

TÍTULO DEL PROYECTO:

**ANÁLISIS DE LOS INTERMEDIARIOS DEL CICLO DE KREBS DURANTE LAS
PRIMERAS 6 HORAS DE ENDOTOXEMIA INDUCIDA POR LIPOPOLISACÁRIDO EN
UN MODELO DE SEPSIS PORCINA.**

**KREBS CYCLE INTERMEDIATES DURING THE FIRST 6 HOURS OF
LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED ENDOTOXEMIA IN A SWINE SEPSIS MODEL**

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

JUAN DANIEL CAICEDO RUIZ

MÉDICO CIRUJANO UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Trabajo presentado como requisito para optar al título de:

MAGÍSTER EN FISIOLÓGÍA

TUTOR:

JUAN JOSE DIAZTAGLE FERNANDEZ

MÉDICO INTERNISTA

MAGÍSTER EN FISIOLÓGÍA

PROFESOR UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. RESUMEN.....	4
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	12
5. MARCO TEÓRICO.....	12
6. OBJETIVOS.....	40
Objetivo General.....	40
Objetivos Específicos.....	41
7. METODOLOGÍA.....	42
Diseño de investigación.....	42
Tamaño de la muestra.....	42
Criterios de selección.....	43
Variables.....	43
Protocolo del estudio.....	48
Análisis estadístico.....	56
Consideraciones éticas.....	56
Impacto Esperado.....	58
Cronograma.....	59
8. RESULTADOS.....	61
9. DISCUSIÓN.....	66
10. LIMITACIONES.....	89
11. FORTALEZAS Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	91
12. CONCLUSIONES.....	94
13. BIBLIOGRAFÍA.....	96

RESUMEN.

Introducción: El ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) se considera tradicionalmente como una vía cíclica que opera acoplada a la fosforilación oxidativa. En condiciones de hipoxia se asume que el CAT se encuentra detenido. Sin embargo, la persistencia del funcionamiento del CAT en estados de choque ha sido documentada, así como la “fragmentación” de sus reacciones enzimáticas en modelos animales de hipoxia conllevando a la persistencia de sus reacciones catabólicas. El objetivo de este trabajo es identificar la cinética de los intermediarios del CAT en el plasma durante el choque por endotoxemia en un modelo porcino.

Métodos: Estudio experimental, a 9 porcinos se les suministró LPS de E. Coli hasta el desarrollo de choque ($PAM < 50$ mmHg), 3 porcinos se utilizaron como controles. Se obtuvieron muestras de sangre venosa en 3 tiempos: T0: inmediatamente antes del suministro de endotoxina o placebo, T1: 3-horas posterior a su suministro, T2: 6-horas posterior a su suministro. La cuantificación de los intermediarios del CAT, lactato y piruvato en plasma se realizó mediante cromatografía líquida. Como medida de la progresión a la anaerobiosis se utilizó la relación entre lactato y piruvato (L/P). Las diferencias de las medianas de las concentraciones entre T0-T1, T0-T2 y T1-T2 para cada grupo se analizaron con el test de Wilcoxon, igualmente, se analizó la diferencia entre grupo control y grupo endotoxina para cada tiempo. Finalmente, se realizó una regresión lineal univariada entre las concentraciones de los intermediarios del CAT y los valores de lactato.

Resultados: En el grupo control el citrato fue el metabolito del CAT predominante en plasma en T2 ($180 \mu\text{mol/L}$). En contraste, en condiciones de endotoxemia el succinato fue el metabolito mas abundante a nivel plasmático ($783 \mu\text{mol/L}$). En el grupo de endotoxemia los únicos metabolitos del CAT que presentaron variaciones significativas fueron: Succinato (T0: 370.00 - T1: 586.67 - T2: $783.33 \mu\text{mol/L}$; $p < 0.05$) y citrato (T0: 190 - T2: $540 \mu\text{mol/L}$; $p < 0.05$). Los demás intermediarios no presentaron variaciones

significativas durante la experimentación. La regresión lineal entre los niveles de lactato y succinato obtuvo un coeficiente de determinación de 0.347 ($p=0.003$).

Conclusiones: La elevación reportada en los niveles de succinato y citrato durante el transcurso de nuestro biomodelo de endotoxemia sugiere un incremento de la actividad catabólica a nivel celular. Así mismo, los niveles elevados de succinato se correlacionan de manera parcial con la hiperlactatemia que se observa durante la endotoxemia.

Palabras clave: Ciclo de Krebs, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, sepsis, choque séptico, reprogramación metabólica.

ABSTRACT

Introduction: The Krebs cycle or tricarboxylic acid cycle (TAC) is traditionally considered as a cyclic pathway that operates coupled to oxidative phosphorylation. Under conditions of hypoxia, it is assumed that the TAC is arrested. However, the persistence of TAC function in shock states has been documented, as well as the "fragmentation" of its enzymatic reactions in animal models of hypoxia leading to the persistence of its catabolic reactions. The aim of this work is to identify the kinetics of TAC intermediates in plasma during endotoxemia shock in a swine model.

Methods: Experimental study, 9 swine were given LPS of *E. coli* until the development of shock (MAP<50 mmHg), 3 swine were used as controls. Venous blood samples were obtained at 3 times: T0: immediately before endotoxin or placebo administration, T1: 3-hours after administration, T2: 6-hours after administration. The quantification of TAC intermediates, lactate and pyruvate in plasma was performed by liquid chromatography. The lactate to pyruvate ratio (L/P) was used as a measure of progression to anaerobiosis. The differences in median concentrations between T0-T1, T0-T2 and T1-T2 for each group were analyzed with the Wilcoxon test, as well as the difference between the control group and the endotoxin group for each time. Finally, a univariate linear regression was performed between the concentrations of TAC intermediates and lactate values.

Results: In the control group citrate was the predominant TAC metabolite in plasma at T2 (180 $\mu\text{mol/L}$). In contrast, under endotoxemia conditions succinate was the most abundant metabolite at plasma level (783 $\mu\text{mol/L}$). In the endotoxemia group the only TAC metabolites that presented significant variations were: succinate (T0:370.00 - T1:586.67 - T2:783.33 $\mu\text{mol/L}$; $p<0.05$) and citrate (T0:190 - T2: 540 $\mu\text{mol/L}$; $p<0.05$). The other intermediates did not present significant variations during the experimentation. Linear regression between lactate and succinate levels obtained a coefficient of determination of 0.347 ($p=0.003$).

Conclusions: The reported elevation in succinate and citrate levels during the course of our endotoxemia biomodel suggests increased catabolic activity at the cellular level.

Likewise, elevated succinate levels correlate partially with the hyperlactatemia observed during endotoxemia.

Keywords: Krebs cycle, Tricarboxylic acid cycle, sepsis, septic shock, metabolic reprogramming.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El choque séptico es una patología insignia del cuidado intensivo, en su fisiopatología se encuentran entrelazados fenómenos inmunológicos, alteraciones hemodinámicas, y compromisos en la microvasculatura; los cuales derivan en la disfunción celular que desencadena la falla orgánica múltiple que se observa de manera característica en esta enfermedad (1).

La mortalidad por choque séptico ocupa el primer lugar en las unidades de cuidado intensivo y actualmente la mortalidad de estos pacientes oscila entre 30% y 60%, además de conllevar a grandes gastos en salud, la sepsis también empeora la calidad de vida de los pacientes que la padecen (2), este escenario no es nuevo en el cuidado crítico, y pese a la implementación de guías de reanimación y la inclusión de manejos protocolizados no ha sido posible descender de manera persistente la morbimortalidad causada por esta enfermedad.

Una explicación plausible para este fenómeno puede radicar en que las conductas terapéuticas que se han recomendado parten de un enfoque centrado en la resucitación a partir de variables que se enfocan en el aporte de oxígeno y su normalización (3); dejando a un lado alternativas terapéuticas como la inhibición de la señalización proinflamatoria, la respuesta hipercoagulante, la disfunción endotelial, y el estrés oxidativo, debido a que no han demostrado resultados estadísticamente favorables en la disminución de la mortalidad en ensayos clínicos aleatorizados (4, 5). Sin embargo, estas terapias pueden ser de utilidad cuando se aplican únicamente en subgrupos de pacientes sépticos y no de manera homogénea sobre toda la población de individuos, en congruencia con lo anterior, en los últimos años se ha reportado un incremento de los trabajos que buscan seleccionar grupos de pacientes con fenotipos específicos y que a futuro se puedan beneficiar de terapéuticas dirigidas a un mecanismo fisiopatológico en particular (6, 7).

Afortunadamente nuestro conocimiento sobre la sepsis se ha ampliado en los últimos

años, y en parte gracias al avance de las ciencias ómicas se ha logrado encontrar diversos metabolitos relacionados con la noxa séptica y que permiten identificar fenotipos de respuesta a nivel inflamatorio, inmunológico, metabólico y del estado oxido-reductor que ocurren durante la sepsis (8), este avance hace necesario identificar una asociación entre los múltiples fenotipos y el pronóstico del paciente ya que esto contribuye a generar intervenciones dirigidas. En este sentido, se ha encontrado en pacientes no supervivientes el incremento a nivel plasmático de metabolitos relacionados con el metabolismo intermediario, y se ha planteado que esta elevación corresponde a fenómenos de reprogramación metabólica a nivel celular (9). Por lo tanto, un abordaje metabolómico brinda la posibilidad de estudiar el compromiso metabólico de la sepsis a través del análisis de muestras de plasma, lo cual representa una alternativa novedosa y pragmática de abordar la noxa séptica, además permite establecer fenotipos de compromiso metabólico tanto a nivel interindividual como intraindividual y en un futuro puede contribuir al diseño de intervenciones terapéuticas centradas en el metabolismo energético (10,11).

Literatura reciente indica que la causa última de la disfunción multiorgánica en la sepsis es el desarrollo de disfunción mitocondrial contribuyendo a la pérdida de las reservas energéticas que permiten el adecuado funcionamiento celular – tisular – orgánico, (12, 13, 14), de tal forma que en la sepsis se han planteado dos mecanismos para explicar este proceso fisiopatológico (15): El mecanismo convectivo, en el cual el descenso en el aporte de oxígeno (DO_2) es la causa de la disfunción mitocondrial, no obstante, este deterioro en el DO_2 no siempre se correlaciona con las variables sistémicas que monitorizan la macrocirculación, y en este sentido se ha observado como la disminución del DO_2 puede ocurrir como producto del establecimiento de una heterogeneidad microcirculatoria (16) conllevando a un descenso en el consumo de oxígeno (VO_2) y al establecimiento de una dependencia patológica entre el VO_2 y el DO_2 a nivel tisular (17, 18). El segundo mecanismo es el mecanismo metabólico, en el cual la mitocondria descende su funcionamiento en el contexto de un DO_2 preservado. En este mecanismo la maquinaria metabólica se encuentra reprogramada a causa de la señalización

intracelular generada por la noxa séptica, lo cual deriva en que el DO_2 fisiológico sea incapaz de sostener el metabolismo aeróbico provocando el sostenimiento de las vías glucolíticas para la obtención de energía y desacoplando el proceso de fosforilación oxidativa (19).

El reemplazo de la fosforilación oxidativa por la glicolisis como fuente de ATP se conoce como efecto Warburg (20), efecto documentado desde los inicios del siglo XX y que contribuye a la dependencia de la vía glucolítica que se observa en las células tumorales. Actualmente, se conoce que el efecto Warburg está presente también en la sepsis independientemente de la biodisponibilidad de oxígeno, y es un fenómeno que puede ser desencadenado por la señalización inmuno-inflamatoria que se observa en esta patología (21, 22). En este sentido, también existe evidencia experimental en torno a una reprogramación del metabolismo intermediario durante la sepsis, encontrándose alterada la utilización de diferentes sustratos energéticos, incluidos los ácidos grasos, aminoácidos, el lactato y las cetonas (23, 24, 25). Un punto en común de todas las anteriores vías metabólicas radica en el ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT) por lo que el entendimiento de su funcionamiento y las adaptaciones que este desarrolla durante la sepsis pueden permitir un entendimiento más integral de la respuesta metabólica que acontece en esta patología.

Evidencia reciente sugiere que la maquinaria del CAT persiste funcionando en condiciones hipóxicas y consigue sintetizar ATP en un entorno anaerobio mediante la fragmentación y reorientación de sus reacciones enzimáticas (26, 27). Cuando esto sucede se pierde el funcionamiento cíclico de las reacciones que conllevan a la oxidación de los equivalentes reductores (NADH y $FADH_2$), alterándose el equilibrio entre la anaplerosis (reacciones que proporcionan intermediarios del CAT) y cataplerosis (reacciones que emplean los intermediarios del CAT en otras vías metabólicas), en este escenario es posible observar reacciones de fosforilación a partir del sustrato y la producción de dióxido de carbono de manera anaerobia (28).

El anterior fraccionamiento del CAT conlleva a la acumulación de ciertos intermediarios

debido a la ausencia de un funcionamiento cíclico en las enzimas que lo componen (29, 30). La acumulación de succinato, citrato y fumarato se asocia con los fenómenos de reprogramación energética, favoreciendo la tolerancia a la hipoxia y la supervivencia celular. Actualmente existe evidencia en modelos celulares que relaciona el incremento del citrato y succinato con la estabilización del factor inducible por la Hipoxia (HIF-1) (31, 32); además, se ha observado la expresión de un fenotipo proinflamatorio (33) y la protección del potencial de membrana mitocondrial cuando se incrementan los niveles intra celulares de Succinato (34); de tal forma que los intermediarios del CAT pueden actuar como moléculas pivote que interrelacionan el metabolismo intermediario con la respuesta inmunológica y la tolerancia a la hipoxia.

En la sepsis, la instauración de hipoxia puede desencadenar respuestas similares a las descritas previamente, sin embargo, es posible observar un metabolismo hipercatabólico en las fases tempranas de la enfermedad (35) o un metabolismo quiescente en las fases tardías que conlleva a la instauración de disfunción multiorgánica (36), este compromiso “variable” del metabolismo ocurre como producto de la señalización inflamatoria y puede instaurarse de manera independiente a la biodisponibilidad del oxígeno.

Dentro de este paradigma que incluye diversos fenómenos de reprogramación metabólica ligados y no ligados a la hipoxia, los intermediarios del CAT pueden considerarse como metabolitos que contribuyen a la interpretación del funcionamiento del metabolismo intermediario y la actividad mitocondrial, por lo que su cuantificación en plasma permitiría interpretar de una manera más integral la respuesta metabólica en la sepsis.

JUSTIFICACIÓN

Al momento existen múltiples preguntas respecto a si la reprogramación metabólica que ocurre en la sepsis es favorable o desfavorable para la resolución de esta patología, se ignora si todas las células del organismo llevan a cabo estas alteraciones metabólicas durante el choque séptico y por último se desconoce el tiempo en el cual esta respuesta

adaptativa celular puede sostenerse sin entrar en un punto de no retorno en el cual la disfunción multiorgánica se convierta en un fenómeno irreversible.

La investigación aquí planteada busca identificar la cinética de los intermediarios del CAT posterior a la inducción de choque séptico con LPS en un modelo animal porcino. Por lo que sabemos, hasta el momento no se ha documentado el comportamiento temporal de estos metabolitos en el plasma de un modelo animal de choque séptico, consideramos que cuantificar el comportamiento de estos intermediarios es un paso que nos permite identificar la reprogramación metabólica celular y la disfunción mitocondrial que se observa en la fisiopatología del choque séptico.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el cambio de las concentraciones en el tiempo de los intermediarios del CAT en un modelo porcino de sepsis durante las primeras 6 horas de choque por endotoxina?

MARCO TEÓRICO

La sepsis es una patología heterogénea y multicausal que ha sido reconocida como causa de morbilidad y mortalidad desde hace más de 3000 años (37). El entendimiento de esta enfermedad y su tratamiento evidencian el progreso de nuestra comprensión alrededor de las interacciones huésped – microorganismo, no obstante, la fisiopatología de la Sepsis y el Choque séptico va más allá de la respuesta hiperinflamatoria y antiinflamatoria desencadenadas por el reconocimiento del microorganismo o de sustancias asociadas al huésped (38); actualmente conocemos que el compromiso generado por la noxa séptica afecta las variables macro hemodinámicas, la microcirculación, el endotelio (38), los sistemas hemostáticos, el sistema inmunológico y el metabolismo celular (39, 40); siendo el punto común de estas alteraciones el desarrollo de hipoxia celular y el establecimiento de un desbalance en el estado oxidado - reductor de la célula que compromete la obtención de Energía y su adecuada utilización (14, 42, 43)

El enfoque del presente trabajo se centra en el compromiso metabólico de la sepsis, compromiso que ha sido descrito desde la segunda mitad del siglo XX centrándose en los procesos fisiopatológicos que conllevan a las alteraciones enzimáticas que afectan la ruta glucolítica, el metabolismo del lactato y el descenso en el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones (44, 45, 46).

Recientemente, la incorporación de los métodos de la metabolómica en biomodelos animales de choque hemorrágico (47) y en pacientes hospitalizados por traumas severos (48) ha permitido el entendimiento de las complejas adaptaciones metabólicas que tienen lugar durante condiciones de hipoxia e isquemia. En modelos de choque séptico también ha sido posible identificar la presencia de diferentes metabolitos que se encuentran asociados con la mortalidad y la progresión de la sepsis (49). Dentro de los múltiples metabolitos reportados, existe evidencia consistente que sugiere un rol regulador y pronóstico de los intermediarios del CAT durante los fenómenos de reprogramación metabólica que ocurren en la sepsis (9, 36, 23).

En aras de introducir la evidencia en torno a los intermediarios del CAT y la sepsis empezaremos por recapitular brevemente la fisiopatología de esta enfermedad, posteriormente se describirán las etapas del metabolismo intermediario y sus alteraciones durante la sepsis; finalmente, se caracterizará la crisis energética en la sepsis y la relación de los intermediarios del CAT con los fenómenos de reprogramación metabólica.

1. Fisiopatología de la Sepsis y el Choque Séptico.

La sepsis es una entidad que progresa desde una infección localizada hasta un compromiso sistémico que se define por la aparición de disfunción multiorgánica, la cual se atribuye convencionalmente a una respuesta inflamatoria e inmunológica no regulada y se caracteriza por la instauración de hipoperfusión tisular (50). Por este motivo las actuales guías de reanimación (3) establecen que el diagnóstico de choque séptico se realiza en un paciente que presente requerimiento vasopresor en adición a cifras de

lactato elevadas, la hipótesis detrás de esta recomendación clínica es que el lactato evidencia un estado de hipoperfusión tisular y que el soporte vasopresor es la manera de definir la existencia de un componente cardiovascular como causante de la hipoperfusión tisular.

La comprensión de la hipoperfusión tisular en sepsis ha sido un objeto de debate en los últimos años (51, 52, 53); en primer lugar su definición permanece siendo elusiva en el campo clínico y científico ya que no existe un “gold-standard” para su cuantificación, en segundo lugar se observa en la sepsis una disociación entre la macro y la microcirculación (54, 55) razón por la cual la conducta tradicional y centrada en la optimización de los parámetros macrocirculatorios puede ser insuficiente para mejorar la perfusión tisular en instancias avanzadas del choque séptico (56, 57), en tercer lugar la heterogeneidad y la disfunción microcirculatoria del paciente séptico puede explicar estados de aporte de oxígeno insuficientes a nivel tisular, no obstante, su causalidad, su regresión o tratamiento y su relación con la supervivencia permanecen sin un consenso al respecto (58, 59, 60). Finalmente, el descenso en el consumo de oxígeno a nivel celular complementa el paradigma de la hipoperfusión tisular, pero al momento desconocemos si dicho deterioro en la extracción de oxígeno es la causa o la consecuencia de la disfunción circulatoria del paciente séptico (61, 62). Comprendiendo lo anterior es evidente que el estado de hipoperfusión tisular en sepsis se encuentra determinado por múltiples parámetros y la interacción entre estos no siempre es predecible, a continuación, se analizará los dos principales escenarios de la hipoperfusión en estado de sepsis y se describirá el paradigma de la disfunción mitocondrial como un fenómeno de compromiso intrínseco en el consumo de oxígeno celular.

1.1. Disfunción macrovascular.

El estado de hipoperfusión en la sepsis tradicionalmente se atribuye a una disfunción del sistema cardiovascular que abarca componentes del choque cardiogénico, hipovolémico y distributivo, de tal manera, la sepsis presenta diferentes patrones hemodinámicos (63, 64, 65). Inicialmente se observa un gasto cardiaco (GC) disminuido producto del descenso del volumen plasmático (66), el incremento de la capacitancia venosa (CV) (67, 68), de la resistencia vascular pulmonar (RVPulm) (69, 70) y el deterioro de la contractilidad cardiaca (71, 65). Posterior a la resucitación volumétrica se observa un patrón de GC incrementado (72) que compensa la fuga del plasma sanguíneo por los capilares, los incrementos en la CV, la RVPulm, y el deterioro de la contractilidad miocárdica (73, 74). Estas dos etapas de disfunción cardiovascular acontecen durante un periodo de vasodilatación arterial de tal manera que la disminución de la resistencia vascular periférica (RVP) y el incremento de la frecuencia cardiaca (FC) contribuyen a que el GC permanezca relativamente elevado pese a la persistencia de la disfunción miocárdica (75). Una vez se realiza la optimización de la precarga con el aporte volumétrico, el descenso de la presión arterial (PA) que se observa en el paciente séptico corresponde a la persistencia de la vasodilatación periférica y a la disminución de la contractilidad miocárdica (76). Finalmente, la progresión a choque séptico se manifiesta cuando en este contexto de disfunción cardiovascular existe un compromiso de la perfusión tisular. Este compromiso puede ser evidenciado por la elevación concomitante del lactato a nivel sérico y por el incremento de otras variables relacionadas con el desbalance entre el consumo y el aporte de oxígeno (77).

