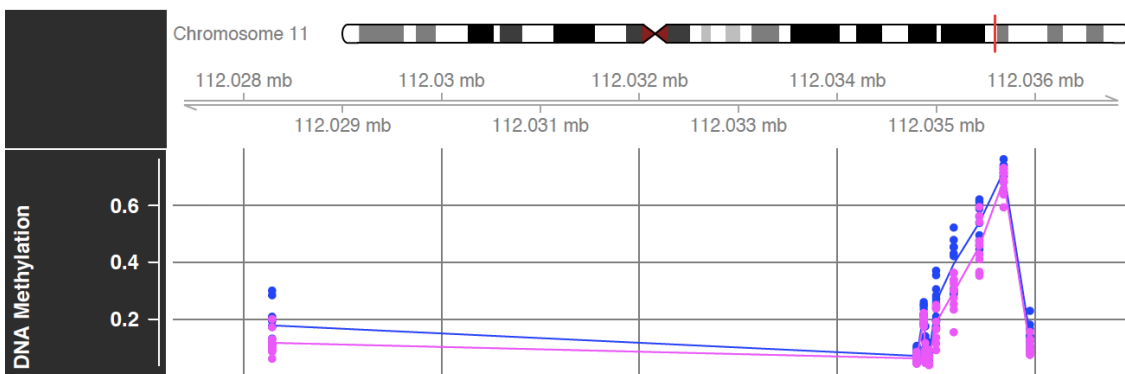


Figura Suplementaria 6. Representación mCSEA para el promotor *IL18*. El color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con PICS, el color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con ECC.

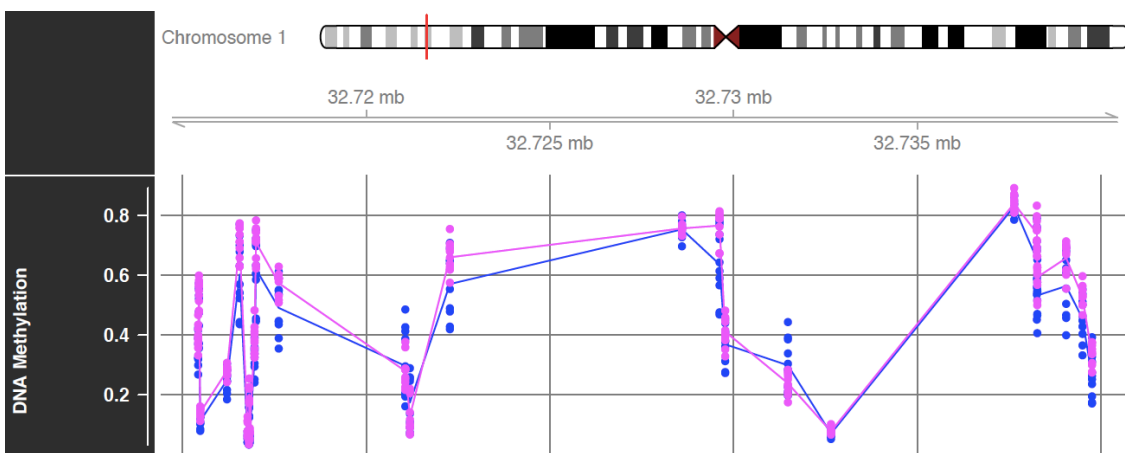
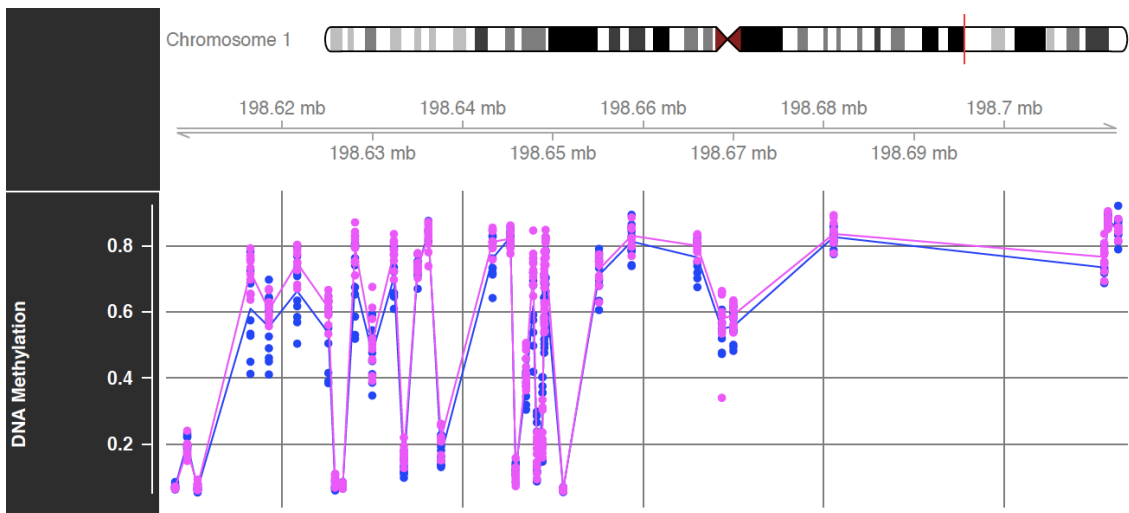
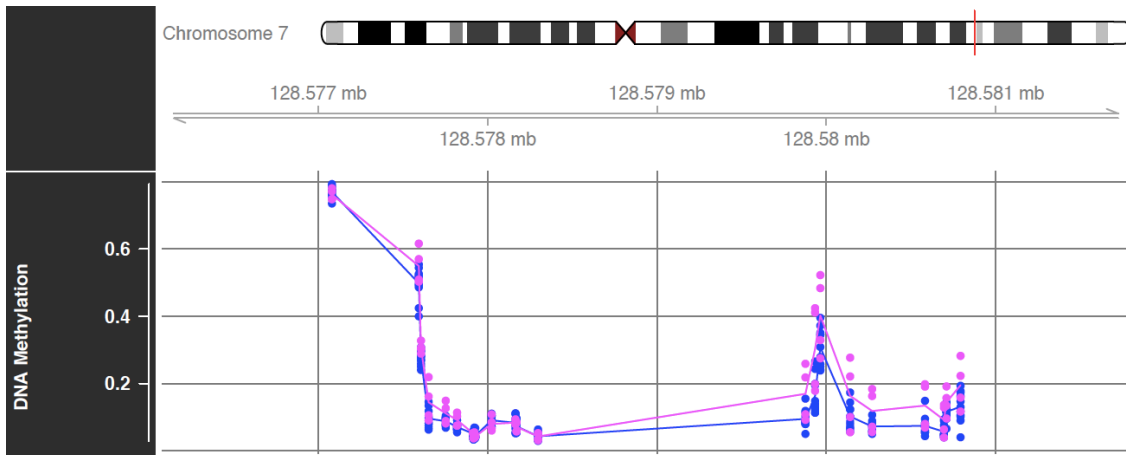


Figura Suplementaria 7. Representación mCSEA para el promotor *LCK*. El color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con PICS, el color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con ECC.

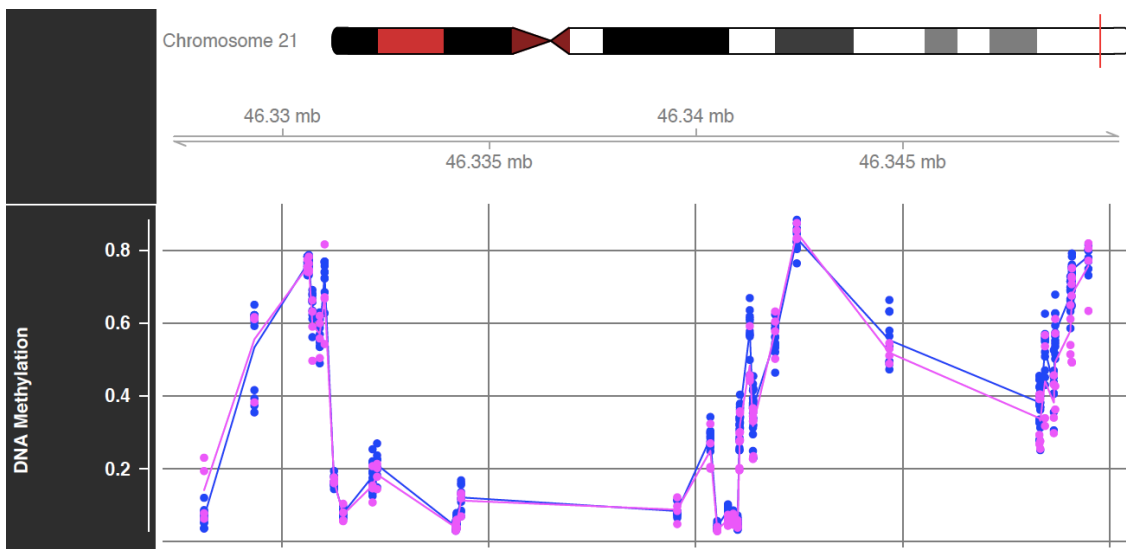


**Figura Suplementaria 8. Representación mCSEA para el gen *PTPRC*.** El color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con PICS, el color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con ECC.

➤ PROMOTORES Y GENES CON METILACIÓN DIFERENCIAL ENTRE PICS-C Y PICS-A (APARTADO 5.10.3.1)



**Figura Suplementaria 9. Representación mCSEA para el promotor *IRF5*.** El color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con PICS-C, el color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con PICS-A.



**Figura Suplementaria 10. Representación mCSEA para el promotor *ITGB2*.** El color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con PICS-C, el color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con PICS-A.