Frente a la progresión de eventos ya mencionada es necesario realizar dos salvedades; en primera instancia, la suposición de que la hiperlactatemia en sepsis es un indicador de hipoperfusión tisular es una hipótesis que ha sido reevaluada y actualmente la hiperlactatemia más allá de identificar hipoperfusión es un indicador de hiperactividad simpática, de compromiso en la función hepática y renal, de hipoperfusión esplácnica y del establecimiento de un metabolismo centrado en la glicolisis aeróbica (15, 78, 79), no obstante, su papel como indicador de mal pronóstico y como variable destinada a orientar la resucitación del paciente críticamente enfermo permanece vigente (45, 80). En

segunda instancia, hoy conocemos que las variables macrohemodinámicas mencionadas anteriormente (RVP, GC, FC y TA) no siempre se correlacionan con la microcirculación durante la injuria séptica (54), por tanto, es posible observar en esta patología una disociación entre la macro y la microcirculación.

1.2. Disfunción microvascular y daño endotelial.

La perfusión tisular es el último determinante de la entrega de oxígeno a nivel microcirculatorio, y de manera contraria al paradigma macrocirculatorio centrado en presiones, su regulación fisiológica se lleva a cabo por los cambios en el flujo (81), por tanto, el control del tono vascular llevado a cabo por el endotelio es el encargado de regular la entrega de oxígeno de acuerdo a los requerimientos metabólicos de cada órgano (82, 83), dicho control responde principalmente a factores físicos (shear stress), miogénicos, neuro-humorales y metabólicos (84, 85).

En este proceso de control del flujo microcirculatorio el endotelio modula la liberación de sustancias vasodilatadoras entre las cuales el óxido nítrico (ON) es el mediador más estudiado; el ON actúa como activador la enzima Guanilato Ciclasa (GC), la cual se encarga de producir un incremento en los niveles de Guanosín Monofosfato Cíclico (GMPc) desencadenando la relajación del músculo liso (86). En la sepsis existe una desregulación en la producción del ON causada principalmente por la expresión incrementada de la Óxido Nítrico Sintasa (ONS), enzima que se expresa de manera heterogénea en diferentes lechos vasculares, favoreciendo el desarrollo de shunts arterio-venosos, lo cual conlleva a la aparición de zonas hipoperfundidas adyacentes a zonas con perfusión normal e incluso incrementada, constituyéndose de esta forma, un estado de heterogeneidad microcirculatoria propio de la patología séptica (87). Adicionalmente, este fenómeno de heterogeneidad explica el comportamiento de las variables derivadas del consumo de oxígeno, como la SvO₂, la cual puede encontrarse normal o incluso incrementada como producto de los shunts arterio-venosos y el flujo heterogéneo resultante (88).

Otras alteraciones en la microcirculación acompañan al proceso séptico, y se asocian con la progresión de la disfunción multiorgánica: a) La destrucción del glucocálix que expone a la célula endotelial al estrés oxidativo incrementa la permeabilidad vascular y altera el mantenimiento de los gradientes de presión encargados de regular el intercambio capilar (89). b) La pérdida de la sensibilidad a las catecolaminas que deriva en la disminución del tono microvascular (90). c) El incremento de la agregación plaquetaria que contribuye a la generación de microtrombos y a la destrucción del glucocálix endotelial (91). Por último, d) Los eritrocitos presentan alteraciones reológicas que deterioran su deformabilidad y favorecen su agregabilidad en la superficie endotelial incrementando con esto la heterogeneidad microcirculatoria (92).

Diferentes autores plantean que el daño endotelial y la disfunción microcirculatoria son los eventos causantes del establecimiento de la disfunción multiorgánica que se observa en la sepsis (93, 94). En concordancia con lo anterior, es posible observar a través de la microscopia de campo oscuro (SDF) que aquellos pacientes con choque séptico con mayor cantidad de alteraciones en la visualización de la microcirculación sublingual desarrollan un mayor compromiso multiorgánico, por otro lado, aquellos pacientes que optimizan el estado de su microcirculación cursan con un descenso en la severidad de la disfunción multiorgánica (95). Adicionalmente, la cuantificación de productos de degradación del glucocálix ha demostrado la presencia de valores mayores en los pacientes con choque séptico que no sobreviven (96). Esta evidencia sugiere que la microcirculación es participe en el deterioro orgánico que se observa en la sepsis y que el daño endotelial puede ser indicativo de mal pronóstico en estos pacientes.

Si consideramos que la adecuada distribución del flujo sanguíneo depende de la autorregulación fisiológica de la microcirculación; los fenómenos como la pérdida de control del tono vascular y la heterogeneidad microcirculatoria conllevan al descenso del aporte de oxígeno y favorecen la instauración de hipoxia tisular (39, 97). En este contexto, el deterioro de la oxigenación celular es causado directamente por la caída del aporte de oxígeno (DO_2), descenso que en condiciones fisiológicas no se acompaña del descenso concomitante del consumo de oxígeno (VO_2), sin embargo, existen reportes

que indican como múltiples factores contribuyen a la detención de la cadena transportadora de electrones, impidiendo el sostenimiento del VO_2 y favoreciendo el desarrollo de hipoxia celular por mecanismos no convectivos (98, 99).

1.3 Disfunción Mitocondrial.

Una teoría contra intuitiva, establece un fenómeno de disfunción mitocondrial como el causante de la disfunción multiorgánica en el choque séptico, esta teoría ha sido planteada teniendo en cuenta que los estudios que han dirigido sus intervenciones a la optimización de variables derivadas del DO_2 no han proporcionado resultados favorables en términos de desenlaces (100), lo cual sugiere que la mejoría del estado macro y microhemodinámico no conlleva necesariamente a la reversión de la hipoxia a nivel celular (101, 85). Adicionalmente, en los últimos años se ha investigado en torno a los mecanismos celulares que favorecen la disfunción orgánica en la sepsis y en este sentido la muerte celular secundaria a hipoxia es un fenómeno plausible teniendo en cuenta la progresión del compromiso circulatorio, sin embargo, en la sepsis se ha reportado una escasa presencia de muerte celular pese a un estado de evidente falla multiorgánica, y las únicas células que presentan una disminución en su número han sido encontradas a nivel del tracto gastrointestinal, el endotelio y las células del sistema inmune, mientras que a nivel de otros órganos no ha sido posible demostrar áreas significativas de necrosis o apoptosis celular (102). Inclusive, existen datos de modelos experimentales en los cuales se observa normalidad e incluso incremento en la biodisponibilidad de oxígeno una vez se ha establecido la disfunción multiorgánica propia del choque séptico (103, 104, 105). En este mismo sentido, existe evidencia experimental en torno a la detención de la fosforilación oxidativa que ocurre como producto de la señalización proinflamatoria desencadenada por el lipopolisacárido de bacterias gram-negativas (46). En síntesis, estos hallazgos sugieren que el descenso en el VO_2 es causado por la desregulación de la función mitocondrial, disminuyendo con esto el consumo de energía a nivel celular, (106, 107, 12) y favoreciendo un estado de hibernación en el cual se preserva la supervivencia celular a costa de la función tisular y orgánica (19, 108, 109).

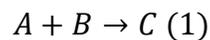
Durante la disfunción mitocondrial que ocurre en sepsis es posible observar que existen órganos incapaces de utilizar eficientemente sus combustibles metabólicos pese a presentar tensiones tisulares de oxígeno óptimas. Este fenómeno se conoce como hipoxia citopática y complementa el paradigma de la disfunción mitocondrial en la sepsis (110, 111). En este mecanismo de hipoxia celular la obtención de energía recae en el sostenimiento de la vía glucolítica debido a que el funcionamiento mitocondrial se encuentra comprometido (112), lo cual deriva en un aumento en la generación de H^+ provenientes de la hidrólisis del ATP (113) y dado que también existe algún grado de disfunción en la fosforilación oxidativa (114, 115) este fenómeno se acompaña de la generación concomitante de radicales libres (116, 117). Considerando lo anterior, las alteraciones mitocondriales en la sepsis pueden generar una aparente adaptación a la hipoxia mediante el desarrollo de un estado de hibernación o pueden ser francamente desadaptativa si su progresión conlleva al sostenimiento de los mecanismos de daño propios de la hipoxia citopática.

En este momento desconocemos si la disfunción mitocondrial es un epifenómeno del proceso fisiopatológico e inmunológico de la sepsis o es una respuesta celular que se ejecuta ante la noxa séptica en aras de preservar la supervivencia de la célula (118, 62). Lo que es evidente es que la disfunción mitocondrial contribuye al proceso patológico con el cual se instaura la disfunción multiorgánica en la sepsis, no obstante, aun desconocemos el grado de contribución de las alteraciones mitocondriales en el pronóstico de los pacientes sépticos.

Si se desea entender el rol de la mitocondria en la progresión del choque séptico, es necesario aclarar en primera instancia el funcionamiento mitocondrial, los procesos metabólicos en los que se utiliza su maquinaria, su rol principal en el proceso de respiración celular, la síntesis del ATP y su adaptación en los procesos de hipoxia.

2. Bioenergética Celular.

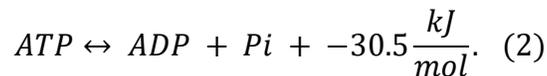
La primera ley de la termodinámica, afirma: “La energía total de un sistema aislado siempre permanece constante”. Podemos concluir; igualmente, que la energía no se crea ni se destruye, solo se transforma. Es decir, si en un sistema desaparece una clase de energía esta deberá producirse de manera exactamente equivalente en otra forma, tal y como se observa en nuestros procesos metabólicos, los cuales consumen energía química y generan diversos tipos de energía siempre en compañía de la liberación de energía calórica. La segunda ley de la termodinámica, establece: “En un sistema cerrado la energía disponible para realizar un trabajo siempre disminuye.” En este caso, la energía destinada para realizar un trabajo se conoce como energía libre de Gibbs (δG). De tal forma que en un sistema cerrado para que ocurra una reacción química de manera espontánea es necesario que la energía libre (δG) dentro del sistema disminuya. Por ejemplo:



Si la reacción (1) posee un δG negativo se observa la generación de reactivo (C) a partir de los productos (A y B), en esta reacción existe una liberación de energía y catalogamos a esta reacción como espontánea y exergónica. Si la reacción posee un δG positivo implica que para la obtención de (C) a partir de (A y B) es necesario que el sistema reciba energía, por tanto, conocemos a este tipo de reacciones como endergónicas, es decir, que consumen energía.

Nuestro organismo es incapaz de llevar a cabo reacciones químicas cuyo δG sea positivo, para esto se necesita que las reacciones que representan un consumo energético sean acopladas a reacciones con δG negativos, con lo cual, la energía libre total del sistema (δG_{tot}) permanece negativa. La reacción química de hidrólisis del ATP (2) es una reacción cuyo δG es igual -30.5kJ/mol ($-7,7\text{ kcal/mol}$) su utilización en la termodinámica de los sistemas vivos permite que reacciones con δG positivos

acontezcan de manera espontánea una vez se acoplan con la hidrólisis de uno de sus enlaces de anhídrido ácido:



Por tanto, el descenso en los depósitos celulares de ATP es un evento que si no se resuelve genera la pérdida de la funcionalidad de la célula y en caso de mantenerse conlleva a la muerte celular. Algunos estudios (119, 120), han corroborado la observación de un deterioro en la producción y en la utilización de ATP en el choque séptico, siendo este un factor determinante en la instauración de DOM en las fases tardías de la sepsis (107, 121). Para describir estas alteraciones en el balance del ATP es necesario proceder con la descripción de las vías metabólicas encargadas de su producción en condiciones fisiológicas y en condiciones patológicas:

2.1 Metabolismo Intermediario.

El metabolismo intermediario es el grupo de reacciones que se encargan de convertir los nutrientes que ingerimos en energía química a través de su catabolismo, o en biomoléculas más complejas a partir de su anabolismo.

Los carbohidratos y los lípidos se disponen como fuentes de energía a corto y largo plazo, mientras que las proteínas consolidan la masa funcional y activa del andamiaje celular y su rol como reservas energéticas en condiciones normales es pequeño (122). La oxidación de estas macromoléculas conlleva a la pérdida de electrones (e^-) los cuales son cedidos por las moléculas orgánicas en compañía de átomos de hidrógeno (H^+). Por ejemplo, la oxidación terminal de la glucosa resulta en la producción de un compuesto de baja energía como el dióxido de carbono (CO_2) y en la aceptación de sus electrones (e^-) y protones (H^+) por el oxígeno, produciendo H_2O (**Fig. 1**). Durante este proceso catabólico, e^- y H^+ son liberados en fases intermedias de la oxidación y son captados transitoriamente por las coenzimas nicotina adenina dinucleótido (NAD) y flavina adenina dinucleótido (FAD), posteriormente, serán cedidos a la cadena transportadora de electrones (CTE) ubicada en la membrana mitocondrial interna, esta cadena se compone

de 4 complejos respiratorios, cada complejo posee una mayor afinidad por los (e^-) y dicha afinidad se encuentra determinada por el potencial oxido reductor de cada complejo, de manera que los electrones avanzan desde el complejo I en el caso del $NADH+H$ y desde el complejo II en el caso del $FADH+H$, hasta el complejo IV (citocromo oxidasa), el cual se encarga de reducir el oxígeno en agua. El transporte de los electrones entre cada complejo se acompaña de la extrusión de los (H^+) hacia el espacio intermembrana, creando así un gradiente electroquímico sobre la membrana mitocondrial interna, este gradiente electroquímico conforma la fuerza protón-motriz que es empleada por el complejo V (ATP sintetasa) para acoplar la síntesis de ATP (reacción endergónica) con la entrada de (H^+) hacia la matriz mitocondrial (fenómeno exergónico).

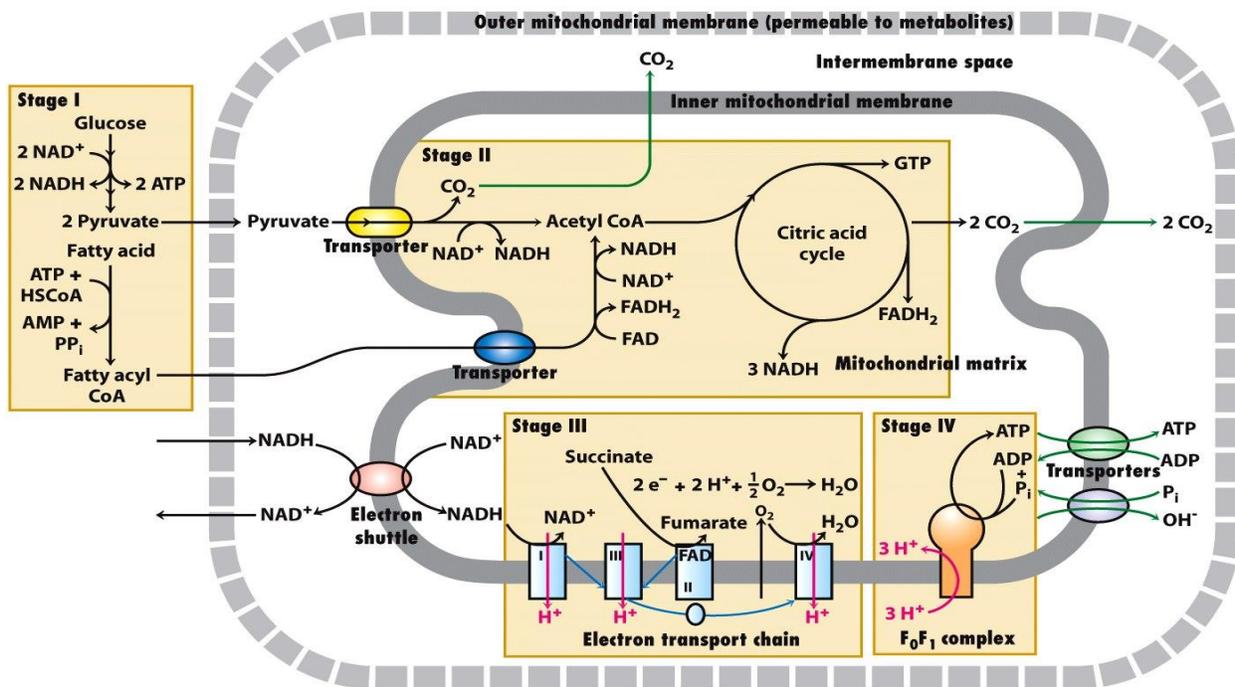


Figura 1. Esquema del metabolismo oxidativo. Tomado de: (123).

Este proceso de síntesis de ATP que conlleva a la reducción y a la oxidación de las moléculas transportadoras de electrones (NAD y FAD) generando CO_2 y H_2O se conoce como respiración mitocondrial y normalmente consume el 80% del oxígeno disponible en la célula en estado basal. Según estudios llevados a cabo en mamíferos

aproximadamente el 30% de este consumo de oxígeno se utiliza en la síntesis de proteínas (**Tabla 1**), un 25% se emplea en el funcionamiento de la Na⁺/K⁺ ATPasa, 10-15% en el funcionamiento de la bomba Ca⁺⁺ ATPasa, 10% en la generación de glucógeno, urea y fracciones pequeñas del ATP total se emplean para la síntesis de ácidos nucleicos.

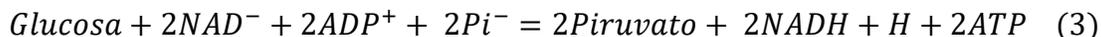
Tabla 1. Consumo de oxígeno de las funciones celulares.

Tissue	Protein Synthesis	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Ca ²⁺ -ATPase	Other Major Contributors
Liver	24	5-10	5	Gluconeogenesis (15-40%) and urea synthesis (12%), substrate cycling (26%), oligonucleotide synthesis (5%), proton leak (26%), nonmitochondrial (20%)
Gastrointestinal tract	74	60		
Kidney	6	40-70		Gluconeogenesis (5%)
Heart	3	1-5	15-30	Actinomyosin ATPase (40-50%), proton leak (15% max)
Brain	5	50-60	Significant	
Skeletal muscle	17	5-10	5	Proton leak (50%), nonmitochondrial (14%)

Contribución al consumo de oxígeno total por parte de los principales procesos metabólicos tisulares de un mamífero (rata) en condiciones standard. Tomado de: (124)

2.2- Producción de ATP a partir de la Glucosa.

La glicolisis puede considerarse como un proceso metabólico en el cual una molécula de glucosa se divide en 2 moléculas de piruvato en presencia de oxígeno; en este proceso se obtiene la ganancia de 2 moléculas de ATP y 2 moléculas de NADH+H, tal y como se observa en la siguiente reacción:



Inicialmente (**Tabla 2**), se hace necesario fosforilar la glucosa generando en primera instancia glucosa-6-fosfato (G6P), esta molécula al estar ionizada evita su salida de la célula gracias a la adición de un grupo fosfato. La G6P puede proseguir el metabolismo oxidativo de la glicolisis o puede ser convertida en glucosa-1-fosfato como paso previo a la síntesis de Glucógeno, adicionalmente puede ser utilizada por la vía de las pentosas fosfato cuando se requiere sintetizar ácidos nucleicos y NADPH.

Tabla 2. Reacciones metabólicas del proceso oxidativo de la glucosa.