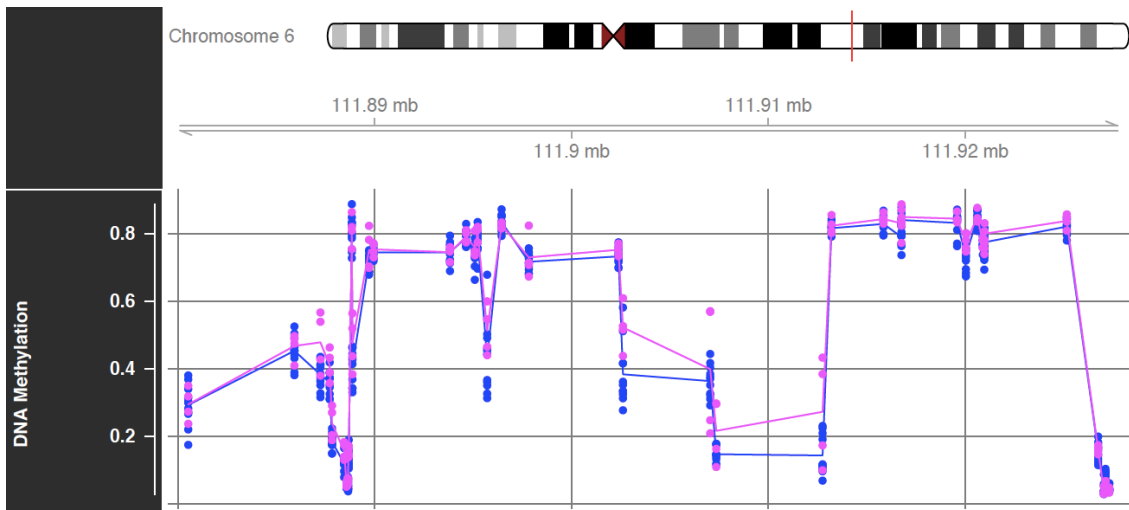


Figura Suplementaria 11 Representación mCSEA para el gen *TRAF3IP2*. El color rosa indica los cambios de metilación en los pacientes con PICS-C, el color azul indica los cambios de metilación en los pacientes con PICS-A.



## 11.2. ANEXOS II: TRABAJOS PUBLICADOS COMO PRIMERA AUTORA DURANTE LA TESIS DOCTORAL



Article

### Histone Citrullination Mediates a Protective Role in Endothelium and Modulates Inflammation

Rebeca Osa-Verdegal<sup>1,2,3</sup>, Jesús Beltrán-García<sup>4</sup>, Ana B. Paes<sup>2,5</sup>, Elena Nacher-Sendra<sup>2,5</sup>, Susana Novella<sup>2,5</sup>, Carlos Hermenegildo<sup>2,5</sup>, Nieves Carbonell<sup>5,6</sup>, José Luis García-Giménez<sup>1,2,5,7,\*</sup> and Federico V. Pallardó<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, 46010 Valencia, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València, 46010 València, Spain

<sup>3</sup> Systems Neurobiology Laboratory, Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA 92037, USA

<sup>4</sup> Department of Medicine, Division of Regenerative Medicine, University of California, La Jolla, CA 92037, USA

<sup>5</sup> Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, 46010 Valencia, Spain

<sup>6</sup> Hospital Clínic Universitari de València, 46010 Valencia, Spain

<sup>7</sup> EpiDisease S.L. (Spin-Off CIBER-ISCIII), Parc Científic de la Universitat de València, 46980 Paterna, Spain

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

**Abstract:** NETosis is a key host immune process against a pathogenic infection during innate immune activation, consisting of a neutrophil “explosion” and, consequently, NET formation, containing mainly DNA, histones, and other nuclear proteins. During sepsis, an exacerbated immune host response to an infection occurs, activating the innate immunity and NETosis events, which requires histone H3 citrullination. Our group compared the circulating histone levels with those citrullinated H3 levels in plasma samples of septic patients. In addition, we demonstrated that citrullinated histones were less cytotoxic for endothelial cells than histones without this post-translational modification. Citrullinated histones did not affect cell viability and did not activate oxidative stress. Nevertheless, citrullinated histones induced an inflammatory response, as well as regulatory endothelial mechanisms. Furthermore, septic patients showed elevated levels of circulating citrullinated histone H3, indicating that the histone citrullination is produced during the first stages of sepsis, probably due to the NETosis process.

**Keywords:** citrullination; histones; NETosis; sepsis; septic shock; progression; biomarker

Citation: Osa-Verdegal, R.; Beltrán-García, J.; Paes, A.B.; Nacher-Sendra, E.; Novella, S.; Hermenegildo, C.; Carbonell, N.; García-Giménez, J.L.; Pallardó, F.V. Histone Citrullination Mediates a Protective Role in Endothelium and Modulates Inflammation. *Cells* 2022, 11, 4070. <https://doi.org/10.3390/cells11244070>

Molecular Neurobiology  
<https://doi.org/10.1007/s12035-021-02445-3>



## Role of microRNAs As Biomarkers in Sepsis-Associated Encephalopathy

Rebeca Osca-Verdegal<sup>1,2</sup> · Jesús Beltrán-García<sup>2,3</sup> · Federico V. Pallardó<sup>1,2,3</sup> · José Luis García-Giménez<sup>1,2,3</sup>

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



Review

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

Jesús Beltrán-García <sup>1,2,3,4,†</sup>, Rebeca Osca-Verdegal <sup>2,†</sup>, Federico V. Pallardó <sup>1,2,3,4</sup>, José Ferreres <sup>3,5</sup>, María Rodríguez <sup>3,5</sup>, Sandra Mulet <sup>3,5</sup>, Fabian Sanchis-Gomar <sup>2,3</sup>, Nieves Carbonell <sup>3,5,\*</sup> and José Luis García-Giménez <sup>1,2,3,4,\*</sup>

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

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

<sup>3</sup> INCLIVA Biomedical Research Institute, 46010 Valencia, Spain; [ferreresj@gmail.com](mailto:ferreresj@gmail.com) (J.F.); [maria.rodriguezgimillo@gmail.com](mailto:maria.rodriguezgimillo@gmail.com) (M.R.); [sandramuletmascarell@gmail.com](mailto:sandramuletmascarell@gmail.com) (S.M.)

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

<sup>5</sup> Intensive Care Unit, Clinical University Hospital of Valencia, 46010 Valencia, Spain

\* Correspondence: [edurnecarbonell@yahoo.es](mailto:edurnecarbonell@yahoo.es) (N.C.); [j.luis.garcia@uv.es](mailto: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



http:

**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


Review

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)

Epigenomics



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

Jesús Beltrán-García<sup>‡,1,2,3,5</sup>, Rebeca Osa-Verdegal<sup>‡,2</sup>, Carlos Romá-Mateo<sup>1,2,3</sup>, Nieves Carbonell<sup>3,4</sup>, José Ferreres<sup>3,4</sup>, María Rodríguez<sup>3,4</sup>, Sandra Mulet<sup>3,4</sup>, Eva García-López<sup>5</sup>, Federico V Pallardó<sup>1,2,3</sup> & José Luis García-Giménez<sup>\*,1,2,3,5</sup> 

<sup>1</sup>Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Institute of Health Carlos III, Valencia 46010, Spain

<sup>2</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine & Dentistry, University of Valencia, Valencia 46010, Spain

<sup>3</sup>INCLIVA Biomedical Research Institute, Valencia 46010, Spain

<sup>4</sup>Intensive Care Unit, Clinical University Hospital of Valencia, Valencia 46010, Spain

<sup>5</sup>EpiDisease S.L. (Spin-Off CIBER-ISCIII), Parc Científic de la Universitat de València, Paterna 46980, Valencia, Spain

\*Author for correspondence: Tel.: +34 9638 64646; [J.luis.garcia@uv.es](mailto:J.luis.garcia@uv.es)

‡Authors contributed equally

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.



First draft submitted: 2 November 2019; Accepted for publication: 25 February 2020; Published online: 12 May 2020

**Keywords:** circulating histones • DNA methylation • epigenetic biomarkers • histones PTMs • immunosuppression • miRNAs • PICs • sepsis • septic shock



Review

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

Jesús Beltrán-García <sup>1,2,3,†</sup>, Rebeca Osca-Verdegal <sup>2,3,†</sup>, Elena Nacher-Sendra <sup>3</sup>,  
Federico V. Pallardó <sup>1,2,3</sup>  and José Luis García-Giménez <sup>1,2,3,\*</sup> 

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

<sup>2</sup> Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, 46010 Valencia, Spain; [rebeca.osca@gmail.com](mailto:rebeca.osca@gmail.com)

<sup>3</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València, 46010 València, Spain; [elena\\_nacher@hotmail.com](mailto:elena_nacher@hotmail.com)

\* Correspondence: [j.luis.garcia@uv.es](mailto: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



# Use of Circular RNAs in Diagnosis, Prognosis and Therapeutics of Renal Cell Carcinoma

Rebeca Oscala-Verdegal<sup>1,2</sup>, Jesús Beltrán-García<sup>1,2,3</sup>, José Luis Górriz<sup>4</sup>, José María Martínez Jabaloyas<sup>5</sup>, Federico V. Pallardó<sup>1,2,3</sup> and José Luis García-Giménez<sup>1,2,3,6\*</sup>

<sup>1</sup>Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Institute of Health Carlos III, Valencia, Spain, <sup>2</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, Valencia, Spain, <sup>3</sup>INCLIVA Biomedical Research Institute, Valencia, Spain, <sup>4</sup>Department of Nephrology, University Clinic Hospital, INCLIVA, University of Valencia, Valencia, Spain, <sup>5</sup>Department of Urology, University Clinic Hospital, INCLIVA, University of Valencia, Valencia, Spain, <sup>6</sup>EpiDisease S.L. (Spin-Off CIBER-ISCIII), Parc Científic de la Universitat de València, Valencia, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Hehuang Xie,  
Virginia Tech, United States

### Reviewed by:

Chaohui Gu,  
First Affiliated Hospital of Zhengzhou  
University, China  
Xavier Vidal-Gomez,  
INSERM U1046 Physiologie et  
Médecine Expérimentale du Coeur et  
des Muscles, France  
Juan Ren,  
The First Affiliated Hospital of Xi'an  
Jiaotong University, China

### \*Correspondence:

José Luis García-Giménez  
jl.garcia@isciii.es

Renal cell carcinoma is the most common type of kidney cancer, representing 90% of kidney cancer diagnoses, and the deadliest urological cancer. While the incidence and mortality rates by renal cell carcinoma are higher in men compared to women, in both sexes the clinical characteristics are the same, and usually unspecific, thereby hindering and delaying the diagnostic process and increasing the metastatic potential. Regarding treatment, surgical resection remains the main therapeutic strategy. However, even after radical nephrectomy, metastasis may still occur in some patients, with most metastatic renal cell carcinomas being resistant to chemotherapy and radiotherapy. Therefore, the identification of new biomarkers to help clinicians in the early detection, and treatment of renal cell carcinoma is essential. In this review, we describe circRNAs related to renal cell carcinoma processes reported to date and propose the use of some in therapeutic strategies for renal cell carcinoma treatment.

**Keywords:** RCC (Renal Cell Carcinoma), circRNAs, biomarker, diagnosis, therapy, cancer

### 11.3. ANEXOS III: TRABAJOS PUBLICADOS EN COLABORACIONES DURANTE LA TESIS DOCTORAL

Journal of Inflammation Research

Dovepress

open access to scientific and medical research

Open Access Full Text Article

ORIGINAL RESEARCH

## Extracellular Histones Activate Endothelial NLRP3 Inflammasome and are Associated with a Severe Sepsis Phenotype

Jesús Beltrán-García<sup>1-3</sup>, Rebeca Osa-Verdegal<sup>1,3</sup>, Daniel Pérez-Cremades<sup>2,3</sup>, Susana Novella<sup>2,3</sup>, Carlos Hermenegildo<sup>2,3</sup>, Federico V Pallardo<sup>1-3</sup>, José Luis García-Giménez<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, Spain; <sup>3</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València, València, Spain

Correspondence: José Luis García-Giménez, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València, València, 46010, Spain, Tel +34 963 864 646, Email j.luis.garcia@uv.es

**Introduction:** Circulating extracellular histones acquire relevance as cytotoxic mediators in sepsis. Extracellular histones act as damage-associated molecular patterns (DAMPs), which induce oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation. Inflammasome mediates pyroptosis, a programmed cell death mechanism that produces inflammation. Despite evidence for inflammasome activation in immune cells during sepsis, it was unknown whether extracellular histones can produce endothelial inflammasomes activation.