#	Reaction	Enzyme
<i>G6P from glycogen</i>		
	Glycogen _n + Pi ²⁻ → Glycogen _{n-1} + Glucose 1-phosphate	Phosphorylase
	Glucose 1-phosphate → Glucose 6-phosphate	Phosphoglucomutase
<i>G6P from glucose</i>		
	Glucose + MgATP ²⁻ → Glucose 6-phosphate ²⁻ + MgADP ⁻ + H ⁺	Hexokinase
<i>Glycolysis</i>		
1	Glucose 6-phosphate ²⁻ → fructose 6-phosphate ²⁻	Glucose-6-phosphate isomerase
2	Fructose 6-phosphate ²⁻ + MgATP ²⁻ → fructose 1,6-bisphosphate ⁴⁻ + MgADP ⁻ + H ⁺	6-Phosphofructokinase
3	Fructose 1,6-bisphosphate ⁴⁻ → Dihydroxyacetone phosphate + Glyceraldehyde 3-phosphate ²⁻	Aldolase
4	Dihydroxyacetone phosphate → Glyceraldehyde 3-phosphate ²⁻	Triose Phosphate Isomerase
5	2 Glyceraldehyde 3-phosphate ²⁻ + 2NAD ⁺ + 2Pi ²⁻ → 2 1,3-bisphosphoglycerate ⁴⁻ + 2 NADH + 2 H ⁺	Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase
6	2 1,3-bisphosphoglycerate ⁴⁻ + 2 MgADP ⁻ → 2 3-phosphoglycerate ³⁻ + 2 MgATP ²⁻	Phosphoglycerate kinase
7	2 3-phosphoglycerate ⁴⁻ → 2 2-phosphoglycerate ⁴⁻	Phosphoglycerate mutase
8	2 2-phosphoglycerate ³⁻ → 2 phosphoenolpyruvate ³⁻ + 2H ₂ O	Phosphopyruvate hydratase
9	2 phosphoenolpyruvate ³⁻ + 2 MgADP ⁻ + 2 H ⁺ → 2 pyruvate ⁻ + 2 MgATP ²⁻	Pyruvate kinase
		Net protons per 2 pyruvate

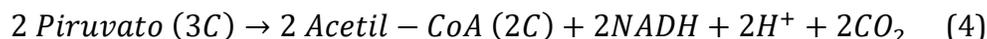
Reacciones balanceadas de acuerdo a carga, protones y agua. Tomado de: (113)

En caso de continuar con la oxidación de la glucosa (**Tabla 2**), la molécula de 6 carbonos se isomeriza a fructosa y posteriormente se fosforila una segunda vez para ser dividida en dos fragmentos de 3 carbonos conformados por gliceraldehído-3-Fosfato (GA3P) y dihidroxiacetona fosfato esta última se isomeriza a (GA3P), molécula que es llevada a un proceso de fosforilación y deshidrogenación por el complejo enzimático de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GA3PDH) generando 2 moléculas de 1,3-bifosfoglicerato y 2 moléculas de NADH+H por cada molécula de glucosa. A continuación, se procede a fosforilar el ADP mediante la enzima bifosfoglicerato quinasa liberando un ATP a partir de un fenómeno conocido como fosforilación a partir del sustrato. En este punto se generan 2 ATP mediante el metabolismo intermediario de la glucosa y sin necesidad de la utilización de la maquinaria mitocondrial. Los siguientes pasos de la glicolisis conllevan a la formación de piruvato con la subsecuente generación

de 2 moléculas de ATP las cuales se consideran como la restitución de los 2 ATP empleados en la fosforilación de la glucosa en la fase inicial de su metabolismo.

2.3- Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos

El piruvato obtenido mediante la glicolisis será llevado al CAT mediante su descarboxilación en acetil coenzima-A (CoA) (2 Carbonos), este proceso es llevado a cabo por la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) generando CO_2 y $\text{NADH} + \text{H}^+$, como se observa en la reacción (4):



Una vez obtenido el acetil CoA, este se condensa con oxalacetato (4 Carbonos) formando citrato (6 Carbonos), esta reacción catalizada por la enzima citrato sintasa se considera como el principal punto de entrada al CAT. A partir de este punto se puede analizar al CAT como un sistema de regeneración de oxalacetato, constituyendo así, una vía cíclica que reutilizará el oxalacetato cuando otra molécula de acetil CoA se incorpore al ciclo. De esta forma, se evita la acumulación de subproductos carbonados ya que si el oxalacetato fuese el metabolito final del metabolismo intermediario una dieta de 2000 Kcal generaría al final del día 800 gramos de oxalacetato, lo cual resultaría imposible de eliminar por nuestras vías metabólicas (29). El anterior problema se resuelve con la utilización de una vía cíclica que emplea 8 enzimas (**Tabla 3**) para regenerar el Oxalacetato, y en la cual, cada giro del ciclo conlleva a la obtención de 1 ATP en forma de GTP y 2 moléculas de CO_2 (**Fig. 2**); además, la importancia metabólica del CAT en condiciones aeróbicas radica en la entrega de $4 e^-$ con sus respectivos H^+ a 3 moléculas de NAD y a 1 de FAD. Teniendo en cuenta que son 2 las moléculas de Acetil-CoA que ingresan al CAT obtenemos el siguiente equilibrio:



Tabla 3. Bioenergética del CAT.

Reaction	Enzyme	$\Delta G^{\circ\prime}$ (kJ · mol⁻¹)	ΔG (kJ · mol⁻¹)
1	Citrate synthase	-31.5	Negative
2	Aconitase	~5	~0
3	Isocitrate dehydrogenase	-21	Negative
4	α -Ketoglutarate dehydrogenase multienzyme complex	-33	Negative
5	Succinyl-CoA synthetase	-2.1	~0
6	Succinate dehydrogenase	+6	~0
7	Fumarase	-3.4	~0
8	Malate dehydrogenase	+29.7	~0

Un total de 8 reacciones que presentan diferentes valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ (Cambios en la Energía Libre Standard) y de ΔG (Cambios en la Energía Libre Actual), la primera hace referencia a la reacción en condiciones Standard y la segunda a las condiciones de un sistema Fisiológico. El ΔG determina el comportamiento in-vivo de la reacción, por tanto, cuando se acoplan las 8 reacciones en el CAT su comportamiento global tiende hacia la liberación energía. Tomado de: (125).

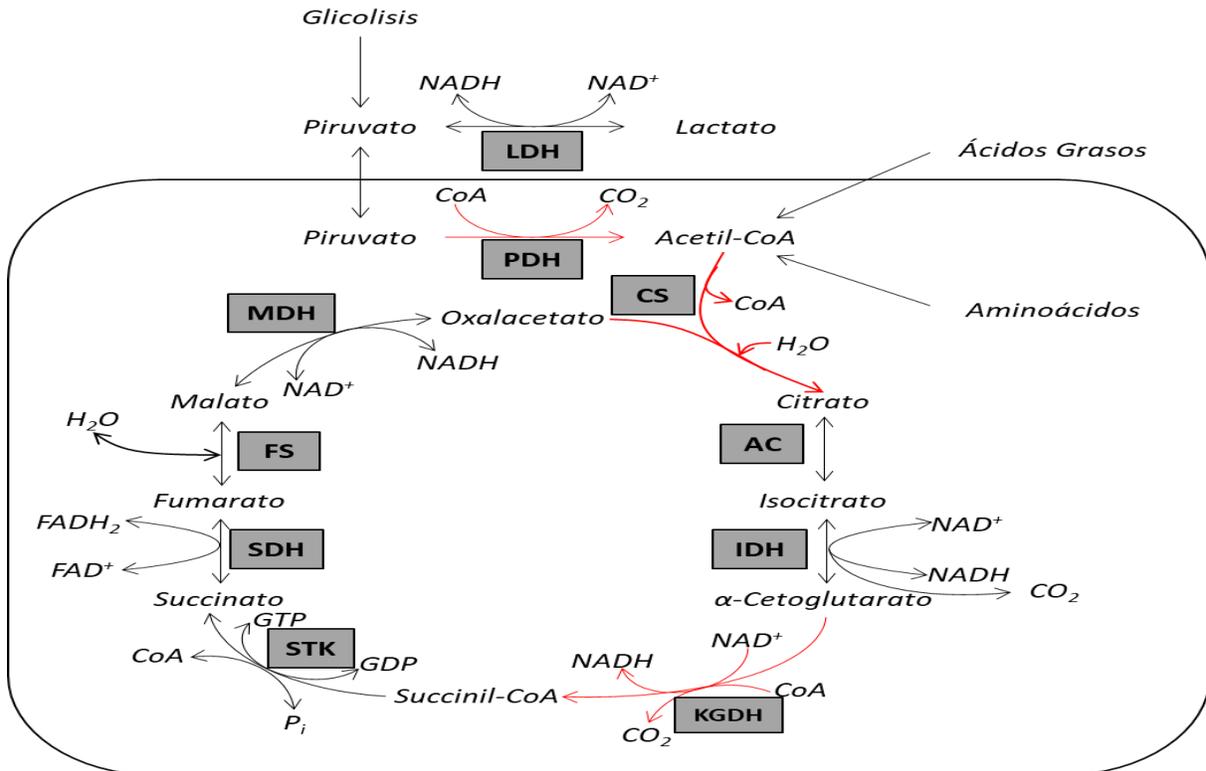


Figura 2. Funcionamiento del CAT. La enzima Citrato Sintasa (CS) y la enzima Cetoglutarato Deshidrogenasa (KGDH) son las únicas enzimas irreversibles del ciclo, esta última genera NADH lo cual hace que el funcionamiento anterógrado del CAT requiera de la biodisponibilidad de NAD⁺.

2.4 Fosforilación Oxidativa.

Como es evidente, en ninguna de las reacciones previas se ha requerido al oxígeno como agente reductor ya que este evento sólo ocurre al final del transporte de los electrones, en un fase conocida como la tercera fase del metabolismo intermediario; siendo la primera fase, la generación de acetil CoA a partir de los macronutrientes disponibles y la segunda fase, las reacciones de descarboxilación y de oxido-reducción que son realizadas por el CAT y que producen la mayor cantidad de moléculas transportadoras de electrones (**ver Fig. 1**), de manera interesante, en la fase 1 y 2 ocurre una producción anaeróbica de CO₂, fenómeno que puede estar relacionado con la preservación de los gradientes arterio-venosos de CO₂ en condiciones de hipoxia (126).

En la tercera fase, el $\text{NADH}+\text{H}^+$ y el FADH_2 entregan sus electrones a los complejos respiratorios I y II, respectivamente. El tránsito de los electrones sobre los complejos genera la extrusión de H^+ desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana (**Fig. 3**); el complejo I exporta 4H^+ al igual que el complejo III, el complejo IV solo exporta 2H^+ y el complejo II no exporta ningún H^+ , de esta forma, la circulación de electrones desde el $\text{NADH}+\text{H}^+$ genera la extrusión de 10H^+ al espacio intermembrana mientras que la circulación de electrones desde el FADH_2 genera la extrusión de solo 6H^+ . Posteriormente, los protones transferidos al espacio intermembrana son empleados por la Fase 4 del metabolismo, en la cual, el complejo V sintetiza ATP mediante el gradiente quimiosmótico generado por la extrusión de H^+ (**ver Fig. 3**).

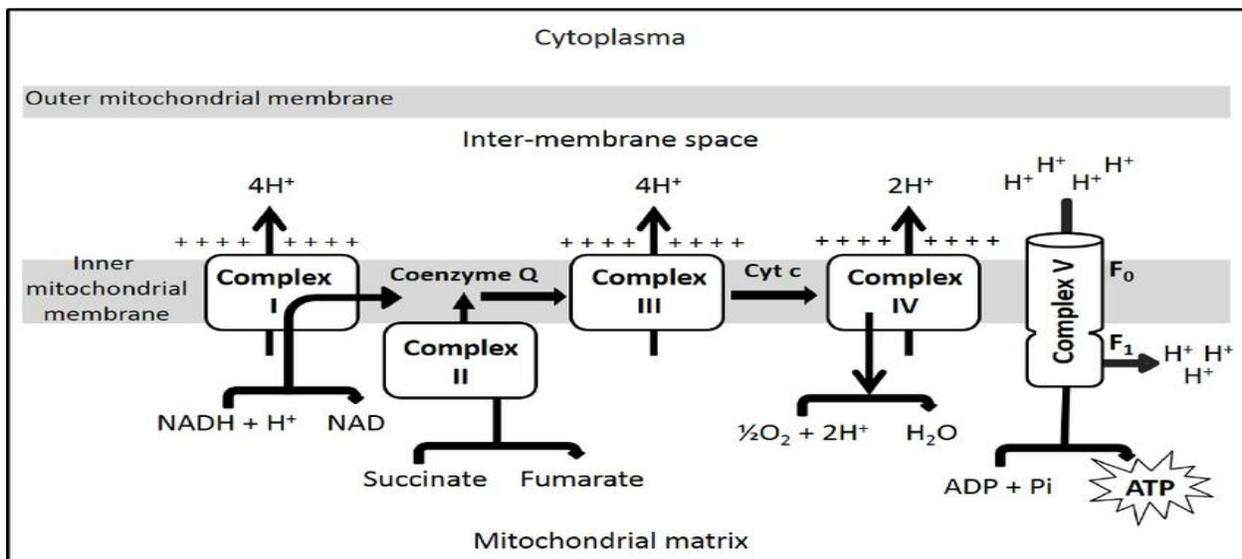
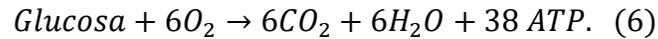


Figura 3. Funcionamiento de la cadena transportadora de electrones. Los equivalentes reductores obtenidos por el CAT permiten la síntesis de ATP mediante el transporte de los electrones por y la extrusión de protones por la CTE; el $\text{NADH}+\text{H}^+$ y el FADH_2 generan aproximadamente 3 y 2 moléculas de ATP, respectivamente. Tomado de: (127)

La bioenergética de las siguientes reacciones permite que en condiciones aeróbicas 38 moléculas de ATP sean producidas por 1 molécula de glucosa; 2 ATP se obtienen por la glicolisis, 2 GTP adicionales que se convierten en ATP se obtienen por el CAT, por tanto, 4 moléculas de ATP se producen sin necesidad de la Fosforilación oxidativa. Las 34 moléculas restantes de ATP se producen por el transporte de electrones que ocurre a partir del $\text{NADH}+\text{H}^+$ y el FADH_2 : El complejo GA3PDH de la glicolisis genera 2 $\text{NADH}+\text{H}^+$

por cada molécula de glucosa, lo cual, en adición a los 8 NADH+H que produce el CAT, genera 30 moléculas de ATP, y finalmente, las 2 moléculas de FADH₂ que se obtienen por la oxidación del Succinato generan los 4 ATP restantes. La oxidación de la glucosa se resume en la reacción (6):



3. La crisis energética en la sepsis.

En condiciones de laboratorio una célula que se encuentra expuesta a un medio saturado con aire al 21% presenta concentraciones de oxígeno equivalentes a 200µM, mientras tanto, una mitocondria “in vivo” se encuentra expuesta a un rango de tensiones de oxígeno que oscila alrededor del 5%, lo cual, equivale a aproximadamente 46µM. (128). Para que exista hipoxia a nivel intracelular es necesario que las tensiones de oxígeno se encuentren por debajo del margen requerido para sostener el funcionamiento celular en una condición particular; por tanto, es necesario mencionar que el término “umbrales de hipoxia” es una simplificación que no puede ser extrapolada a todas las células ya que el requerimiento energético de una célula varía dependiendo del tejido, de su entorno y su condición; bien sea esta, basal, stress o inflamación. Por el anterior motivo existen diferentes rangos de presiones o concentraciones de oxígeno a partir de los cuales las células desarrollan hipoxia (129).

Tensiones de oxígeno inferiores a los requerimientos celulares para mantener la generación de ATP causan lo que se conoce como “disoxia”, por tanto, el termino disoxia representa el estado en el cual la obtención de energía se torna dependiente de la biodisponibilidad de oxígeno (130, 101). Como condición necesaria para el establecimiento de disoxia se necesita inicialmente un descenso en la tensión del oxígeno a nivel celular; el cual, la célula tolera mediante el descenso del potencial de fosforilación expresado a partir de la relación: $[\text{ATP}]/[\text{ADP}][\text{Pi}]$ y la disminución en el estado oxido reductor: $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$; esto favorece la actividad catalítica de la glicolisis e incrementa la obtención de energía por vías no dependientes de oxígeno (113), sin

embargo, la persistencia de hipoxia requiere de respuestas a largo plazo que son generadas por el incremento de la actividad del factor inducible por la hipoxia tipo 1 (HIF-1), este es un factor encargado de activar la transcripción de cerca de 200 genes que constituyen los elementos respondedores a la hipoxia (HRE) (131). Los anteriores mecanismos le confieren a la célula un margen de adaptabilidad a la hipoxia que depende de los requerimientos energéticos celulares, si no es posible suplir la generación de ATP que demanda la célula; la obtención de energía pasa a ser dependiente de la biodisponibilidad de oxígeno instaurándose con esto un estado de disoxia (129).

Las adaptaciones metabólicas a la hipoxia se encuentran presentes en todo el reino eucariota (132, 133), en el caso de los mamíferos se observa un descenso de la fosforilación oxidativa y un incremento de la vía glucolítica anaerobia, esta reorientación metabólica se genera por múltiples mecanismos; entre ellos: La translocación de los transportadores de Glucosa hacia la membrana celular (134), el incremento en la síntesis de las enzimas de la glicolisis (135), el ascenso de la actividad de la enzima fosfofructoquinasa (136), el aumento en la expresión de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK-1) la cual es una quinasa del complejo PDH encargada de inhibir su función impidiendo la descarboxilación oxidativa del piruvato y con esto su entrada al CAT (137). Algunas de estas adaptaciones responden directamente al descenso en la concentración del oxígeno (efecto Pasteur), sin embargo, existen otros estímulos que son mediados por otros mecanismos, como lo son; la señalización de proteínas quinasas (138), la transcripción inducida por HIF-1 (131, 135) y también la producción de radicales libres (139), entre otros.

Durante la sepsis se plantea a la hipoxia como una vía común en el desarrollo de DOM, no obstante, los fenómenos de reprogramación metabólica no siempre se desencadenan por un descenso en la biodisponibilidad del oxígeno. En 1925 Otto Warburg postuló a partir de sus observaciones en tejidos tumorales que las células cancerígenas obtienen su energía en condiciones aerobias a partir de la glicolisis en reemplazo a la fosforilación oxidativa siendo esta una característica metabólica de estas células; y la cual, se relaciona con la presencia de disfunción mitocondrial (20, 140). Este efecto, conocido

como efecto Warburg ha sido estudiado por varias décadas en las células tumorales, y en los últimos años se ha planteado su existencia en la fisiopatología de la sepsis (141), lo cual sugiere un estado de reprogramación metabólica independiente de la instauración de hipoxia, fenómeno que ha sido posible de observar en las células del sistema inmune y que se ha caracterizado por ser una respuesta adaptativa durante las fases tempranas de la sepsis (142). En este sentido, los procesos de activación de células como los neutrófilos, macrófagos y linfocitos se encuentran relacionados con un cambio fenotípico que ocurre como respuesta a la infección y que reordena sus vías metabólicas (22). A pesar de lo anterior, la presencia del efecto Warburg en la sepsis resulta paradójica ya que de encontrarse documentada en condiciones hipóxicas se consideraría como una respuesta homeostática que busca mantener el gasto energético de la célula (143), sin embargo, el hecho de que se encuentre en condiciones de normoxia implica una reprogramación metabólica en la cual pese a existir biodisponibilidad de oxígeno, la célula recae en el metabolismo “anaerobio” de la glucosa, por lo tanto, este fenómeno observado en la sepsis oscila entre un mecanismo adaptativo vs deletéreo para la célula (144).

Actualmente, conocemos que los mecanismos de disfunción orgánica en la sepsis son múltiples y complejos, al momento, la evidencia es consistente en reportar la existencia de disfunción mitocondrial en el choque séptico (105, 108, 145). El debate actual se centra en entender si la disfunción mitocondrial y la reprogramación metabólica son eventos que preceden a la instauración de las alteraciones en la perfusión, o son fenómenos desencadenados por el descenso en el aporte de oxígeno como respuesta adaptativa ante una disfunción macro y microvascular (85, 39).

4- Reprogramación metabólica en la Sepsis.

Para el entendimiento de los mecanismos de reprogramación metabólica y su rol en la adaptación a la injuria séptica se requiere de una postura que tenga en cuenta a la sepsis como una patología compleja dada su heterogeneidad y el gran número de factores que afectan su comportamiento fisiopatológico y pronóstico. En congruencia con lo anterior,

se hace necesario aportar evidencia particular en torno a múltiples vías metabólicas, su reprogramación y su interrelación durante la sepsis, por tanto, el presente documento busca aportar conocimiento alrededor de un tema particular y se centra específicamente en el funcionamiento del CAT.

4.1- Reprogramación Metabólica e intermediarios del CAT.

Dentro del paradigma metabólico tradicional de la sepsis se ha observado la disminución proporcional de la actividad de la citrato sintasa conforme se descienden las tensiones de oxígeno, indicando la disminución en la masa mitocondrial (128), igualmente, existe un consenso respecto a la disminución de la actividad de la PDH en condiciones de hipoxia (146, 147), y como producto de la señalización mediada por LPS (148), a su vez, se ha reportado la asociación de la hipoxia con la detención de la fosforilación oxidativa (149, 150) evento que también puede desencadenarse por mecanismos independientes de la biodisponibilidad del oxígeno (hipoxia citopática) (151, 114, 152, 153). Partiendo de estas observaciones el paradigma tradicional establece que el CAT se encuentra “apagado” como producto del descenso de la relación NADH/NAD^+ , factor común en todos los anteriores escenarios, sin embargo, el CAT posee ciertas características evolutivas y bioquímicas que hacen posible la reorientación de sus reacciones y le otorgan un funcionamiento diferencial durante la hipoxia/hipoxia citopática. Lo anterior, se sustenta principalmente en tres hallazgos:

1- *El CAT es una vía anfibólica.* Esto implica que la misma vía es capaz de utilizarse en procesos catabólicos o anabólicos. En el caso de la oxidación de la Glucosa y los ácidos grasos; la entrada del acetyl CoA al CAT mediante su condensación con el oxalacetato es una reacción que se cataloga como anaplerótica y es el principal punto de entrada al ciclo, no obstante, el CAT interviene en la gluconeogénesis y la lipogénesis para lo cual se emplean los intermediarios malato y citrato, respectivamente, constituyendo lo que se conoce como reacciones catapleróticas, aunque ambos procesos se entiendan como vías bioquímicamente opuestas se encuentran intrínsecamente relacionadas. Por un lado, la anaplerosis ocurre cuando suceden reacciones de biosíntesis que emplean

intermediarios del CAT, lo cual requiere repletar los intermediarios del ciclo (anaplerosis) que abandonan la mitocondria, el proceso opuesto también es necesario, de tal manera que se extraen intermediarios del CAT (cataplerosis) cuando se incorporan los productos de otros sustratos al ciclo como parte de reacciones anapleróticas. El equilibrio entre cataplerosis y anaplerosis indica que el CAT no solo es un punto pivote en el metabolismo intermediario sino que es una ruta metabólica compuesta por múltiples flujos de sustratos (30) (**Fig. 4**), en la cual, el tipo de intermediario que ingresa o se extrae depende del tejido y del balance energético celular, como ejemplos de lo anterior podemos destacar: El enterocito en condiciones postprandiales utiliza la Glutamina como fuente de energía, para esto se acopla la entrada del alfa-cetoglutarato al CAT con la salida del Malato al citoplasma y su incorporación a la vía glucolítica (154). Un escenario diferente se observa en las células tubulares renales en condiciones de ayuno, en estas circunstancias se hace necesario el ingreso de aminoácidos al CAT; cuando ocurre la entrada del alfa-cetoglutarato al ciclo esta se acopla con la desaminación del glutamato y la excreción de amonio a la luz de los túbulos renales, este proceso constituye una vía adicional al ciclo de la urea para la eliminación del ion amonio, y por ende, incrementa el valor calórico de la oxidación proteica ya que la excreción renal de amonio, a diferencia del ciclo de la urea, no requiere de energía (155), en este caso, el ingreso de aminoácidos al CAT compensa el descenso de la actividad glucolítica y mantiene las reservas energéticas. Como se verá más adelante, la anaplerosis en condiciones de baja biodisponibilidad de oxígeno es una respuesta clave de la reprogramación metabólica que ocurre durante los estados de hipoxia tisular.

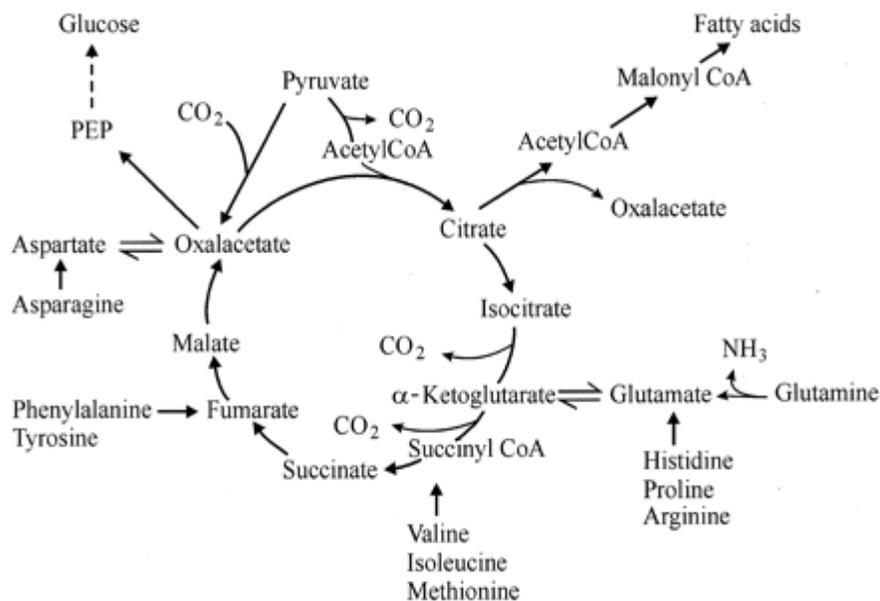


Figura 4.

El funcionamiento del CAT está constituido por reacciones anapleróticas y catapleróticas. Se observa la entrada al ciclo de los aminoácidos en diferentes instancias, el ingreso del Piruvato mediante su descarboxilación en Acetyl-CoA, y mediante su carboxilación en Oxalacetato llevada a cabo por la Piruvato Carboxilasa (PC). Las reacciones catapleróticas se ilustran en el acople del ciclo con las vías de la lipogénesis y la gluconeogénesis. Tomado de 30.

2- Es un ciclo que no involucra la molécula del oxígeno. Según datos extraídos de la biología evolutiva, las enzimas del CAT inicialmente se encontraban en medios anaeróbicos (156), lo cual explica porque ninguna de sus reacciones consume oxígeno. En congruencia con lo anterior, es posible observar en los procariontes un andamiaje enzimático del CAT similar al que se encuentra en el reino eucariota; sin embargo, sus enzimas conservan una configuración no cíclica que les permite operar en condiciones de anaerobiosis y que debido a su naturaleza fragmentada genera la acumulación de subproductos metabólicos. Observaciones pertenecientes a la biología comparativa indican que el comportamiento cíclico de las enzimas del CAT se encuentra presente en *Rickettsia*, género bacteriano a partir del cual se incorporaron por endosimbiosis las estructuras encargadas de llevar a cabo la respiración celular, y por tanto, de acoplar la obtención de energía con el consumo de oxígeno (156), de esta forma, la aparición del metabolismo aerobio en los eucariotas se encuentra ligada con la apropiación de un funcionamiento cíclico o canónico del CAT (157). Partiendo de estas consideraciones es posible suponer que en condiciones de descenso en la biodisponibilidad de oxígeno la célula conserve la capacidad de reprogramar sus vías metabólicas mediante el retorno a un metabolismo anaeróbico, en el cual, se pierda el funcionamiento canónico del CAT y se reemplace por un funcionamiento fraccionado o no canónico que permita la adaptación a la hipoxia, suposición que es válida ya que desde hace más de 50 años se

dispone de evidencia que ha documentado la producción de CO₂ por el CAT en condiciones de anoxia (28).

3- *Funcionamiento Fraccionado*. En circunstancias de ausencia de oxígeno se asume que la enzima alfa-cetoglutarato deshidrogenasa (KGDH), enzima similar al complejo PDH, y por ende, modulada por la relación NADH/NAD⁺, se encuentra inhibida, no obstante, actualmente se ha descrito en modelos celulares de isquemia/reperfusión (159), sepsis (31, 33) y en modelos animales de choque (47) la posibilidad de que el CAT posea una configuración alternativa que le permita el funcionamiento de sus enzimas en hipoxia como producto del acople termodinámico de sus reacciones. Si se analiza inicialmente el funcionamiento del CAT en condiciones basales encontramos que el δG_{total} de sus reacciones es negativo, sin embargo, si observamos cada enzima por separado es evidente que el CAT se divide en dos partes de acuerdo a la energía libre generada por sus reacciones (160) (**Tabla 2**). A la primera parte se le conoce como fase oxidativa y abarca desde la síntesis de citrato hasta la síntesis de alfa-cetoglutarato, siendo todos estos procesos exergónicos en su naturaleza, en especial, la reacción de la KGDH, una reacción que es irreversible y que se caracteriza por ser dependiente de NAD⁺. A la segunda parte del CAT pertenecen las reacciones que hacen parte de la llamada fase reductora, ya que en el metabolismo bacteriano funcionan en el sentido inverso, estas reacciones poseen δG pequeños e incluso algunos de ellos son positivos, se destaca en esta parte la reacción de la malato deshidrogenasa (MDH) la cual posee un δG de: +29.7 kJ/mol lo cual implica que es una reacción que normalmente sucedería en el sentido contrario (oxalacetato \rightarrow malato) (161), el hecho de que in-vivo esta reacción genere oxalacetato se debe a que dentro del CAT el funcionamiento de esta enzima se acopla a dos factores: El primero, es el consumo metabólico constante del oxalacetato, lo que favorece que la reacción de la MDH tienda hacia la generación de este intermediario por ley de acción de masas. El segundo, es la participación de esta reacción dentro de un ciclo metabólico lo que permite que su funcionamiento se acople a las reacciones exergónicas de la primera parte del CAT (27).

En condiciones de hipoxia/hipoxia citopática es evidente que la pérdida de la actividad de la KGDHC es el principal impedimento para el funcionamiento anaeróbico del ciclo ya que las concentraciones bajas de NAD^+ y el incremento de NADH impiden la persistencia del CAT en su forma canónica debido a que el mayor control enzimático del ciclo se centra en esta enzima (162). No obstante, durante estas circunstancias se observa que el flujo metabólico del CAT deja de ser cíclico y pasa de ser una vía encargada de regenerar oxalacetato a convertirse en una vía que favorece la acumulación de Succinato por dos caminos (163, 164) (**Fig. 5**). El primer camino ocupa la parte de predominio endergónico del CAT o fase reductora que opera en sentido inverso como producto de la acumulación de NADH , inicialmente la actividad “inversa” de la MDH regenera NAD^+ y sintetiza Malato; posteriormente, la reversión de las siguientes reacciones se detiene con la generación de succinato, llevada a cabo por la enzima succinato deshidrogenasa (SDH). El segundo camino de este funcionamiento fragmentado se acopla a la reacción inversa de la MDH (166) y la regeneración de NAD^+ , con el cual, es posible mantener la actividad irreversible de la KGDH y el sostenimiento de las reacciones de predominio exergónico de la fase oxidativa del CAT, estas reacciones ocurren en sentido anterógrado y conllevan a la obtención de succinil CoA, un compuesto que posee un enlace tioéster liberador de energía y es el sustrato de la enzima succinato tioquinasa (STK), enzima encargada de llevar a cabo el proceso de fosforilación a partir del sustrato generando GTP y nuevamente, succinato.

El anterior funcionamiento no canónico del CAT se ha descrito en modelos celulares de hipoxia (166, 167) y en linajes de células tumorales humanas (168), estas observaciones indican que la reprogramación del CAT cumple un rol importante en la supervivencia celular debido a que algunos de sus intermediarios (succinato, fumarato y oxalacetato) actúan como estabilizadores del HIF-1 mediante la inhibición de las enzimas prolihidroxilasas (PHD), enzimas que en condiciones normales conllevan a la ubiquitinación del HIF-1, por tanto, la inhibición de las PHD favorece la señalización del HIF-1, generando el sostenimiento de la glicolisis anaeróbica, la inhibición de la descarboxilación oxidativa del piruvato, el incremento de la autofagia mitocondrial, y el

consecuente descenso de la actividad aeróbica de la mitocondria (32). Adicionalmente, en condiciones de disfunción de la CTE el funcionamiento no canónico del CAT libera ATP a partir de su interconversión con GTP, actualmente se desconoce si esto conlleva a una optimización de la bioenergética celular, sin embargo, es evidente que la persistencia de la actividad enzimática del CAT conlleva a adaptaciones metabólicas y funcionales útiles en el contexto de la respuesta a la hipoxia celular (169).

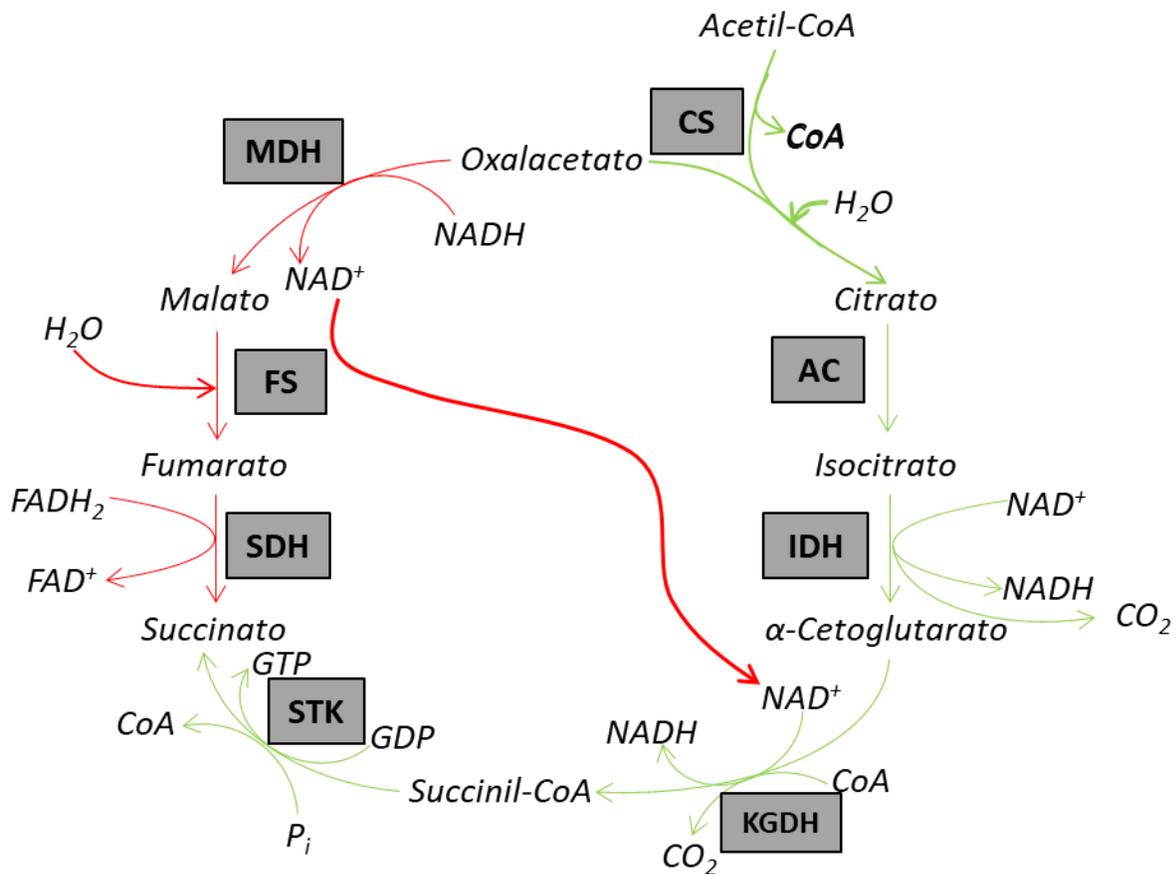


Figura 5. Funcionamiento no canónico del CAT. En condiciones de hipoxia/hipoxia citopática el CAT opera revirtiendo el funcionamiento de la MDH lo que permite regenerar NAD⁺ y sostener la reacción irreversible de la KGDH. El funcionamiento fragmentado del CAT ocurre por dos vías: La vía anterógrada u oxidativa (flechas verdes), y la vía retrograda o reductora (flechas rojas) que incluye la reversión de las reacciones llevadas a cabo por las enzimas MDH, FMS y SDH. Adaptado de (27).

4.2- Reprogramación del CAT y su relación con la Sepsis.

Recientemente se le ha atribuido a esta reprogramación del CAT un rol protector, en el cual, las alteraciones metabólicas ocurren como un mecanismo destinado a descender el consumo de oxígeno mitocondrial, y adaptar el gasto energético celular a la utilización de la glucólisis. En concordancia, tanto los fenómenos de hipoxia tisular (39) como de hipoxia citopática (110), han sido reportados como desencadenantes de la reprogramación metabólica que se observa en la sepsis (21, 144). El CAT, al ser un punto clave en la regulación del metabolismo intermediario responde ante los requerimientos energéticos celulares y ante la biodisponibilidad de los sustratos metabólicos (30), por tanto, se plantea que desempeña un rol adaptativo durante la respuesta a la hipoxia, la modulación de la respuesta inflamatoria y la supervivencia celular.

La elevación de los intermediarios del CAT se ha documentado en modelos animales de choque, en pacientes en cuidado crítico y en pacientes con sepsis. Hace aproximadamente 40 años Cerra y Siegel describieron el perfil metabólico que se observaba en los pacientes que fallecían de sepsis (170), los autores, indicaron de una manera reveladora para la época que la respuesta metabólica de la sepsis se centraba en el sostenimiento de vías catabólicas, de las cuales, la Glucólisis y la Lipólisis eran las vías destinadas a sostener el balance energético para posteriormente dar paso a la proteólisis periférica. Un artículo seminal entorno al metabolismo en la sepsis elaborado en 1980 (171) establecería que los pacientes no supervivientes a la sepsis, no sólo exhibían un metabolismo catalítico con predominio de la elevación de aminoácidos ramificados, sino que dicho estado no es posible de reprimirse con el suministro de aminoácidos ramificados exógenos, a diferencia de los pacientes supervivientes, en quienes se observó a nivel sérico la elevación de Alanina, lo cual reflejaba la transaminación de los aminoácidos ramificados con el Piruvato, poniendo en evidencia como los individuos supervivientes poseían una maquinaria enzimática capaz de permitir el sostenimiento anaplerótico del CAT y un metabolismo predominantemente catalítico. Recientemente, se ha documentado que la anaplerosis del CAT ocurre por mecanismos no canónicos en estados de choque hemorrágico (47) y de daño por isquemia/reperfusión (34), en estas circunstancias el CAT presenta un funcionamiento a

partir de la entrada de sustratos diferentes a la glucosa; en especial la glutamina, y los ácidos grasos, las conclusiones de estos estudios identifican una detención de la fosforilación oxidativa y un CAT que al igual que como se describió por Cerra y Siegel en el 80 se nutre a partir de otros sustratos energéticos.

Otra perspectiva del CAT y su funcionamiento durante la sepsis surge del entendimiento de la reprogramación metabólica en las células del sistema inmune. Intermediarios del CAT como lo son el Citrato y el Succinato se han encontrado asociados a los procesos de señalización celular de respuestas inmunitarias y proinflamatorias (172,173, 174). El Citrato, ha demostrado ser un sustrato que interviene en la generación de especies reactivas de oxígeno y en la producción de prostaglandinas (175), además, la estimulación de su transporte mitocondrial se incrementa por la señalización mediada por LPS y la inhibición de su transportador se asocia a un descenso en la producción de óxido nítrico (172), por tanto, actualmente se considera que posee un rol importante en la reprogramación de la inmunidad celular.

El succinato es una sustancia clave en el metabolismo y en especial en condiciones de hipoxia e inflamación, se le han descrito funciones reguladoras sobre los receptores TLR (Toll Like Receptor); estimulando su expresión, favorece también la síntesis de IL-1b, e incrementa la actividad de las células presentadoras de antígeno (176). El succinato también controla enzimas esenciales de la vía glucolítica y del CAT (incluyendo el complejo PDH) estimulando su funcionamiento mediante el proceso de succinilación, un proceso que hace parte de los mecanismos de regulación postraducciona y que es llevado a cabo por enzimas conocidas como sirtuinas (Sirt 1 - 6) (177), estas enzimas se encuentran reguladas de manera negativa por la concentración de NAD⁺ y de manera positiva por el succinato, lo cual sugiere que este intermediario actúa como un indicador del estado oxido-reductor celular y como un posible regulador de las adaptaciones metabólicas.

Finalmente, un rol adicional del succinato sobre el metabolismo es la estabilización del HIF-1 mediante la inhibición de las PHD, incluso en condiciones de normoxia (178),

evento que como se ha puesto en evidencia en modelos celulares de infusión de LPS sucede durante el funcionamiento anaplerótico del CAT (31) y no se limita únicamente a la actividad del succinato sobre las PHD sino que también incluye la inhibición de PHD mediada por fumarato y al oxalacetato (32).

En consonancia con lo anterior podemos concluir que el funcionamiento de las reacciones metabólicas del CAT persiste en condiciones de hipoxia/hipoxia citopática mediante la instauración de un funcionamiento no canónico, en el cual, sus vías se encuentran fragmentadas y resultan en la acumulación de succinato. Al momento, desconocemos si la intervención en las vías anfibólicas de esta autopista metabólica confiere un beneficio durante la deficiencia multifactorial en la utilización de oxígeno que se observa en la sepsis, no obstante, de acuerdo con nuestra perspectiva, la investigación en torno a la anaplerosis y la cataplerosis del CAT contribuye al entendimiento de la reprogramación metabólica que ocurre en la sepsis, reprogramación que no se limita únicamente a la alteración de la fosforilación oxidativa y al daño por estrés oxidativo como marcadores de disfunción mitocondrial, sino que también incluye la respuesta dinámica del metabolismo intermediario analizada a partir de las concentraciones plasmáticas de los intermediarios del CAT.

La investigación aquí planteada busca identificar el cambio en el tiempo de las concentraciones de los intermediarios del CAT posterior a la inducción de choque por endotoxemia en un modelo animal porcino, por lo que sabemos, hasta el momento no se ha documentado el comportamiento temporal de los intermediarios del CAT a nivel sérico durante la sepsis.

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Evaluar el comportamiento temporal de los intermediarios del CAT durante las primeras seis horas de choque en un modelo de animal porcino de endotoxemia inducido por polisacárido.

Objetivos Específicos.

Determinar los cambios de los niveles de succinato en la hora 0, 3 y 6, en el modelo de experimentación animal mencionado.

Determinar los cambios de los niveles del alfa-cetoglutarato en la hora 0, 3 y 6, en el modelo de experimentación animal mencionado.