**Methods:** We used human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) to explore the activation of pyroptosis, endothelial function and inflammation by extracellular histones. We evaluated pyroptosis by flow cytometry, caspase-1 activity assay, and gene and protein expression analysis by RT-qPCR and Western blot, respectively. The upstream molecular responses involved in pyroptosis activation by extracellular histones were validated by means of using antioxidant glutathione ethyl ester and NLRP3 inflammasome inhibitors. Finally, using mass spectrometry, we measured circulating histones in blood from critically-ill patients and demonstrated that circulating histone levels correlated with the expression of pyroptosis-related cytokines, the release of endothelial adhesion factors and septic shock severity.

**Results:** We found that extracellular histones mediate 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 the hyperacetylation of extracellular histones or the use of antioxidants decreased pyroptosis. In addition, we showed that pyroptosis is a feasible process occurring in septic shock patients.

**Discussion:** Circulating histone levels correlated with the expression of pro-inflammatory and pyroptosis-related cytokines, the release of endothelial adhesion factors and septic shock severity. We propose to block histone-mediated pyroptosis as a feasible therapeutic strategy in sepsis.

**Keywords:** sepsis, extracellular histones, histone acetylation, endothelium, inflammasome, NLRP3



## Article

## Characterization of Early Peripheral Immune Responses in Patients with Sepsis and Septic Shock

Jesús Beltrán-García <sup>1,2,3</sup> , Rebeca Osa-Verdegal <sup>1,2,3</sup>, Beatriz Jávega <sup>4</sup>, Guadalupe Herrera <sup>5</sup>, José-Enrique O'Connor <sup>4</sup>, Eva García-López <sup>1,6</sup>, Germán Casabó-Vallés <sup>6</sup>, María Rodríguez-Gimillo <sup>2,7</sup>, José Ferreres <sup>2,7</sup>, Nieves Carbonell <sup>2,7</sup> , Federico V. Pallardo <sup>1,2,3</sup> and José Luis García-Giménez <sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Center for Biomedical Research Network on Rare Diseases (CIBERER), Carlos III Health Institute, 46010 Valencia, Spain; [jesus.beltran@ext.uv.es](mailto:jesus.beltran@ext.uv.es) (J.B.-G.); [rebeca.osca@ext.uv.es](mailto:rebeca.osca@ext.uv.es) (R.O.-V.); [e.maria.garcia@uv.es](mailto:e.maria.garcia@uv.es) (E.G.-L.); [federico.v.pallardo@uv.es](mailto:federico.v.pallardo@uv.es) (F.V.P.)

<sup>2</sup> INCLIVA Biomedical Research Institute, 46010 Valencia, Spain; [maria.rodriguez.gimillo@gmail.com](mailto:maria.rodriguez.gimillo@gmail.com) (M.R.-G.); [ferresj@gmail.com](mailto:ferresj@gmail.com) (J.F.); [edumecarbonell@yahoo.es](mailto:edumecarbonell@yahoo.es) (N.C.)

<sup>3</sup> Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain

<sup>4</sup> Laboratory of Cytomics, Joint Research Unit CIPF-UVEG, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain; [beatriz.javega@uv.es](mailto:beatriz.javega@uv.es) (B.J.); [jose.e.oconnor@uv.es](mailto:jose.e.oconnor@uv.es) (J.-E.O.)

<sup>5</sup> Flow Cytometry Unit, IIS INCLIVA, Fundación Investigación Hospital Clínico Valencia, 46010 Valencia, Spain; [gherreramartin@gmail.com](mailto:gherreramartin@gmail.com)

<sup>6</sup> EpiDisease S.L. (Spin-Off CIBER-ISCIII), Parc Científic de la Universitat de València, 46980 Paterna, Spain; [german.casabo@epidisease.com](mailto:german.casabo@epidisease.com)

<sup>7</sup> Intensive Care Unit, Clinical University Hospital of Valencia (HCUV), 46010 Valencia, Spain

\* Correspondence: [j.luis.garcia@uv.es](mailto:j.luis.garcia@uv.es); Tel: +34-96-386-46-46



**Citation:** Beltrán-García, J.; Osa-Verdegal, R.; Jávega, B.; Herrera, G.; O'Connor, J.-E.; García-López, E.; Casabó-Vallés, G.; Rodríguez-Gimillo, M.; Ferreres, J.; Carbonell, N.; et al. Characterization of Early Peripheral Immune Responses in Patients with Sepsis and Septic Shock. *Biomedicines* **2022**, *10*, 525. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030525>

Academic Editors: Waldemar Kanczkowski and Koichi Yuki

Received: 9 December 2021  
Accepted: 21 February 2022  
Published: 23 February 2022