Determinar los cambios de los niveles de citrato en la hora 0, 3 y 6, en el modelo de experimentación animal mencionado.

Determinar los cambios de los niveles de fumarato en la hora 0, 3 y 6, en el modelo de experimentación animal mencionado.

Determinar los cambios de los niveles de malato en la hora 0, 3 y 6, en el modelo de experimentación animal mencionado.

Determinar los cambios de los niveles de piruvato en la hora 3 y 6, en el modelo de experimentación animal mencionado.

Determinar los cambios de los niveles de lactato en la hora 3 y 6, en el modelo de experimentación animal mencionado.

Determinar los cambios de la relación lactato/piruvato en la hora 3 y 6, en el modelo de experimentación animal mencionado.

Establecer la correlación entre los intermediarios del CAT y los parámetros de perfusión tisular: Lactato y la relación lactato/piruvato.

Identificar el comportamiento de la relación DO_2/VO_2 durante el biomodelo y su relación con los hallazgos metabólicos.

Documentar el comportamiento hemodinámico del biomodelo durante la inducción de un patrón de choque hiperdinámico.

METODOLOGIA

- **Diseño de Investigación**

Estudio experimental.

- **Tamaño de la muestra**

Se calculó el tamaño de la muestra para un estudio animal con biomodelo porcino comparando dos grupos cuando el objetivo es estudiar una variable cuantitativa, según la siguiente fórmula:

$$\text{Tamaño de la muestra} = 2 \text{ SD}^2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 / d^2$$

Donde SD es la desviación estándar de estudios previos, y d es el tamaño del efecto o diferencia entre valores medios. Según los valores de dispersión de la concentración de succinato obtenidos en el estudio de Reisz et al (179) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Datos para el cálculo del tamaño muestral

Succinato en porcinos	Concentración	Valor de p
Basal Shock	4.88 ± 1.00 (SD) 77.08 ± 41.06 (SD)	<0.001

Tomando la SD de la concentración plasmática de succinato, y d como la diferencia entre las concentraciones de Succinato en estado basal y Shock ($d = 77.08 - 4.88 = 72.2$), para un nivel de significancia del 5% y un poder del 80%, se calcula el siguiente tamaño de muestra.

$$n = 2 (41.06)^2 (1.96 + 0.842)^2 / (72.2)^2$$

$$n = 2(1686) (7.85) / 5213$$

$$n = 26470/5213$$

$$n = 5.07$$

Considerando que un 10% de la población animal puede fallecer durante la experimentación se hace necesario un mínimo de 6 biomodelos. Sin embargo, dado que nuestro estudio hace parte de un protocolo de investigación destinado también a evaluar la elastancia dinámica durante los cambios hemodinámicos que ocurren con la endotoxemia, un mayor número de animales fue calculado (12 animales); 9 de estos serán sometidos a endotoxemia y 3 serán destinados al grupo de controles.

Adicionalmente, existe experiencia y protocolos estandarizados por otros grupos de investigación, usando la misma especie de cerdo, dosis de endotoxina similares, los cuales utilizan un número similar de animales. (18, 179, 180).

- **Criterios de selección**

Se utilizaron cerdos raza Yorkshire de aproximadamente 40 kg y con un promedio de edad de 120 días.

Se analizaron 9 cerdos sujetos al protocolo de inducción de choque séptico por LPS y 3 que controles que completaron 6 horas de observación posterior al periodo de estabilización.

- **Variables**

Tabla 5. Variables que se medirán en el estudio.

Variable	Definición	Tipo de variable	Medición
Succinato	Concentración de Succinato en Suero.	Cuantitativa Continua.	Estimación tentativa por HPLC: μM .

Alfa Cetoglutarato.	Concentración de Alfa Cetoglutarato en Suero.	Cuantitativa continua.	Estimación tentativa por HPLC: μM .
Citrato	Concentración de Citrato en Suero	Cuantitativa continua.	Estimación tentativa por HPLC: μM .
Fumarato	Concentración de Fumarato en Suero	Cuantitativa continua.	Estimación tentativa por HPLC: μM .
Malato	Concentración de Malato en Suero	Cuantitativa continua.	Estimación tentativa por HPLC: μM .
Lactato*	Concentración de Lactato en Suero.	Cuantitativa continua.	Estimación tentativa por HPLC: μM . Cuantificación amperimétrica en máquina de gases: mMol/L
Piruvato	Concentración de Piruvato en Suero.	Cuantitativa continua	Estimación tentativa por HPLC: μM .

Saturación venosa central de Oxígeno (SvcO ₂)	Porcentaje de Saturación de Oxígeno de la sangre venosa medida en la aurícula derecha.	Cuantitativa continua.	%
Aporte de Oxígeno (DO ₂)	Volumen de oxígeno que se transporta por minuto. DO ₂ = CaO ₂ × CI × 10.	Cuantitativa continua.	mL/min/m ²
Consumo de Oxígeno (VO ₂)	Volumen de oxígeno que se consume por minuto. VO ₂ = CI × C(a-v) O ₂ × 10.	Cuantitativa continua	mL/min/m ²
Extracción de oxígeno. (OE)	Porcentaje de Oxígeno que se consume en relación al Aporte. OE = VO ₂ /DO ₂ .	Cuantitativa continua	%
Presión arterial media.	Presión promedio durante un ciclo cardíaco.	Cuantitativa continua	mmHg
Presión venosa central	Presión venosa que se opone al retorno venoso.	Cuantitativa continua	mmHg
Frecuencia cardíaca	Latidos cardíacos por minuto	Cuantitativa continua	Latidos por minuto
Resistencia vascular periférica	Resistencia periférica al flujo sanguíneo. Cuantificada a partir de la fórmula: RVP=(PAM-PVC) / GC.	Cuantitativa continua	dyn/cm ⁵ /m ²

Gasto cardiaco	Volumen de sangre que circula por minuto en el sistema cardiovascular.	Cuantitativa continua	L/min
Volumen sistólico.	Volumen de sangre que es eyectada en cada latido cardiaco.	Cuantitativa continua	mL
Volumen global de final de diástole.	Volumen de sangre al final de la diástole que se encuentra en las 4 cámaras cardiacas. Cuantificado a partir de Termodilución Transpulmonar.	Cuantitativa continua	mL
Variabilidad de Presión de pulso.	Variabilidad de la presión de pulso durante la ventilación mecánica.	Cuantitativa continua	%
Variabilidad de volumen sistólico.	Variabilidad del volumen sistólico durante la ventilación mecánica.	Cuantitativa continua	%
Poder cardiaco.	Energía en Julios que se transfiere en 1 segundo. Cuantificado a partir de la fórmula: GC x PAM.	Cuantitativa continua	Watts
Presión media de llenado sistémico.	Presión ejercida en los vasos sanguíneos por el volumen estresado y que favorece el retorno venoso. Cuantificada a partir de la fórmula de	Cuantitativa continua	mmHg

	Parkin (181) PMLS= a x PVC + b x PAM + c x GC. a=0.96, b=0.04, c=constante antropométrica		
dP/dt max – Periférico	Pendiente máxima del ascenso sistólico de la presión. Cuantificada periféricamente.	Cuantitativa continua	mmHg/sec
Glucosa	Concentración sérica de glucosa.	Cuantitativa continua	mg/dL

- **Protocolo de estudio**

1. A 12 cerdos de raza Yorkshire con un peso aproximad de 40 Kg y de 120 días de edad se les realizó inducción anestésica, se usó como inductor anestésico Tiletamina Zolazepam (Zoletil®) a dosis de: 4.4 mg/kg vía intramuscular.
2. Después los modelos experimentales fueron canalizados en la vena marginal de la oreja, posterior a este procedimiento el modelo experimental se ubicó dentro de la zona de monitoreo para la fijación en mesa y se realizó cobertura de sus extremidades, se procedió a la inducción pre anestésica con Isoflurano al 1.5% por máscara facial, y se llevó a cabo la intubación orotraqueal con tubo endotraqueal número 6.5 y lidocaína en espray al 2%. Se inicio posteriormente ventilación mecánica con Vt 10 ml/kg a una FR de 20 veces por minuto y un PEEP de 5 cmH₂O.
3. Cuando el modelo porcino se encontraba en adecuada profundidad anestésica se garantizó asepsia y antisepsia de las zonas a intervenir; zona cervical e inguinal. Se realizó disección por planos hasta ubicar la vena yugular y la

arteria femoral respectivamente, posteriormente se insertó un catéter venoso central (PiCCO®) y línea arterial (PiCCO®) mediante venodisección. Se confirmó la correcta posición de los catéteres a través de su curva de presión.

4. El modelo experimental durante el desarrollo del protocolo se encontró posicionado en mesa quirúrgica con sujetadores de extremidades y se monitorizó su temperatura mediante un termistor ubicado en el catéter venoso central.
5. Después de la estabilización del biomodelo porcino, entre 30 a 60 minutos, en el grupo de endotoxina se procedió a administrar LPS E-Coli 055: B5 (Sigma, St. Louis, MO), iniciándose a una velocidad de infusión de 7 µg/kg/h y la cual se incrementó cada 10 minutos (7, 14 y 20 µg/kg/h) hasta una infusión de 20 µg/kg/h. En el grupo control no se suministró endotoxina.
6. Se administraron bolos de SSN para la realización de un reto de líquidos con el propósito de evaluar la respuesta a volumen durante el biomodelo. El reto de líquidos se realizó cada hora en ambos grupos y se llevó a cabo mediante la infusión de un bolo de SSN de 4 cc/kg a una velocidad de 100 ml/min. Previo a la infusión de cada bolo de SSN se calibró el sistema (PiCCO®) mediante la infusión por triplicado de 20 cc de agua a < 4°C de temperatura, este procedimiento se realizó nuevamente al final de la infusión de cada reto de líquidos con el propósito de ajustar el análisis de contorno de onda a las variaciones hemodinámicas inducidas.
7. En los tiempos señalados en la Tabla 6 se procedió a extraer muestras de sangre arterial y venosa para su análisis gasimétrico y para su análisis por HPLC, respectivamente.

8. En el grupo de endotoxemia posterior a la instauración de choque, definido como PAM < 50 mmHg, se procedió a detener la infusión de LPS. Se inició inmediatamente el suministro de 1 bolo de lactato de Ringer a una dosis de 20 cc/kg, al cabo de 1 hora se inició el suministro de Noradrenalina iniciando con una dosis de 0,05 mcg/kg y titulando con ascensos de 0,05 mcg/kg cada 30 minutos hasta obtener un PAM \geq 65 mmHg o hasta la terminación del biomodelo (**Fig. 6**). En el grupo control la única maniobra de reanimación que se llevó a cabo fue la infusión de un bolo de 20cc/kg de lactato de Ringer a las 3 horas de haberse alcanzado la estabilización del biomodelo este tiempo se definió de manera previa teniendo en cuenta que en biomodelos similares el tiempo de inestabilidad acontece entre las 2 y las 3 horas (180). (**Fig. 7**).

Tabla 6. Tiempos para la toma de muestras en el modelo animal.

Tiempo	Grupo Control	Grupo de Endotoxina
T ₀ (Basal)	Inmediatamente completado el período de estabilidad hemodinámica.	Inmediatamente completado el período de estabilidad hemodinámica y previo al suministro de la endotoxina.
T ₁ (3H)	3 horas posterior al periodo de estabilidad hemodinámica.	3 horas posterior al inicio de la infusión de Endotoxina.
T ₂ (6H)	6 horas posterior al periodo de estabilidad hemodinámica.	6 horas posterior al inicio de la infusión de Endotoxina.

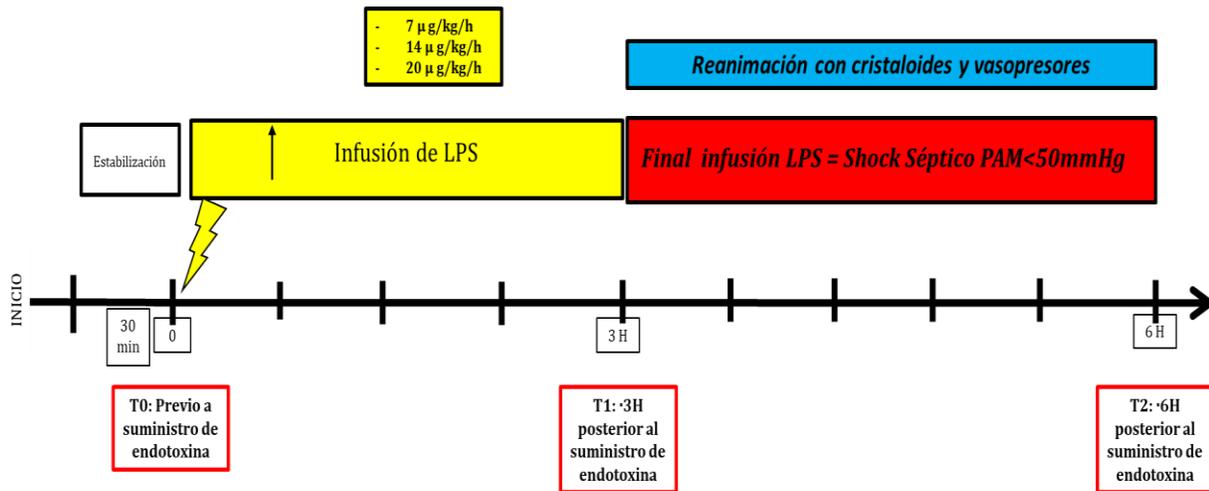


Figura 6. Resumen del protocolo de inducción de choque por endotoxemia y reanimación hemodinámica, se aproxima el tiempo de inicio de choque (suspensión de LPS) a las 3 horas con fines representativos.

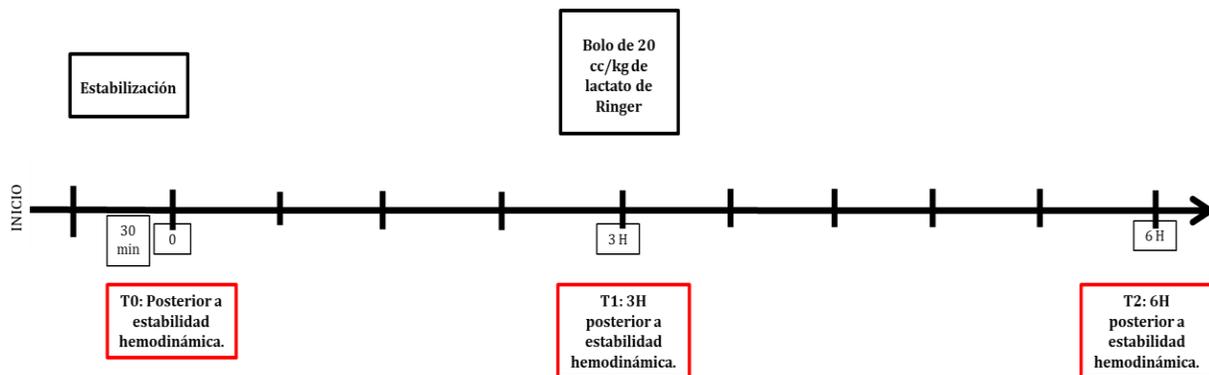


Figura 7. Resumen del protocolo del grupo control.

Protocolo de medición de Gases Arteriales.

- 1- En el tiempo T0, T1 y T2 se realizó la extracción de muestras de sangre venosa mediante jeringa no heparinizada.
- 2- Posteriormente una muestra aproximada de 1 ml fue analizada mediante una máquina de gases sanguíneos AVL OMNI™ 1-9 RADIOMETER en donde:

- La medición de lactato se obtuvo a partir del método amperométrico que utiliza un electrodo de platino acoplado a la reacción de oxidación de la enzima lactato oxidasa.
- La medición de la pCO_2 se realizó por el método amperométrico que utiliza un electrodo de Severinghaus - Stow.
- La medición de la pO_2 se realizó por el método amperométrico que utiliza un electrodo de Clark.
- La medición de SvO_2 se realizó mediante el método de espectrofotometría, calculando la concentración relativa a partir de la absorción de la luz a diferentes longitudes de onda y conociendo el valor del hematocrito.

Protocolo de preparación para análisis por HPLC.

- 1- En los tiempos descritos, se extrajo una muestra de sangre venosa equivalente a 10 ml mediante una jeringa no heparinizada y posteriormente este volumen se depositó en vacutainers heparinizados de 5 ml.
- 2- Los vacutainers fueron centrifugados a 1500 x g por un tiempo de 10 minutos con el uso de una centrifuga cuyo rotor y cuyos portatubos fueron previamente conservados a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, de esta forma se aisló el plasma de las muestras recolectadas.
- 3- Una vez obtenido el plasma fue rápidamente transferido a unidades de ultrafiltración AMICON Ultra 15 para filtración de partículas superiores a 30.000 kDa, las cuales se centrifugaron a 1560 x g por 15 minutos con el uso de un nuevo rotor y nuevos portatubos también mantenidos a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 4- El ultrafiltrado obtenido se almacenó a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ser llevado a su análisis en las siguientes 24 horas. Previos trabajos han demostrado la utilidad de este procedimiento para evitar el descenso de las concentraciones de los ácidos del CAT y facilitar su análisis diferido (181,182).

- 5- Las muestras se trasladaron al laboratorio de Cromatografía de la Universidad Nacional de Colombia, donde se realizó el análisis de las muestras mediante el uso de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)
- 6- Mediante el uso de HPLC se obtuvo la cuantificación tentativa en μM de los siguientes ácidos: Pirúvico, Láctico, Succínico, Alfa-Cetoglutarico, Cítrico, Fumárico y Málico.

Protocolo de análisis mediante HPLC

- 1- En la fase inicial de la implementación de la metodología para la separación y cuantificación por HPLC de metabolitos del CAT, se siguió el procedimiento descrito por Shurubor et al (183).
- 2- Se realizó la validación del método por cada uno de los analitos, y por cada uno de estos se hicieron una serie de disoluciones partiendo de una solución estándar de 1 mM de los patrones: Ácido Pirúvico, A. α - Cetoglutarico, A. Cítrico, A. Fumárico, A. Succínico, A. Láctico y A. Málico, así como de una mezcla de los 7 patrones.
- 3- La ecuación de la recta para la curva obtenida se expresa de acuerdo a: $y = m x + b$ con un coeficiente de determinación (R^2) para todas las curvas ≥ 0.999 , corroborándose la correlación lineal que existe entre las dos variables (X-Y). Los análisis por HPLC se realizaron por triplicado para cada solución estándar, observándose los siguientes niveles de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ):

Tabla 7. Niveles de detección y coeficientes de determinación de los analitos cuantificados.

ANÁLITO	LOD	LOQ	R2
----------------	------------	------------	-----------

Ácido Pirúvico	0,000176	0,000535	1
A. Mállico	0,00156	0,00474	0,9995
A. Láctico	0,003	0,008	0,9991
A.α- Cetoglutárico	1,329E-04	0,000402	0,9989
A. Cítrico	1,009E-03	0,00306	0,9997
A. Fumárico	1,478E-05	0,0000447	1
A. Succínico	0,00287	0,00870	1

- 4- Con esta fase de validación se estandarizó la técnica para la cuantificación de intermediarios por HPLC.
- 5- Para todas las separaciones cromatográficas, se utilizó el sistema HPLC Hitachi Primaide, bomba cuaternaria 1110, Automuestreador 1210, Detector UV-Vis 1410. Se empleó una columna Fase Reversa C18 Phenomenex, Prodigy 5u ODS3 100A (250X4.6 mm). Como fase Móvil se utilizó una solución Buffer de Fosfato de Sodio a 20 mM (pH 2.9). Las disoluciones patrón y las muestras problema se prepararon en Ácido Perclórico al 10%.
- 6- Los análisis se realizaron con un detector UV-Vis ajustado a una longitud de onda de 210nm y con un flujo de fase móvil de 0.45ml/min en modo isocrático y variando el flujo en el tiempo iniciando en 0,3ml/min por 7 minutos y luego a un flujo de 0.45ml/min hasta 18 min.

Disposición del cadáver

Todos los modelos experimentales una vez finalizado el protocolo de estudio fueron sacrificados por el profesional veterinario según los criterios internacionales de la AVMA (American Veterinarian Medical Association), este procedimiento se realizó mediante la administración de Pentobarbital sódica más Difenilhidantoina (Euthanex ®) a dosis de 1ml por cada 5 kg de peso vía intravenosa. Estos lineamientos son guiados por la AVMA (Asociación Americana

de Medicina Veterinaria), donde se contemplan los métodos de sacrificio de animales avalados para procesos investigativos. La decisión de causar eutanasia se valida por el grado de riesgo sanitario y de bioseguridad que se pueden generar por parte de estos animales al ser fuentes de inoculación y reservorios de productos activos de anestesia, analgesia, antibioticoterapia y sedación. El uso de animales dentro de este protocolo no generó viabilidad para su supervivencia posterior, ya que el grado de cambios hemodinámicos y los estados de morbilidad que se generaron durante el transcurso de esta investigación comprometieron seriamente la normalidad de sus variables fisiológicas.

La técnica de eutanasia fue realizada únicamente por el médico veterinario encargado, el cual contaba con matrícula profesional vigente y con la experiencia profesional indicada para llevar a cabo este proceso.

Criterios de punto final.

- Si el biomodelo presentaba PAM menor de 30 mm Hg sin respuesta a dosis de noradrenalina hasta 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$
- Si el biomodelo presentaba signos de hipertermia maligna (temperatura mayor a 40 grados, frecuencia respiratoria mayor a 40 veces por minutos y mucosas congestionadas).
- Conclusión del tiempo de observación: 6 horas en el grupo control y 3 horas posterior al choque en el grupo de endotoxemia.

Control de sesgos

Considerando que este es un estudio experimental se tomaron medidas para evitar el sesgo de medición, para esto el grupo a cargo de la preparación del animal, su inducción anestésica, su intubación y su posterior monitorización por

un personal certificado en anestesia veterinaria. Este personal estuvo encargado de garantizar la inducción de choque por endotoxemia en el biomodelo porcino.

Para evitar el sesgo de confusión desencadenado por el tiempo entre la toma de la muestra y el análisis por HPLC de la misma se realizó la ultrafiltración del plasma del animal y su posterior almacenamiento a -20 °C con el propósito de preservar la estabilidad de estos intermediarios hasta el momento de su análisis. El análisis fue realizado en las primeras 24 horas de extraída la muestra.

Cuando se realizó la determinación de intermedios metabólicos del CAT se contó con la disposición del laboratorio de Cromatografía de la Universidad Nacional de Colombia en donde personal capacitado en el método de identificación por la técnica de HPLC llevó a cabo la cuantificación de los intermediarios del CAT en las muestras de ultrafiltrado plasmático.

Previo a la realización de los análisis que se utilizaron para la elaboración del presente trabajo de investigación se capacitó al personal pertinente en:

- La preparación del biomodelo animal.
- La monitorización hemodinámica del Biomodelo.
- El ajuste de las interfaces dispuestas para la obtención de las variables hemodinámicas.
- La inducción de choque séptico con patrón hiperdinámico por infusión de dosis subletales de LPS.
- La toma de muestras de sangre venosa para su análisis mediante gasimetría.
- La toma de muestras de sangre arterial para su análisis mediante HPLC.
- La preparación de las muestras de sangre arterial para su análisis mediante HPLC
- La cuantificación de los ácidos del CAT mediante el uso de HPLC

- **Análisis estadístico.**

- Se realizó un análisis descriptivo de las variables en estudio, se calcularán medidas de tendencia central (mediana y media) y de dispersión (desviación estándar).
- Se realizó una prueba de normalidad para definir la distribución de las variables principales: Succinato, alfa-Cetoglutarato, Citrato, Fumarato y Malato. En el caso de una distribución normal se utilizó estadística paramétrica, en caso de ausencia de distribución normal se empleó estadística no paramétrica, para tal propósito se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov.
- Las diferencias de las medianas de las concentraciones entre T0 - T1, T0 - T2 y T1 - T2 para cada grupo se analizaron mediante el test de Wilcoxon. Se calcularon por el mismo método las diferencias entre grupo control y grupo endotoxemia para cada tiempo.
- Se realizó una regresión lineal simple (RLS) de los intermediarios que se elevaron de manera significativa para calcular el coeficiente de determinación entre sus concentraciones y las concentraciones de Lactato.
- El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software estadístico STATA.

- **Consideraciones Éticas.**

De acuerdo con los principios establecidos en Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Guide), en la resolución 008430 de octubre 4 de 1993 y en la ley 84 del 27 de diciembre de 1989; y debido a que esta investigación se consideró como molestia menor por lo cual en cumplimiento con los aspectos mencionados en el artículo 87 de la presente resolución, este estudio se desarrolló conforme a los siguientes criterios:

- La presente investigación pretende contribuir con la comprensión y el conocimiento de los principios biológicos para el adecuado manejo del paciente humano en estado crítico.
- Solamente se emplearon animales adquiridos legalmente y se mantuvieron en condiciones adecuadas que cumplieron con las reglamentaciones sanitarias vigentes.
- El presente estudio no se había realizado previamente en animales.
- Los resultados del presente estudio no eran posibles de obtenerse por otro medio idóneo como modelo matemático, simulación en computador y sistemas biológicos in vitro.
- Los investigadores nunca dejaron de tratar a los animales como seres sensibles.
- Los animales mantenidos a través de la investigación se mantuvieron bajo supervisión de médicos veterinarios con experiencia en animales de laboratorio.
- Los investigadores vigilaron el cumplimiento de las medidas de seguridad para el cuidado y manejo de los animales, así como las medidas de profilaxis y vacunación necesaria para la protección del personal ocupacionalmente expuesto.
- La eutanasia de los animales se efectuó con los anestésicos apropiados, aprobados por el médico veterinario encargado.
- Los investigadores y el personal encargado tienen la calificación apropiada para realizar procedimientos en animales.

La Universidad Nacional de Colombia vigiló, ordenó y ejecutó que se tengan en cuenta las siguientes medidas de seguridad, según el caso:

- Aislamiento
- La cuarentena
- La observación de personal.
- La vacunación de personas.
- La suspensión de trabajos o servicios.
- El aseguramiento y destrucción de objetos o productos o sustancias.

- Las demás de índole sanitaria que determine el ministerio de protección social o entidad competente de su nivel.

La investigación se comenzó una vez se obtuvo la aprobación por parte del comité de ética de medicina veterinaria y zootecnia de la Universidad nacional de Colombia (CB-FMVZ-UN-013-17).

- **Impactos esperados a partir del uso de los resultados.**

- Corroborar la elevación de los intermediarios del CAT a nivel plasmático en un biomodelo animal durante la inducción de choque séptico hiperdinámico mediante LPS.
- Establecer la dinámica temporal que siguen estos intermediarios durante el proceso de choque séptico hiperdinámico inducido por LPS.
- Generar resultados que sustenten una correlación entre la elevación de los intermediarios del ciclo de CAT y el desarrollo de hipoperfusión, esta última evaluada a partir de la cuantificación del lactato y la relación Lactato/Piruvato.
- Plantear una discusión académica entorno al abordaje metabólico del choque séptico, interpretando la elevación de ciertos intermediarios como epifenómenos de la disfunción mitocondrial que hace parte elemental de la fisiopatología del proceso séptico.
- Fortalecer la línea de investigación en Fisiología de Sistemas del Departamento de Fisiología de la Universidad Nacional.
- Brindar herramientas que permitan la elaboración de otros modelos animales de choque séptico con los cuales se profundice en la investigación traslacional para responder preguntas del ámbito clínico.

- Demostrar la importancia de estandarizar los procedimientos realizados en la preparación y el análisis del modelo animal de choque séptico inducido por LPS, así como enfatizar en el rigor con que se deben realizar estas investigaciones que incorporan el empleo de animales para simular condiciones patológicas que ocurren en humanos.

● **Cronograma de actividades.**

ACTIVIDADES (meses)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Preparación de la propuesta	X	X										
Revisión bibliográfica		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Estandarización de protocolo			X	X								
Reunión de coordinadores de proyecto		X			X			X			X	
Prueba piloto				X								
Recolección de información					X	X	X	X	X			
Validación de base de datos							X	X	X	X		
Análisis de datos									X	X	X	
Presentación de informe final												X

RESULTADOS.

Los resultados de nuestra experimentación incluyen el análisis de 12 cerdos hembra de raza Yorkshire de 4 a 5 meses, con un promedio de peso de 50 kg. Tres biomodelos hicieron parte del grupo control y 9 del grupo de endotoxemia. El promedio de volumen de líquidos empleado durante el protocolo fue semejante en los dos grupos; 3586 mL grupo control y 4043 mL en el grupo de endotoxemia. La dosis promedio de endotoxina y el tiempo promedio para el desarrollo de choque (PAM < 50 mmHg) por endotoxina fueron de aproximadamente: 2.55 mg y 170 minutos, respectivamente (**Tabla 8**).

Tabla 8. Características generales de los animales de los grupos Control y Endotoxemia

CASO No	C1	C2	C3	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
Sexo	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Peso (Kg)	48	50	48	50	52	52	49	48	47	50	50	50
Superficie corporal (m²)	0.93	0.96	0.93	0.96	0.98	0.98	0.94	0.93	0.92	0.96	0.96	0.96
Edad (meses)	5	4	4	5	5	5	4.5	5	4	5	4	4
Tiempo para Choque (min)				96	129	95	160	270	82	133	360	200
Dosis de LPS (µg)				1429	2052	1469	2435	4128	1126	2039	5000	3145
Volumen promedio de líquidos previo a T0 (mL).	964	970	1320	1466	1480	1485	1467	1467	1461	1670	1470	1470
Volumen promedio de líquidos T0 - T2 (mL).	2472	2560	2472	2560	2648	2648	2516	2472	2428	2560	2560	2560

C: Control, E: Endotoxemia. T0: Inicio del protocolo, T2: 6 horas posterior a T0.

El comportamiento hemodinámico del grupo control no presentó variaciones hemodinámicas significativas, en el grupo de endotoxemia se documentó el ascenso progresivo de la frecuencia cardiaca (FC) (T0:99 lpm y T2: 159 lpm), la variabilidad de la presión de pulso (VPP) (T0:19 %, T2: 28%), la variabilidad del volumen sistólico (VVS) (T0: 19%, T2: 28%) y el dP/dtmax (510 mmHg/sec en T0 y 889 mmHg/se en T2), la resistencia vascular periférica disminuyó inicialmente (T0: 1117 dyn/cm⁵/m²; T1: 776 dyn/cm⁵/m²) para posteriormente retornar a sus valores basales (T2: 967 dyn/cm⁵/m²), el

volumen global de final de sístole (GEDV) (T0:504 mL, T2:445 mL), la presión media de llenado sistémico (PMSF) (T0:16.98 mmHg, T2: 13.53 mmHg) y el volumen sistólico (VS) (T0:51 mL, T2: 34 mL) disminuyeron conforme progresó la endotoxemia (**Tabla 9**). Únicamente en el grupo de endotoxemia se observó el descenso significativo de la glicemia en T1 y T2 (T1: 76 mg/dL, T2: 76 mg/dL). En cuanto a la relación DO_2/VO_2 no se observaron diferencias significativas entre los grupos y durante la endotoxemia se observó la estabilidad de estas variables (**Tabla 9**).

Tabla 9. Variables hemodinámicas, glucemia y DO_2-VO_2 durante el biomodelo.

		T0 (Basal)	T1 (3H)	T2 (6H)
FC (lpm) ^{†‡}	Control	109 (103-111)	106 (86-122)	103 (75-128)
	LPS	99 (92-103)	141 (97-165)	159 (119-177) ¥
PAM (mmHg) ^{†‡}	Control	80 (71-81)	85 (63-92)	75 (73-81)
	LPS	75 (68-82)	52 (50-59) §	55 (44-64) ¥
PVC (mmHg)	Control	11.6 (7.1-13.3)	12.6 (10.5-13)	10.3 (8-11.3)
	LPS	11.3 (9.7-13.5)	11.9 (9-12.6)	8.7 (7.4-9.5)
RVP (dyn/cm ⁵ /m ²)	Control	1297 (1083-1339)	1123 (850-1523)	1016 (1013-1503)
	LPS	1117 (786-1165)	776 (487-960) §	967 (605-1248) £
GC-TD (L/min)	Control	4.89 (3.24-5.41)	4.34 (4.15-4.99)	5.89 (4.09-6.23)
	LPS	4.12 (4.05-5.58)	4.3 (4.01-7.66)	5.25 (2.82-7.16)
VS (ml)	Control	49 (30-51)	47 (36-47)	52 (50-57)
	LPS	51 (43-55)	40 (33-63)	34 (18-44) ¥
VGFD (ml) [‡]	Control	556 (474-591)	592 (458-608)	630 (550-636)
	LPS	504 (467-641)	455 (430-485)	445 (419-452) ¥
VPP (%) [‡]	Control	10 (7-19)	9 (5-18)	7(5-12)
	LPS	19 (14-20)	18 (13-28)	28 (21-31) ¥

VVS (%) ‡	Control	8 (8-14)	8 (6-15)	6 (5-10)
	LPS	16 (9-18)	19 (12-22)	24 (18-28) ¥
PC (W)	Control	0.97 (0.45-1.06)	0.88 (0.64-0.99)	0.94 (0.77-1.23)
	LPS	0.66 (0.61-0.93)	0.57 (0.53-0.97)	0.81 (0.32-1.16)
PMLS (mmHg)	Control	16.88 (12.50-17.04)	16.92 (15.98-18.37)	15.58 (13.63-16.39)
	LPS	16.98 (15.57-18.16)	15.44 (12.17-16.40)	13.53 (12.26-14.87) ¥
dP/dt max Periférico (mmHg/sec)††	Control	437 (332-528)	321 (314-522)	292 (202-372)
	LPS	510 (461-848)	637 (556-764)	889 (819-1329)
Glucosa (mg/dL)‡	Control	104 (84-106)	97 (82-99)	102 (83-141)
	LPS	110 (96-130)	76 (67-94) §	76 (69-103) ¥
DO₂ (mL/min/kg)	Control	13.82 (6.49-15.18)	11.45 (10.60-12.46)	14.73 (10.03-16.78)
	LPS	14.48 (11.99-15.46)	14.16 (10.96-17.87)	15.43 (7.79-19.97)
VO₂ (mL/min/kg)	Control	2.07 (1.86-2.44)	2.35 (1.45-2.37)	2.17 (1.59-3.24)
	LPS	1.88 (1.83-3.56)	2.23 (1.3-3.29)	2.25 (1.64-2.96)
O₂ER (%)	Control	19.87 (13.99-28.18)	18.11 (11.96-22.09)	17.14 (11.06-21.34)
	LPS	16.2 (11.32-23.89)	13.63 (8.94-24.46)	23.20 (11.75-34.99)

Se representan los valores de las medianas y el RIQ de las variables en T0, T1 y T2. FC: Frecuencia cardiaca, PAM: Presión arterial media, PVC: presión venosa central, RVP: Resistencia vascular periférica, GC-TD: Gasto cardiaco por termodilución, VS: Volumen sistólico, VGFD: Volumen global de final de diástole, VPP: Variabilidad de presión de pulso, VVS: Variabilidad de volumen sistólico, PC: Poder cardiaco, PMLS: Presión media de llenado sistémico, dP/dt max: Pendiente máxima del ascenso sistólico de la presión, O₂ER: Tasa de extracción de oxígeno.* p<0.05 T0 Control vs T0 Endotoxemia, † p<0.05 T1 Control vs T1 Endotoxemia, ‡ p<0.05 T2 Control vs T2 Endotoxemia. § p<0.05 T0 vs T1 (ambos grupos), ¥ p<0.05 T0 vs T2 (ambos grupos), £ p<0.05 T1 vs T2 (ambos grupos).

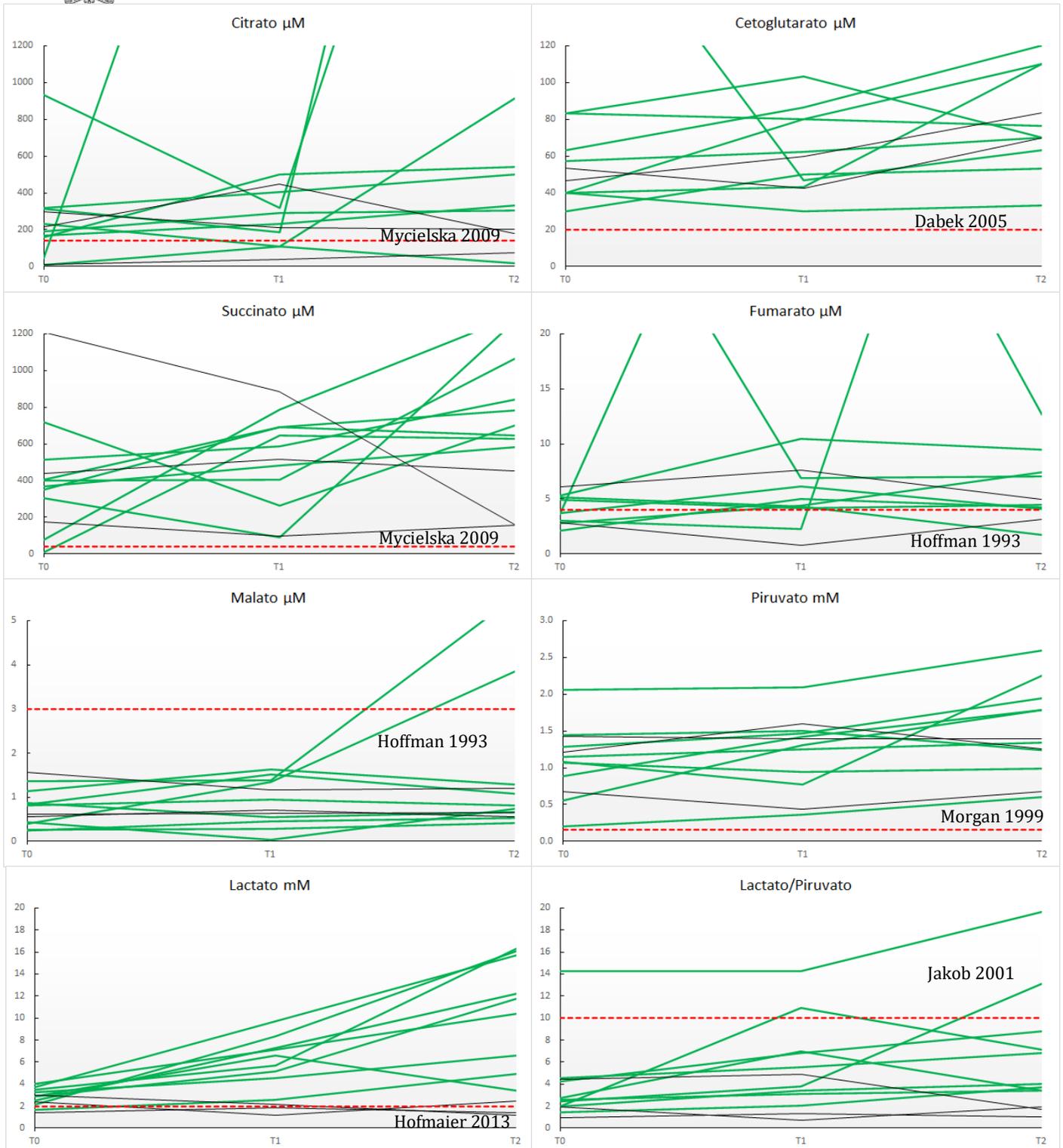


Figura 8. Representación individual de los metabolitos cuantificados por HPLC y la relación Lactato/Piruvato (L/P) en los grupos control y endotoxemia (líneas negras y verdes respectivamente). Las líneas rojas representan las concentraciones normales reportadas en la literatura.

Al evaluar los datos de las medianas, las concentraciones séricas de los intermediarios en el grupo control no presentaron variaciones significativas a excepción del lactato que disminuyó significativamente en el intervalo comprendido entre T1 y T2 (T1: 1.70, T2: 1.19) (**Tabla 10**). En el grupo de endotoxemia se presentaron diferencias significativas en comparación al grupo control en las concentraciones de lactato en T0 (2.88 mmol/L vs 1.36 mmol/L), T1 (6.57 mmol/L vs 1.7 mmol/L) y T2 (11.78 mmol/L vs 1.19 mmol/L). Igualmente, se encontró un ascenso significativo en las concentraciones de succinato en T2 en el grupo de endotoxemia en comparación al grupo control (783 μ mol/L vs 160 μ mol/L). En el grupo de endotoxemia los únicos metabolitos que presentaron variaciones significativas en el tiempo fueron el lactato (T0: 1.36 mmol/L - T1: 6.57 mmol/L - T2: 11.78 mmol/L), piruvato (T0: 1.08 mmol/L - T2: 1.79 mmol/L), succinato (T0: 370 μ mol/L - T1: 586.67 μ mol/L - T2: 783.33 μ mol/L) y citrato (T0: 190 μ mol/L - T2: 540 μ mol/L), los demás intermediarios no cambiaron sus concentraciones de manera significativa. Se destaca que durante la progresión de la endotoxemia el succinato es el metabolito del CAT predominante a nivel sérico (**Tabla 10 y Fig. 9**).

Tabla 10. Concentraciones de los metabolitos cuantificados por HPLC y la relación Lactato/Piruvato.