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

**Abstract:** (1) Background: Sepsis is a life-threatening condition caused by an abnormal host response to infection that produces altered physiological responses causing tissue damage and can result in organ dysfunction and, in some cases, death. Although sepsis is characterized by a malfunction of the immune system leading to an altered immune response and immunosuppression, the high complexity of the pathophysiology of sepsis requires further investigation to characterize the immune response in sepsis and septic shock. (2) Methods: This study analyzes the immune-related responses occurring during the early stages of sepsis by comparing the amounts of cytokines, immune modulators and other endothelial mediators of a control group and three types of severe patients: critically ill non-septic patients, septic and septic shock patients. (3) Results: We showed that in the early stages of sepsis the innate immune system attempts to counteract infection, probably via neutrophils. Conversely, the adaptive immune system is not yet fully activated, either in septic or in septic shock patients. In addition, immunosuppressive responses and pro-coagulation signals are active in patients with septic shock. (4) Conclusions: The highest levels of IL-6 and pyroptosis-related cytokines (IL-18 and IL-1 $\alpha$ ) were found in septic shock patients, which correlated with D-dimer. Moreover, endothelial function may be affected as shown by the overexpression of adhesion molecules such as s-ICAM1 and E-Selectin during septic shock.

**Keywords:** sepsis; immune response; innate immune system; adaptive immune system; cytokines; immune mediators; immunity mediated by endothelium



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

Jesús Beltrán-García, MSc<sup>1,4</sup>; Rebeca Osca-Verdegal, MSc<sup>2</sup>; Federico V. Pallardó, PhD, MD<sup>1,4</sup>; José Ferreres, PhD, MD<sup>3,5</sup>; María Rodríguez, MD<sup>3,5</sup>; Sandra Mulet, MD<sup>3,5</sup>; Carolina Ferrando-Sánchez, MD<sup>3,5</sup>; Nieves Carbonell, PhD, MD<sup>3,5</sup>; José Luis García-Giménez, PhD<sup>1,4</sup>

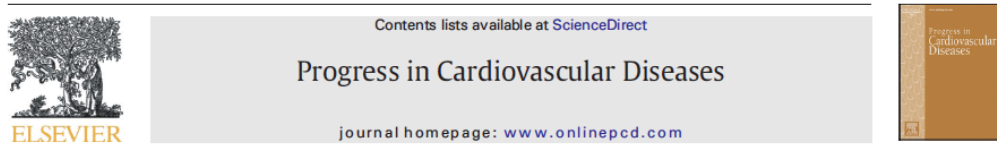
**Abstract:** Great efforts are being made worldwide to identify the specific clinical characteristics of infected critically ill patients that mediate the associated pathogenesis, including vascular dysfunction, thrombosis, dysregulated inflammation, and respiratory complications. Recently, coronavirus 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

Progress in Cardiovascular Diseases 68 (2021) 70–77



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



Jesús Beltrán-García<sup>a,b,c</sup>, Rebeca Osca-Verdegal<sup>a,c</sup>, Elena Náchter-Sendra<sup>b,c</sup>, Alejandro Cardona-Monzonis<sup>d</sup>, Fabian Sanchis-Gomar<sup>e</sup>, Nieves Carbonell<sup>b,f</sup>, Federico V. Pallardó<sup>a,b,c</sup>, Carl J. Lavie<sup>g</sup>, José Luis García-Giménez<sup>a,b,c,d,\*</sup>

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

<sup>b</sup> INCLIVA Biomedical Research Institute, Valencia, Spain

<sup>c</sup> Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, Valencia, Spain

<sup>d</sup> EpiDisease S.L. (Spin-Off CIBER-SCIII), Parc Científic de la Universitat de València, Paterna, 46980 Valencia, Spain

<sup>e</sup> Division of Cardiovascular Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA

<sup>f</sup> Intensive Care Unit, Clinical University Hospital of Valencia, Valencia 46010, Spain

<sup>g</sup> John Ochsner Heart and Vascular Institute, Ochsner Clinical School, The University of Queensland School of Medicine, New Orleans, LA, USA

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

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

### 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.



## Epigenetic IVD Tests for Personalized Precision Medicine in Cancer

Jesús Beltrán-García<sup>1,2,3</sup>, Rebeca Osca-Verdegal<sup>2,3</sup>, Salvador Mena-Mollá<sup>3,4\*</sup> and José Luis García-Giménez<sup>1,2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup> Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Institute of Health Carlos III, Valencia, Spain, <sup>2</sup> INCLIVA Biomedical Research Institute, Valencia, Spain, <sup>3</sup> Department of Physiology, School of Medicine and Dentistry, Universitat de València (UV), Valencia, Spain, <sup>4</sup> EpiDisease S.L. Spin-Off of CIBERER (ISCIII), 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.

### OPEN ACCESS

**Edited by:**

Yun Liu,  
Fudan University, China

**Reviewed by:**

Jörg Tost,

**Keywords:** precision medicine, epigenetic biomarker, In Vitro Diagnostic (IVD), DNA methylation, miRNA, cfDNA, circulating nucleosomes



# Epigenetic Regulation in the Pathogenesis of Sjögren Syndrome and Rheumatoid Arthritis

José Santiago Ibáñez-Cabellos<sup>1,2,3</sup>, Marta Seco-Cervera<sup>1,2,3\*</sup>, Rebeca Osa-Verdegal<sup>3</sup>, Federico V. Pallardó<sup>1,2,3</sup> and José Luis García-Giménez<sup>1,2,3\*</sup>

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

<sup>2</sup> NCLVA Health Research Institute, Mixed Unit for rare diseases INCLIVA-CIFF, Valencia, Spain, <sup>3</sup> Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, Valencia, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Sung-Chou Li,  
Kaohsiung Chang Gung Memorial  
Hospital, Taiwan

### Reviewed by:

Giridhari Lal,  
National Centre for Cell Science,  
India  
Joy Tseng,  
Chang Gung University College of  
Medicine, Taiwan

### \*Correspondence:

Marta Seco-Cervera  
marta.seco@uv.es  
José Luis García-Giménez  
j.luis.garcia@uv.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Epigenomics and Epigenetics,  
a section of the journal  
Frontiers in Genetics

**Received:** 28 March 2019

**Accepted:** 11 October 2019

**Published:** 13 November 2019

### Citation:

Ibáñez-Cabellos JS, Seco-Cervera M,

Autoimmune rheumatic diseases, such as Sjögren syndrome (SS) and rheumatoid arthritis (RA), are characterized by chronic inflammation and autoimmunity, which cause joint tissue damage and destruction by triggering reduced mobility and debilitation in patients with these diseases. Initiation and maintenance of chronic inflammatory stages account for several mechanisms that involve immune cells as key players and the interaction of the immune cells with other tissues. Indeed, the overlapping of certain clinical and serologic manifestations between SS and RA may indicate that numerous immunologic-related mechanisms are involved in the physiopathology of both these diseases. It is widely accepted that epigenetic pathways play an essential role in the development and function of the immune system. Although many published studies have attempted to elucidate the relation between epigenetic modifications (e.g. DNA methylation, histone post-translational modifications, miRNAs) and autoimmune disorders, the contribution of epigenetic regulation to the pathogenesis of SS and RA is at present poorly understood. This review attempts to shed light from a critical point of view on the identification of the most relevant epigenetic mechanisms related to RA and SS by explaining intricate regulatory processes and phenotypic features of both autoimmune diseases. Moreover, we point out some epigenetic markers which can be used to monitor the inflammation status and the dysregulated immunity in SS and RA. Finally, we discuss the inconvenience of using epigenetic data obtained from bulk immune cell populations instead specific immune cell subpopulations.

**Keywords:** epigenetics, autoimmune diseases, epigenetic pathways, rheumatic diseases, DNA methylation, histone modifications, miRNAs



## Epigenetic IVD Tests for Personalized Precision Medicine in Cancer

Jesús Beltrán-García<sup>1,2,3</sup>, Rebeca Osca-Verdegal<sup>2,3</sup>, Salvador Mena-Mollá<sup>3,4\*</sup> and José Luis García-Giménez<sup>1,2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup> Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Institute of Health Carlos III, Valencia, Spain, <sup>2</sup> INCLIVA Biomedical Research Institute, Valencia, Spain, <sup>3</sup> Department of Physiology, School of Medicine and Dentistry, Universitat de València (UV), Valencia, Spain, <sup>4</sup> EpiDisease S.L. Spin-Off of CIBERER (ISCIII), 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.

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Yun Liu,  
Fudan University, China

#### Reviewed by:

Jörg Tost,

**Keywords:** precision medicine, epigenetic biomarker, In Vitro Diagnostic (IVD), DNA methylation, miRNA, cDNA, circulating nucleosomes



# DNA Methylation Analysis to Unravel Altered Genetic Pathways Underlying Early Onset and Late Onset Neonatal Sepsis. A Pilot Study

## OPEN ACCESS

**Edited by:**  
Jiang Huzi Wang,  
University College Cork, Ireland

**Reviewed by:**  
Tim Rahmel,  
University Hospital Bochum  
GmbH, Germany  
Vishnu Bhat,  
Aarupadai Veeedu Medical College and  
Hospital, India

**\*Correspondence:**  
José Luis García-Giménez  
j.luis.garcia@uv.es

<sup>†</sup>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,  
Garzón MJ, Lara-Cantón I,  
Beltrán-García J, Osa-Verdegal R,  
Mena-Mollá S, García-López E,  
Vento M, Pallardó FV 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. 12:622599.  
doi: 10.3389/fimmu.2021.622599

Sheila Lorente-Pozo<sup>1,2†</sup>, Paula Navarrete<sup>3†</sup>, María José Garzón<sup>3</sup>,  
Inmaculada Lara-Cantón<sup>1,2</sup>, Jesús Beltrán-García<sup>4,5</sup>, Rebeca Osa-Verdegal<sup>4,5</sup>,  
Salvador Mena-Mollá<sup>4,5</sup>, Eva García-López<sup>3</sup>, Máximo Vento<sup>1,2</sup>, Federico V. Pallardó<sup>3,4,5</sup> and  
José Luis García-Giménez<sup>3,4,5\*</sup>

<sup>1</sup> Neonatal Research Group, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain, <sup>2</sup> Division of Neonatology, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain, <sup>3</sup> EpiDisease S.L. (Spin-off From the CIBER-ISCIII), Parc Científic de la Universitat de València, Paterna, Spain, <sup>4</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia, Spain, <sup>5</sup> Department Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia-INCLIVA, 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

1875-0362/21

Send Orders for Reprints to [reprints@benjaminscience.net](mailto:reprints@benjaminscience.net)

144



**The Open Bioinformatics Journal**

Content list available at: <https://openbioinformaticsjournal.com>



**RESEARCH ARTICLE****Use of Two Complementary Bioinformatic Approaches to Identify Differentially Methylated Regions in Neonatal Sepsis**