		T0 (Basal)	T1 (3H)	T2 (6H)
CITRATO μM	Control	215 (10-296.67)	213.33 (40-446.67)	180 (75-200)
	LPS	190 (156.67-313.33)	290 (186.67-403.33)	540 (333.33-4160) ¥
CETOGLUTARATO μM	Control	53.33 (46.67-213.33)	60 (42.5-236.67)	83.33 (70-266.67)
	LPS	57.5 (40-83.33)	62.5 (46.67-80)	70 (63.33-110)
SUCCINATO μM ‡	Control	440 (173.33-1210)	516.67 (95.67-883.33)	160 (156.67-453.33)
	LPS	370 (303.33-406.67)	586.67 (403.3-693.33)	783.33 (646.6-1063.3) £ ¥
FUMARATO μM	Control	6.07 (2.85-673.73)	7.6 (0.79-63.53)	4.93 (3.18 - 66.6)
	LPS	3.725 (3.04-5.13)	4.97 (4.3-6.89)	7.03 (4.21-9.45)
MALATO μM	Control	0.61 (0.55-1.56)	0.71 (0.63-1.16)	0.65 (0.56-1.2)
	LPS	0.81 (0.4-0.87)	0.95 (0.45-1.39)	0.82 (0.67-1.29)
LACTATO mM * † ‡	Control	1.36 (0.91-1.83)	1.7 (1.69-1.83)	1.19 (0.79-1.38) £
	LPS	2.88 (2.5-3.5)	6.57 (5.14-7.31) §	11.78 (6.56-15.73) £ ¥
PIRUVATO mM	Control	1.21 (0.68-1.43)	1.39 (0.44 - 1.59)	1.25 (0.68-1.39)
	LPS	1.08 (0.88-1.29)	1.31 (0.94-1.46)	1.79 (1.24-1.94) ¥
Lactato/Piruvato ‡	Control	0.95 (0.75-2.69)	1.31 (1.05-3.68)	0.98(0.64-1.16)
	LPS	2.55 (1.95-4.22)	5.56 (3.40-6.99) §	6.83(3.67-8.80) ¥

Se representan los valores de las medianas y el RIQ de las variables en T0, T1 y T2. * $p < 0.05$ T0 Control vs T0 Endotoxemia, † $p < 0.05$ T1 Control vs T1 Endotoxemia, ‡ $p < 0.05$ T2 Control vs T2 Endotoxemia. § $p < 0.05$ T0 vs T1 (ambos grupos), ¥ $p < 0.05$ T0 vs T2 (ambos grupos), £ $p < 0.05$ T1 vs T2 (ambos grupos).

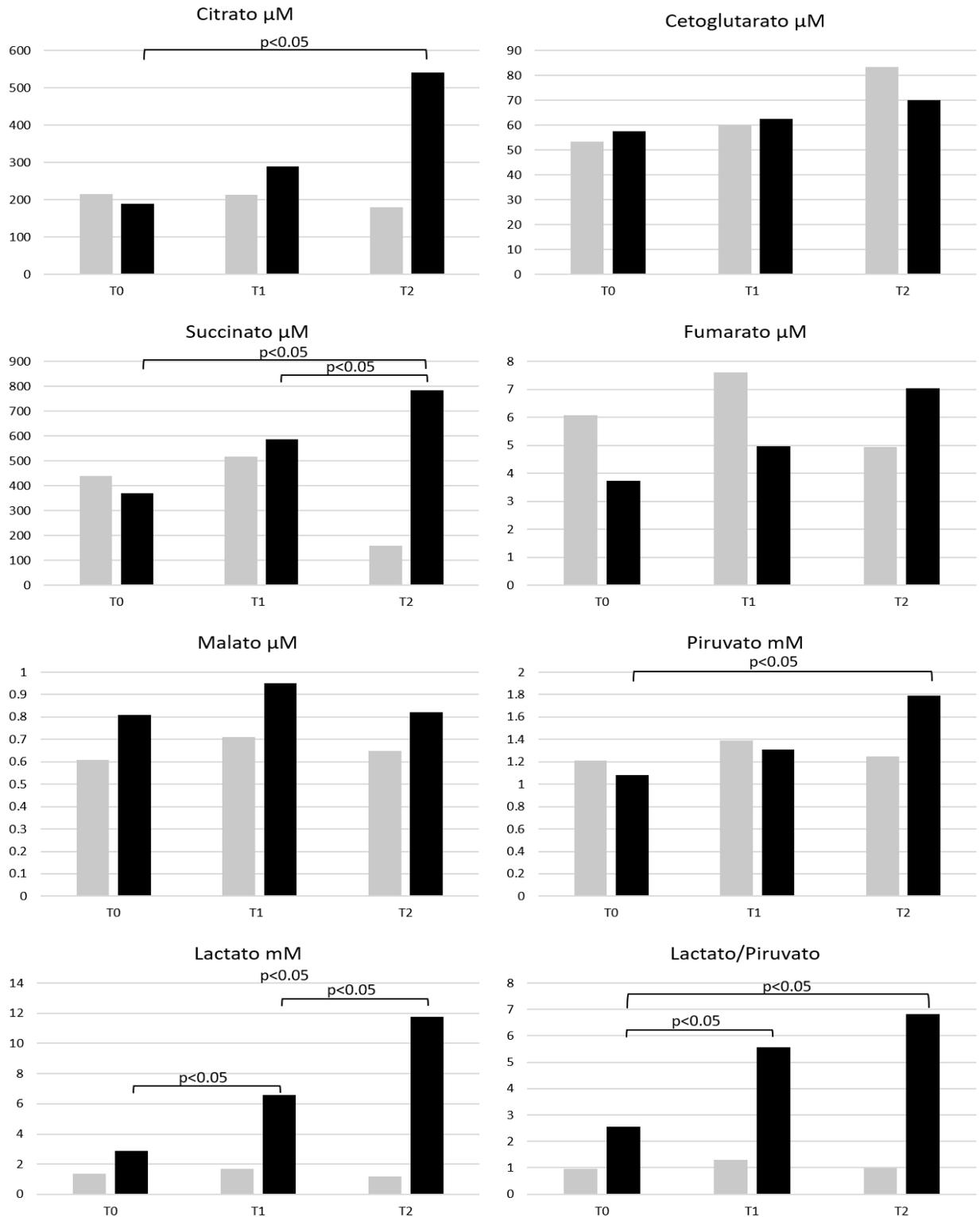


Figura 9. Mediana de las concentraciones de los metabolitos cuantificados y la relación L/P de los grupos control (barras grises) y endotoxemia (barras negras), en cada uno de los tiempos evaluados: T0; T6; T12.

La regresión lineal entre la totalidad de valores de Succinato y Lactato demuestra una correlación parcial: $R^2 = 0.347$ la cual es estadísticamente significativa ($p=0.003$). (**Fig. 10**).

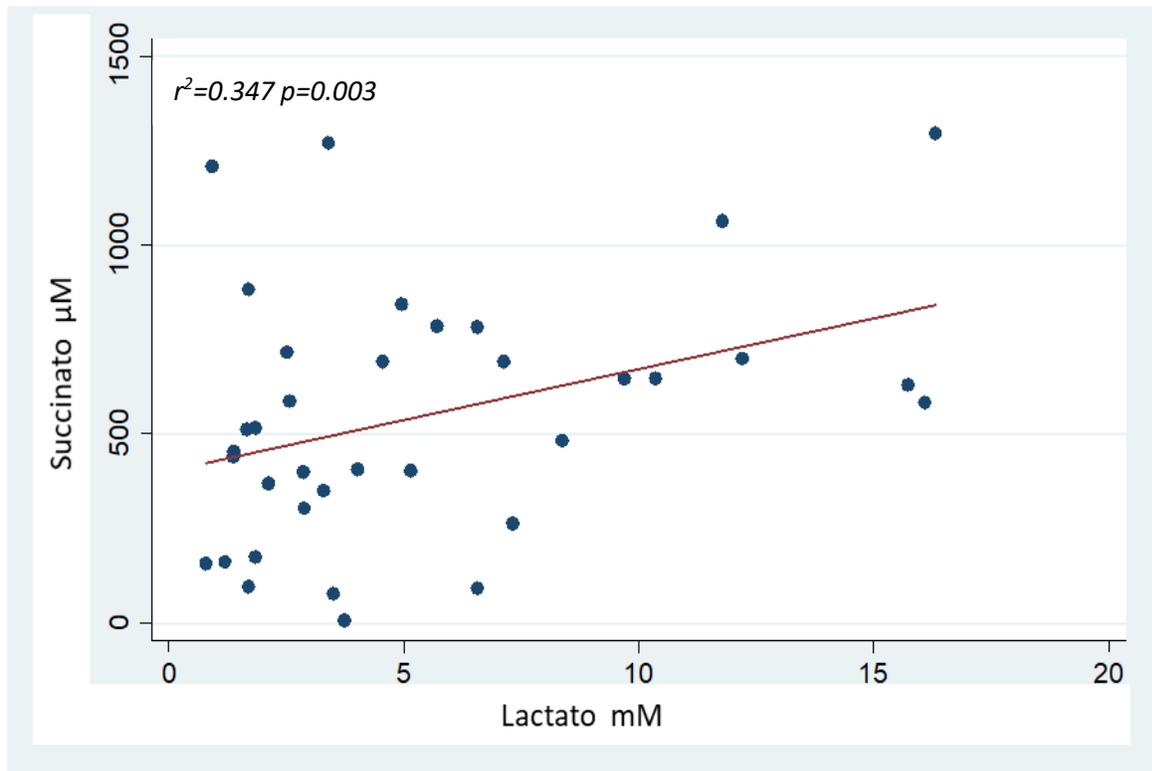


Figura 10. Correlación Lactato – Succinato. R^2 = Coeficiente de determinación.

DISCUSIÓN.

Nuestro estudio analiza los cambios hemodinámicos y metabólicos que tuvieron lugar en un modelo hiperdinámico de endotoxemia. Se destaca la instauración de hipotensión en el contexto de un descenso progresivo de las resistencias vasculares, sin embargo, el ascenso del Gasto Cardíaco no fue observado pese al suministro conjunto de líquidos y vasopresores. En cuanto al componente metabólico analizado en plasma se observó el ascenso de los intermediarios del CAT siendo estadísticamente significativo el incremento del Citrato y el Succinato. Procederemos a analizar dichos resultados en dos apartados.

Parte I. Análisis de los cambios hemodinámicos y de la relación aporte - consumo de Oxígeno durante el biomodelo de endotoxemia.

El biomodelo realizado en el presente estudio requirió en promedio 2.5 mg de endotoxina para descender la PAM por debajo de 50 mmHg (**Tabla 8**); tardando cerca de 3 horas en promedio, en alcanzar este punto. La respuesta hemodinámica que se observó entre T0 y T1 se encuentra caracterizada inicialmente por el descenso de las resistencias vasculares (RVP), y de la presión arterial media (PAM), el gasto cardiaco (GC) no presentó variaciones durante este periodo. Conforme progresó la endotoxemia (T1-T2) e inició el protocolo de resucitación se observó la recuperación de la RVP, pero no de la PAM y se hizo evidente la disminución del volumen sistólico (VS) manteniéndose estable el GC como producto de la elevación significativa de la frecuencia cardiaca. (**Tabla 9**). Por lo anterior, podemos inferir que nuestro modelo presentó principalmente un comportamiento hiperdinámico durante la fase inicial de la endotoxemia y posteriormente una recuperación del tono vascular como producto de la infusión de Noradrenalina. Este patrón hemodinámico caracterizado por una RVP disminuida y un GC elevado se ha observado de manera experimental cuando se instaura una reposición de volumen de manera concomitante a la progresión del choque, lo cual, evidencia la presencia de un grado variable de hipovolemia o vasodilatación que revierte con el suministro de líquidos ya que la contractilidad cardiaca en las fases tempranas del choque séptico se encuentra

preservada (191,192,193). Específicamente, en los biomodelos de endotoxemia la expresión de un fenotipo hiperdinámico se logra mediante la infusión de dosis bajas de endotoxina con lo que se impide la liberación de tromboxano A2 por parte de los macrófagos pulmonares evitando la vasoconstricción pulmonar y la disfunción ventricular derecha (194), con lo cual, se favorece la instauración de choque hiperdinámico cuando se realiza una adecuada resucitación con volumen (195,196).

En nuestro estudio fue posible observar el descenso significativo de la RVP 3 horas posterior al inicio de la infusión de endotoxina, y aunque no se cuantificó la resistencia vascular pulmonar, durante la experimentación se observó un incremento del GC estimado en aproximadamente 1.13 litros, si bien dicho ascenso no fue estadísticamente significativo consideramos que representa un patrón hiperdinámico como respuesta a la endotoxemia. Dicha respuesta en este contexto experimental se atribuye también al soporte hemodinámico, ya que como se ha reportado por otros autores el suministro de cristaloides y vasopresores evita la instauración de hipodinamia (197,198,199).

Durante nuestro biomodelo se observó el incremento paulatino de la VVS y la VPP y el descenso del GEDV, indicando que durante la progresión de la endotoxemia y el choque se presentaron fenómenos que se relacionan con una respuesta favorable a líquidos lo que sugiere que los biomodelos se encontraron en la porción ascendente de la curva de Frank-Starling. De acuerdo con los resultados obtenidos; el proceso de reanimación no conllevó a la normalización del GEDV, VPP, VVS, pero sí modificó el impacto de la endotoxemia sobre una variable relacionada con la contractilidad cardíaca ya que de manera paralela a la resucitación se observó el ascenso del dP/dt_{max} arterial en el grupo de endotoxemia (**Tabla 9**). Por tanto, el descenso del VS que se documenta al final del biomodelo probablemente fue secundario a una resucitación volumétrica subóptima, tal y como se ha demostrado en modelos animales similares al nuestro (200)

De manera llamativa, durante el desarrollo de choque por endotoxemia no fue posible revertir la hipotensión pese al suministro concomitante de noradrenalina siguiendo un protocolo de ascenso escalonado, se destaca el ascenso de la RVP en T2 respecto a T1, cuyo cambio fue significativo por lo que probablemente la hipotensión persistente fue

secundaria al descenso del VS que se observó en T2, este comportamiento de la PAM durante la infusión de noradrenalina ha sido documentado por otros autores durante la resucitación de pacientes con choque séptico y probablemente se encuentre relacionado con el incremento de la poscarga (76), en este sentido el ascenso de la PAM durante la infusión de noradrenalina en pacientes con choque séptico se observa predominantemente en aquellos pacientes que poseen un mayor inotropismo y pueden por tanto, tolerar el ascenso de la poscarga generado por esta catecolamina.

En nuestro biomodelo no se observaron cambios en el DO_2 conforme se instauró el choque por endotoxina (T0-T1) (**Tabla 9**), a nuestra consideración esto se debió a dos factores primordiales: En primer lugar, en nuestro biomodelo se ascendió de manera progresiva la dosis de endotoxina evitando así la instauración temprana de una fase hipodinámica en la cual se suele observar el descenso del gasto cardiaco y el ascenso de las resistencias vasculares periféricas (201, 193). En segundo lugar, el suministro de cristaloides durante nuestro biomodelo se ejecutó desde el comienzo de la infusión de endotoxina, con lo cual, se evitó un descenso marcado de la precarga y la instauración de la fase hipodinámica por hipovolemia relativa (197, 202, 203).

La interpretación de la estabilidad del DO_2 entre T1 y T2 (**Tabla 9**) es más compleja ya que pese al desarrollo de hipotensión y al descenso del volumen sistólico que se observó en esta fase no se documentó un descenso concomitante del DO_2 . A nuestra consideración en este intervalo de tiempo nuestro biomodelo se encontró sujeto a reanimación volumétrica y a suministro de noradrenalina por lo que con estas intervenciones se evitó la instauración de un colapso hemodinámico más severo (204), adicionalmente, teniendo en cuenta que el descenso del VS no resultó en un descenso del DO_2 , es evidente que la explicación más probable para esta preservación del DO_2 fue el desarrollo de taquicardia; si se observa con detenimiento es posible observar un descenso en el VS equivalente al 44% y un ascenso del 66% de la FC cuando se comparan sus valores entre T2 y T0. Los valores de FC que encontramos son superiores a los observados en otros estudios en la instancia previa a la instauración de resucitación

hemodinámica (18,180), probablemente este incremento de la FC se encontró mediado por múltiples factores; como la acción β_1 de la noradrenalina que fue suministrada durante el protocolo, igualmente la hipoglicemia desarrollada durante la endotoxemia contribuyó al incremento de la actividad simpática, y en adición a esto la hipotensión arterial persistente que se observó en nuestro biomodelo y la cual atribuimos a un estado de hipovolemia relativa, conllevó mediante la acción de los baroreceptores periféricos, al ascenso sustancial de la FC. Este ascenso de la FC es a su vez deletéreo para la hemodinamia ya que disminuye el tiempo de llenado diastólico favoreciendo el descenso del VS (205), lo cual puede conllevar a un estado de no respuesta a los vasopresores (76), sin embargo, nuestro estudio no buscó identificar la presencia o la explicación de este fenómeno y por tanto nuestra argumentación es principalmente especulativa.

En cuanto al comportamiento del VO_2 observamos una dinámica similar a la reportada en el DO_2 , esta evidencia puede ser interpretada como un fenómeno de dependencia entre el aporte y el consumo (206). Tal dependencia entre estas dos variables se ha descrito en biomodelos de endotoxemia (17), al igual que en pacientes sépticos (207), observándose en estos escenarios la transición a la dependencia con valores de DO_2 superiores a los reportados en condiciones basales, las probables explicaciones para este fenómeno de “dependencia patológica” se centran en alteraciones microcirculatorias que conllevan a un aumento de la heterogeneidad entre el DO_2 y el VO_2 , lo cual favorece la aparición de regiones con un insuficiente DO_2 para el VO_2 respectivo, a nivel sistémico esto se representa con la instauración de un fenómeno de dependencia entre VO_2 y DO_2 con tasas de extracción de oxígeno menores y con DO_2 críticos superiores a los basales (208). Las alteraciones microcirculatorias que sustentan este fenómeno se encuentran representadas por la disminución de la densidad de capilares perfundidos en algunos lechos microcirculatorios y el consecuente incremento de las distancias intercapilares (18,209).

Otras alteraciones que contribuyen a la “dependencia patológica” radican en el compromiso de la extracción de oxígeno a nivel celular, el cual es causado por la

respuesta inflamatoria mediada por citoquinas (210), el estrés oxidativo generado por la desregulación del ONS (211), las alteraciones en las vías de apoptosis y el desarrollo de disfunción mitocondrial.

Probablemente, tanto los mecanismos microvasculares como celulares se encuentran presentes durante la endotoxemia y son los responsables de la dependencia patológica en el DO_2 y el VO_2 , sin embargo, en nuestro biomodelo existen varias limitaciones metodológicas que nos impiden documentar de manera inequívoca la fase de dependencia entre el DO_2 y el VO_2 : En primer lugar, no se cuantificaron de manera diferencial el DO_2 y el VO_2 . En nuestro estudio calculamos el aporte y el consumo de oxígeno utilizando la ecuación derivada a partir del principio de Fick con lo cual se favorece la interdependencia matemática entre DO_2 y VO_2 ya que ambos comparten variables comunes para su cálculo (212, 213), por este motivo es posible que los cambios de GC generados por el proceso de resucitación hayan contribuido a variaciones similares, tanto en sentido como en magnitud, en ambas variables. En segundo lugar, los estudios que han identificado en sepsis la dependencia entre el DO_2 y el VO_2 han llevado a cabo la modificación del DO_2 mediante el desarrollo de hipovolemia en modelos animales (17), mediante el suministro de agentes vasoactivos (214) o por el incremento de la presión espiratoria al final de la espiración (PEEP) (207), en nuestro biomodelo no se llevaron a cabo intervenciones destinadas a incrementar o disminuir el DO_2 por lo que el cambio en el VO_2 no se puede atribuir de manera causal a las variaciones en el DO_2 . En tercer lugar, teniendo en cuenta que la instauración de dependencia se encuentra relacionada con la heterogeneidad microcirculatoria, nuestros métodos fueron insuficientes para documentar este fenómeno y por tanto no podemos descartar o confirmar que a nivel microcirculatorio durante nuestro biomodelo se hayan presentado alteraciones microcirculatorias capaces de incrementar la disparidad en la relación DO_2/VO_2 , no obstante, tal objetivo se encuentra por fuera del alcance de la actual investigación. Finalmente, la relación lactato/piruvato (L/P) (**Tabla 10**) observada en nuestro biomodelo no es sugestiva de anaerobiosis, este dato es de especial importancia ya que tradicionalmente se asume que la progresión hacía la zona de dependencia entre

el DO_2 y el VO_2 se asocia al desarrollo de anaerobiosis, por lo tanto, nuestros resultados indican que un estado de dependencia entre DO_2 y VO_2 en nuestro biomodelo a nivel sistémico es poco probable (15).

Parte II. Análisis de los cambios metabólicos durante el biomodelo de endotoxemia.

En nuestros resultados se destaca la instauración temprana de hipoglucemia y el incremento de los niveles de succinato y citrato en el grupo de endotoxemia. Los otros intermediarios del CAT: α -cetoglutarato, fumarato y malato incrementaron sus concentraciones, pero no presentaron variaciones estadísticamente significativas en comparación al grupo control. En relación a las concentraciones de lactato y piruvato encontramos el ascenso esperado de sus niveles en el grupo de endotoxemia, manteniendo una relación lactato/piruvato por debajo del umbral de anaerobiosis. Estos hallazgos evidencian un metabolismo activo, con predominio de las vías oxidativas que conllevan al funcionamiento del CAT, sin embargo, en comparación al funcionamiento basal del CAT que ocurre en condiciones normales, en nuestro biomodelo de endotoxemia se identificó al succinato como metabolito predominante a nivel sérico. A continuación, se procederá a discutir los posibles mecanismos que conllevaron a los cambios metabólicos reportados en nuestro biomodelo. En primera instancia se analizará cada intermediario por separado y posteriormente en conjunto.