Paula Navarrete<sup>1</sup>, María José Garzón<sup>1</sup>, Sheila Lorente-Pozo<sup>2</sup>, Salvador Mena-Mollá<sup>1,3</sup>, Máximo Vento<sup>2</sup>, Federico V. Pallardó<sup>3,4,5</sup>, Jesús Beltrán-García<sup>3,4,5</sup>, Rebeca Osa-Verdegal<sup>3,4</sup>, Eva García-López<sup>1</sup> and José Luis García-Giménez<sup>1,3,4,5,\*</sup>

<sup>1</sup>EpiDisease S.L. (Spin-Off from the CIBER-ISCIII), Parc Científic de la Universitat de València, Paterna, Spain

<sup>2</sup>Neonatal Research Group, Health Research Institute La Fe, Division of Neonatology, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain

<sup>3</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, Valencia, Spain

<sup>4</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) Instituto de Salud Carlos III, Valencia, Spain

<sup>5</sup>Biomedical Research Institute INCLIVA, Valencia, Spain

**Abstract:****Background:**

Neonatal sepsis is a heterogeneous condition affecting preterm infants whose underlying mechanisms remain unknown. The analysis of changes in the DNA methylation pattern can contribute to improving the understanding of molecular pathways underlying disease pathophysiology. Methylation EPIC 850K BeadChip technology is an excellent tool for genome-wide methylation analyses and the detection of differentially methylated regions (DMRs).

**Objective:**

The aim is to identify DNA methylation traits in complex diseases, such as neonatal sepsis, using data from Methylation EPIC 850K BeadChip arrays.

**Methods:**

Two different bioinformatic methods, DMRcate (a supervised approach) and mCSEA (an unsupervised approach), were used to identify DMRs using EPIC data from leukocytes of neonatal septic patients. Here, we describe with detail the implementation of both methods as well as their applicability, briefly discussing the results obtained for neonatal sepsis.

**Results:**

Differences in methylation levels were observed in neonatal sepsis patients. Moreover, differences were identified between the two subsets of the disease: Early-Onset neonatal Sepsis (EOS) and Late-Onset Neonatal Sepsis (LOS).

**Conclusion:**

This approach by using DMRcate and mCSEA helped us to gain insight into the intricate mechanisms that may drive EOS and LOS development and progression in newborns.

**Keywords:** Epigenomics, DNA methylation, Microarray, Differentially methylated regions, Sepsis, Neonates.



Review

## The Intricate Role of Non-Coding RNAs in Sepsis-Associated Disseminated Intravascular Coagulation

Irene Cánovas-Cervera <sup>1,2</sup> , Elena Nacher-Sendra <sup>1,2</sup>, Rebeca Osca-Verdegal <sup>1,2,3</sup>, Enric Dolz-Andrés <sup>1</sup>, Jesús Beltrán-García <sup>1,2,3,4</sup> , María Rodríguez-Gimillo <sup>2,5</sup> , Carolina Ferrando-Sánchez <sup>2,5</sup>, Nieves Carbonell <sup>2,5</sup> and José Luis García-Giménez <sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain

<sup>2</sup> Health Research Institute INCLIVA, 46010 Valencia, Spain

<sup>3</sup> Center for Biomedical Research Network on Rare Diseases (CIBERER), Carlos III Health Institute, 46010 Valencia, Spain

<sup>4</sup> Department of Medicine, Division of Regenerative Medicine, University of California, San Diego, CA 92093, USA

<sup>5</sup> Intensive Care Unit, Clinical University Hospital of Valencia, 46010 Valencia, Spain

\* Correspondence: j.luis.garcia@uv.es; Tel.: +34-963-864-646



**Citation:** Cánovas-Cervera, I.; Nacher-Sendra, E.; Osca-Verdegal, R.; Dolz-Andrés, E.; Beltrán-García, J.; Rodríguez-Gimillo, M.; Ferrando-Sánchez, C.; Carbonell, N.; García-Giménez, J.L. The Intricate Role of Non-Coding RNAs in Sepsis-Associated Disseminated Intravascular Coagulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2582. <https://doi.org/10.3390/ijms24032582>

Academic Editor: Johan W. M. Heemskerk

**Abstract:** Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) is a type of tissue and organ dysregulation in sepsis, due mainly to the effect of the inflammation on the coagulation system. Unfortunately, the underlying molecular mechanisms that lead to this disorder are not fully understood. Moreover, current biomarkers for DIC, including biological and clinical parameters, generally provide a poor diagnosis and prognosis. In recent years, non-coding RNAs have been studied as promising and robust biomarkers for a variety of diseases. Thus, their potential in the diagnosis and prognosis of DIC should be further studied. Specifically, the relationship between the coagulation cascade and non-coding RNAs should be established. In this review, microRNAs, long non-coding RNAs, and circular RNAs are studied in relation to DIC. Specifically, the axis between these non-coding RNAs and the corresponding affected pathway has been identified, including inflammation, alteration of the coagulation cascade, and endothelial damage. The main affected pathway identified is PI3K/AKT/mTOR axis, where several ncRNAs participate in its regulation, including miR-122-5p which is sponged by circ\_0005963, ciRS-122, and circPTN, and miR-19a-3p which is modulated by circ\_0000096 and circ\_0063425. Additionally, both miR-223 and miR-24 were found to affect the PI3K/AKT pathway and were regulated by lncGAS5 and lncKCNQ1OT1, respectively. Thus, this work provides a useful pipeline of inter-connected ncRNAs that future research on their impact on DIC can further explore.

**Keywords:** non-coding RNAs; miRNAs; lncRNAs; biomarkers; sepsis; Disseminated Intravascular Coagulation



**TESIS DOCTORAL  
REBECA OSCA VERDEGAL**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÓGÍA**

**MARZO 2023**