Análisis individual de los metabolitos del CAT cuantificados durante la endotoxemia: Glucosa, succinato, citrato, α -cetoglutarato, fumarato y malato.

Glucosa: Durante nuestro biomodelo se observó el desarrollo de hipoglicemia desde T1, manteniéndose hasta el final de la experimentación. Esta alteración ha sido previamente documentada por otros autores en modelos de endotoxemia (215) y a través de su suministro en humanos sanos (216). En cuanto a los mecanismos que fundamentan su

instauración se destacan el incremento de la sensibilidad a la insulina y la inhibición de la gluconeogénesis, ambos eventos se encuentran mediados por la señalización proinflamatoria mediada por la endotoxina (217).

Actualmente se conoce que durante el choque se requiere el aumento de la captación intracelular de la glucosa para sostener el incremento de la vía glucolítica como principal mecanismo de adaptación metabólica (218), adicionalmente, células del sistema inmunológico como neutrófilos y macrófagos tienen preferencia por la vía glucolítica como fuente energética y en modelos de endotoxemia se ha calculado que dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS estimulan al sistema inmunológico de manera aguda y generan el consumo de 116 g de glucosa en un periodo de 480 minutos (219). En este sentido, el LPS se ha documentado como un factor que favorece la captación de glucosa, mediante el ascenso de la vida media de la insulina, el incremento de su señalización y también, mediante mecanismos independientes de insulina entre los que se destaca la señalización por IGF-1 y por TNF- α (216, 217, 220). Por otra parte, la inhibición de la gluconeogénesis se ha documentado con dosis altas de endotoxina (215), y actualmente se conoce que la señalización proinflamatoria mediada por IL-1, IL-6 y TNF- α conlleva a la inhibición de la gluconeogénesis en los hepatocitos de ratas expuestas a LPS (221).

La hipoglicemia que se reporta durante el choque por endotoxemia y la cual nosotros también reportamos, representa tan solo una parte de las alteraciones metabólicas que ocurren durante el choque por endotoxemia ya que posteriormente, y por lo general después de un periodo de 6 horas es posible observar la transición hacia un estado de insulinoresistencia e incremento de hormonas contrarreguladoras con lo que es posible observar entonces un comportamiento bifásico del metabolismo de la glucosa (222).

Finalmente, teniendo en cuenta el previo estado de ayuno de nuestro biomodelo los anteriores mecanismos hacen factible el desarrollo de hipoglicemia durante nuestra experimentación, las consecuencias hemodinámicas de esta hipoglicemia se encontraban por fuera del alcance de este estudio, pero es probable que su presencia haya contribuido a las alteraciones hemodinámicas y en especial a la taquicardia e hipotensión sostenidas.

Succinato: En nuestro experimento se destaca la presencia de valores más altos en T0 para ambos grupos (**Tabla 10**) en comparación con los valores en porcinos normales (**Fig. 8**), de acuerdo a nuestro criterio dicha elevación puede ser secundaria a la preparación del biomodelo ya que la sedación, intubación, anestesia general e inserción de catéteres por venodisección, son procedimientos que no están exentos de un grado variable de hipoxia e hipoperfusión (204), condiciones que en la literatura también se han asociado a la elevación de las concentraciones de succinato (223). No obstante, conforme transcurrió el biomodelo todos los animales del grupo control presentaron un descenso de las concentraciones de succinato (**ver Fig. 8**), el cual sin ser estadísticamente significativo refleja la estabilización hemodinámica conforme transcurrió el tiempo, tendencia contraria a la observada en el grupo de endotoxemia en donde prima la acumulación de Succinato de manera paralela a la instauración del choque hemodinámico, acumulación que resulta significativa en T2 (**Fig. 9**). Hallazgos similares se han reportado de manera consistente en otros modelos de choque hemorrágico en murinos, porcinos y primates no humanos (179). En particular, el incremento en las concentraciones de succinato que se ha identificado en porcinos durante condiciones de hemorragia es inferior al incremento que se observó en nuestro estudio; en este sentido, Reisz et al. reportan concentraciones post choque de un promedio de 77.8 μM , niveles que son 10 veces menores a los niveles succinato que se encontraron en nuestro estudio durante T2 (783.33 μM) lo cual sugiere que la elevación de succinato durante el choque por endotoxemia responde a factores independientes del DO_2 .

Evidencia reciente sugiere que la acumulación de succinato a nivel sérico se encuentra relacionada con fenómenos de reprogramación metabólica secundarios a la aparición de hipoxia celular (224, 225, 226), presentándose un descenso en la relación NADH/NAD^+ lo que conlleva a un funcionamiento reverso del CAT y a la acumulación de succinato (**Fig. 5**) (34, 227). Se plantea que en dichas condiciones la principal vía para la formación de Succinato es a partir del funcionamiento anterógrado de la primera parte del CAT (228), de tal forma que la re-oxidación del NADH en NAD^+ mediante el funcionamiento reverso de la enzima Malato Deshidrogenasa (MDH) es un factor fundamental para la

acumulación de este metabolito (27, 229). Otras rutas capaces de conllevar a la acumulación de Succinato en hipoxia también han sido documentadas (230) y dentro de estas se destaca el funcionamiento reverso de la Succinato Deshidrogenasa (SDH) con lo que se obtiene la reducción del Fumarato en Succinato en condiciones en las cuales el Fumarato actúa como receptor de los electrones de la Coenzima Q y opera en el funcionamiento reverso de la segunda parte del CAT (34) (**Fig. 5**). Nuestros resultados, como ya ha sido mencionado de manera previa, no son congruentes con la instauración de hipoxia a nivel sistémico, y aunque desconocemos si en nuestro biomodelo se presentaron condiciones de hipoxia o de hipoxia citopática a nivel tisular u orgánico, la posibilidad de hipoxia local sin evidencia de hipoxemia a nivel sistémico se ha corroborado por otros autores que han empleado biomodelos animales similares a los nuestro (103, 231, 232). Pese a lo anterior, nuestro diseño experimental no nos permite confirmar o descartar que la elevación de Succinato ocurra como producto de alteraciones en el DO_2/VO_2 a nivel tisular.

Dado que la generación de succinato no se puede atribuir únicamente a una reprogramación metabólica mediada por la hipoxia, el hecho de que en nuestro biomodelo se haya observado un incremento de sus concentraciones en ausencia de variaciones significativas en el DO_2 puede ser interpretado como el reflejo de un estado de hipermetabolismo. En torno a esta posibilidad, la hiperlactatemia acompañada de estabilidad de la relación Lactato/Piruvato que se observó en nuestro biomodelo es un hallazgo bioquímico que se ha relacionado con estados de hipermetabolismo a nivel tisular (233, 234, 235) y así mismo en condiciones de choque la señalización adrenérgica incrementa la oxidación del piruvato a nivel mitocondrial (236) por lo que nuestros resultados nos permiten plantear que durante la fase temprana de endotoxemia se observa un estado de hipermetabolismo en el que se favorece la acumulación de succinato.

Citrato: Los niveles de citrato que se presentaron en nuestros controles son cercanos a los reportados a nivel sérico en humanos (**Fig. 8**), no encontramos valores normales para

porcinos. En cuanto a las concentraciones observadas en el grupo de intervención se identificó un ascenso significativo conforme progresó la endotoxemia (**Fig. 9**), lo cual puede ser secundario a un descenso en su eliminación renal, proceso que en condiciones de ayuno se encuentra favorecido (237), sin embargo, dado que en el grupo control no se encontró un ascenso significativo de Citrato (**Fig. 9**) no consideramos que nuestros hallazgos correspondan al ayuno del biomodelo. En cuanto a la producción de citrato, este es un proceso que acontece a nivel de todas las células como producto de la actividad del CAT pero que es especialmente regulado por los procesos de resorción ósea (238, 239); dado que no se anticipa un cambio en el metabolismo óseo durante un período tan corto de experimentación podemos suponer que el incremento del citrato es secundario a su producción a nivel tisular por parte de la Citrato Sintasa del CAT, siendo lo anterior un indicio indirecto del incremento de la actividad catalítica a nivel mitocondrial durante nuestro biomodelo.

Los hallazgos en nuestro biomodelo pueden ser también un reflejo del efecto de la activación proinflamatoria del sistema inmune, ya que la acumulación conjunta de citrato y succinato es un fenómeno que se ha demostrado a nivel celular en macrófagos durante la señalización mediada por LPS (240, 241), en el caso del citrato se ha reportado su elevación como producto de la inhibición de la enzima Isocitrato Deshidrogenasa (IDH) que ocurre durante la señalización inflamatoria mediada por TLR-4 (242), lo que favorece la producción de ácido itacónico. Por su parte, la acumulación de succinato puede generarse como producto de la inhibición de la SDH secundaria al incremento de ácido itacónico (243). Por tanto, los resultados de nuestro biomodelo pueden estar en relación con la reprogramación metabólica que está ligada a la instauración y el sostenimiento de un fenotipo proinflamatorio (244).

α -Cetoglutarato: Los niveles de α -cetoglutarato en el grupo de control y endotoxemia fueron superiores a los valores séricos reportados en porcinos sanos (**Fig. 8**). En el grupo de endotoxemia nosotros encontramos una tendencia hacia el incremento de sus concentraciones sin alcanzar la significancia estadística (**Fig. 9**). El análisis del ascenso

del α -cetoglutarato desde una perspectiva fisiológica puede ser debido a la inhibición de las deshidrogenasas que ocurre en la sepsis ya que como se conoce desde hace décadas la enzima Piruvato Deshidrogenasa (PDH) se encuentra inhibida en condiciones de endotoxemia (245) y más recientemente se ha demostrado dicha inhibición en pacientes sépticos (148). Teniendo en cuenta que existe un alto grado de homología entre la enzima α -Cetoglutarato Deshidrogenasa (KGDH) y la PDH es factible suponer una disminución en su activación durante el transcurso de la sepsis. El anterior planteamiento se sustenta a partir de estudios en pacientes con acidosis metabólica internados en UCI (182) al igual que en pacientes sépticos (246); en lo que respecta a estas observaciones, Forni et al. reportaron concentraciones promedio de α -cetoglutarato de 547 μ M en pacientes con acidosis metabólica de anión gap elevado y de 79.17 μ M en el grupo de controles, el ascenso de los niveles de cetoglutarato que se reporta en este estudio es 10 veces superior a las concentraciones que nosotros evidenciamos en nuestro biomodelo. Por su parte Beloborodova et al. reportan la presencia de cetoglutarato en el 45 – 77 % de los individuos sépticos mientras que en el grupo control solo el 5 % de los individuos tuvieron concentraciones detectables de este metabolito. Las dos anteriores investigaciones han identificado el incremento de α -cetoglutarato en conjunto con el ascenso de las concentraciones de succinato y citrato lo cual implicaría que la disminución en el funcionamiento de las deshidrogenasas no inhibe totalmente el funcionamiento del CAT. En lo concerniente a nuestros resultados es posible que un biomodelo más prolongado de endotoxemia hubiese reportado variaciones significativas en las concentraciones de α -cetoglutarato ya que la tendencia de sus valores siempre indicó un ascenso en sus niveles.

Fumarato y malato: En el caso del fumarato se observaron niveles semejantes en el grupo control con los reportados en humanos sanos (**Fig. 8**). Con relación al malato encontramos en el grupo control niveles cerca de cincuenta veces inferiores a los reportados en humanos sanos, desconocemos si estos valores se encuentran por debajo de los límites de normalidad en cerdos ya que no conocemos estudios que hayan reportado niveles de malato en plasma en esta especie. No obstante, se destaca que en

la población de controles se presentó una tendencia al descenso del fumarato y malato mientras que en el grupo de endotoxemia se evidenció la tendencia contraria en lo concerniente a los valores de fumarato (**Fig. 8**), aunque dichos cambios no alcanzan la significancia estadística, conforme progresa el tiempo suponemos que existe un comportamiento metabólico diferente durante la endotoxemia en el que prima la acumulación de estos intermediarios. Dicha tendencia también fue reportada por Beloborodova et al en pacientes sépticos (246), en dicho estudio los pacientes con mayor SOFA presentaron los niveles de fumarato y succinato más elevados.

Análisis individual de los metabolitos cuantificados durante la endotoxemia: El Lactato y Piruvato.

El lactato se ha considerado como un marcador pronóstico en el paciente séptico (80), y en años recientes se han empleado estrategias de reanimación orientadas por el descenso de sus concentraciones (247, 248, 249), sin embargo, la interpretación de sus niveles en sepsis se ha convertido en un desafío clínico y fisiológico (250), debido a que, aunque sus valores séricos se han relacionado tradicionalmente con la perfusión tisular (251, 252, 253, 254), también son afectados por el funcionamiento hepático (255, 256), renal (257), el estímulo del metabolismo glucolítico (258), y la acción de catecolaminas exógenas (259). Una manera de relacionar los niveles de lactato con condiciones de hipoxia es a partir de la relación lactato - piruvato (L/P) (44, 251, 260), relación que representa el cociente entre las concentraciones del producto y el reactivo de la reacción catalizada por la Lactato Deshidrogenasa (LDH); deshidrogenasa citoplasmática que opera principalmente reduciendo el piruvato a lactato y que regenera el NAD^+ a partir de la oxidación del NADH , por tanto, la relación L/P refleja el estado oxido-reductor (NADH/NAD^+) a nivel citoplasmático. Previamente se ha planteado que en condiciones de un DO_2 normal el ascenso de las concentraciones de lactato es proporcional al incremento del piruvato, en tales circunstancias las concentraciones de lactato se elevan como producto del metabolismo glucolítico y por fuentes no hipóxicas manteniendo relaciones L/P cercanas a los límites de la normalidad (<10) (15,190,260); por otra parte,

en condiciones de anaerobiosis el equilibrio fisiológico del lactato y piruvato se altera predominando la acumulación del lactato independientemente de los valores de piruvato, reflejando el descenso del metabolismo oxidativo y la acumulación de NADH, por lo que la relación L/P se eleva (15, 260, 261). En la literatura se identifican múltiples puntos de corte para definir hipoxia de acuerdo a la relación L/P sérica (15, 44, 260, 261, 262) lo cual indica que esta variable hasta el momento carece de estandarización como indicador de anaerobiosis. En cuanto a nuestra especie de experimentación modelos de hemorragia reportan una relación L/P de 40 posterior a 90 minutos de hemorragia (188), y en el caso de endotoxemia valores inferiores a 10 se han observado en ausencia de compromiso en la función mitocondrial (263), por tanto, durante nuestra discusión este será el límite empleado para definir el umbral de anaerobiosis, no obstante, es preciso aclarar que esta relación es dinámica, no depende únicamente del grado de anaerobiosis (260) y no está exenta de una interpretación individualizada.

De manera predecible en nuestro estudio se observó el ascenso significativo de los valores de lactato durante la progresión de la endotoxemia, así como la estabilidad de sus niveles en el grupo control (**Tabla 10**). En T2 se encontró un ascenso de 5 – 7 veces los niveles basales de Lactato en conjunto con un incremento en los valores de piruvato, esto puede ser explicado por el incremento en el funcionamiento de la glicolisis y la oxidación de aminoácidos gluconeogénicos, igualmente, la relación L/P presentó un ascenso significativo observándose un incremento de 2 a 3 veces sus valores basales, sin embargo, en 7 de 9 biomodelos el cociente L/P permaneció por debajo del umbral de anaerobiosis conforme progresaron las alteraciones hemodinámicas propias de la endotoxemia (**Fig. 8 y 9**). En consonancia con nuestros hallazgos se puede inferir que la elevación de lactato correspondió en la mayoría de biomodelos a un incremento en la concentración de piruvato y no a la instauración de hipoxia a nivel celular, observación que es consistente con los hallazgos de Brandt et al. quienes reportaron una relación L/P inferior a 10 a nivel de la vena hepática en biomodelos porcinos de endotoxemia sujetos a resucitación hemodinámica, en esta investigación se midió el funcionamiento mitocondrial a partir de la actividad de los complejos I y II de la fosforilación oxidativa y

se encontró ausencia de alteración en su funcionamiento pese al desarrollo de hiperlactatemia durante el transcurso de la endotoxemia (263).

Por último, el hecho de que los valores de L/P sean inferiores a los reportados en otros modelos de choque plantea como cuestionamiento razonable el desarrollo de un verdadero estado de choque en nuestra experimentación. En lo que a esto respecta consideramos que, en primer lugar, hasta el momento ningún valor de L/P se ha asociado de manera inequívoca con la instauración de anaerobiosis, por lo que en la literatura se utilizan múltiples puntos de corte sin un consenso al respecto (15, 44, 260, 261, 262). En segundo lugar, hemodinamicamente los parámetros macrocirculatorios de nuestro biomodelo representan un estado de choque por endotoxemia, y en cuanto a los resultados relacionados con el metabolismo, observamos que la relación L/P descarta que la hiperlactatemia sea derivada de hipoxemia, observación que también se ha realizado por otros autores durante modelos experimentales de sepsis (15) por lo que este hallazgo no controvierte la instauración del choque, sino el origen de la hiperlactatemia.

Correlación lactato – succinato.

Uno de nuestros planteamientos iniciales se centró en la elevación del succinato durante la endotoxemia como indicador de hipoxia tisular, y en este sentido, una alta correlación con el lactato representaría su viabilidad como indicador de hipoperfusión (179). Sin embargo, no fue posible observar un deterioro del aporte o el consumo de oxígeno y considerando el comportamiento de la relación L/P durante nuestro biomodelo no podemos afirmar la presencia de alteraciones macrohemodinámicas y metabólicas asociadas a la hipoperfusión. Teniendo en cuenta lo anterior, la elevación del succinato evidenciada en nuestra experimentación correspondería principalmente a causas no hipóxicas, entre las que se destaca la reprogramación metabólica del CAT ya previamente discutida y la inhibición del funcionamiento de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) por las siguientes causas:

- Producción bacteriana de ácidos fenólicos: Los ácidos fenólicos son compuestos aromáticos que se han reportado elevados en los pacientes con choque séptico (264), su origen proviene de patógenos bacterianos como *Pseudomona* spp, *Acinetobacter* spp y *Serratia* spp, sin embargo, especies pertenecientes a la flora bacteriana como *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp pueden contribuir a su producción en estados de translocación bacteriana (36). Estos metabolitos se han asociado a alteraciones en el estado oxido-reductor mitocondrial favoreciendo la producción de ROS, y más recientemente se ha reportado como algunos de estos metabolitos como el ácido benzoico y el ácido fenilacético inhiben las deshidrogenasas mitocondriales, dentro de estas enzimas se encuentra la SDH enzima del CAT encargada de oxidar el succinato y generar fumarato (246, 265). Por tanto, un porcentaje de la elevación de los niveles de succinato durante la sepsis puede ser explicada por la producción bacteriana de ácidos fenólicos.

- La generación de ácido itacónico. El ácido itacónico se produce por la acción de la enzima aconitato decarboxilasa 1 (Acod-1) esta enzima cataliza la descarboxilación del cis-aconitato, el cual, es un producto metabólico del CAT en la serie de reacciones que isomerizan el citrato en isocitrato (242,243). La acumulación del ácido itacónico se ha observado en los macrófagos estimulados con LPS y se ha identificado como su producción se asocia a la inhibición de la SDH conllevando al incremento de succinato y ejerciendo control sobre los procesos de transporte de electrones y producción de ROS (243,266).

Dado que nuestro biomodelo se llevo a cabo mediante el suministro de endotoxina, es poco probable que se haya presentado bacteriemia durante su desarrollo, por lo tanto, la producción de ácidos fenólicos no contribuyo al ascenso en las concentraciones de succinato. En cuanto a la producción de ácido itacónico se conoce que este fenómeno ocurre principalmente a nivel tisular en un foco infeccioso (267) condición que en nuestra experimentación no se encontró presente, por lo que suponemos que la principal causa

para la elevación del succinato en nuestra experimentación fue el desarrollo de un fenómeno de reprogramación metabólica no mediado por hipoxia. (226). En este sentido, la correlación parcial que se observa entre el lactato y succinato (**Fig.10**) es esperable ya que las causas que conllevan al incremento sérico del lactato son múltiples, en cambio, la elevación del succinato representa a nuestro criterio la reprogramación del metabolismo durante las fases tempranas de la endotoxemia.

Nuestros resultados son concordantes con lo evidenciado por otros autores. Reisz et al. en un biomodelo porcino de choque hemorrágico reportaron un r^2 para las concentraciones de lactato - succinato de 0.513, valor que es superior al obtenido en nuestra experimentación ($r^2 = 0.347$) (179). Hay que tener en cuenta que el biomodelo de estos investigadores empleó la generación de choque por hemorragia permitiendo la manipulación del DO_2 de una forma directa, lo cual favorece la instauración de hipoperfusión tisular, lo que se posibilita el desarrollo de fenómenos de reprogramación metabólica mediados por hipoxia y un mayor ascenso en las concentraciones lactato, haciendo más probable en estas circunstancias la correlación entre el lactato y succinato ya que el mecanismo que conlleva a choque está directamente ligado con la noxa generada por la hipovolemia, lo anterior se diferencia ampliamente de nuestro biomodelo en el que en primer lugar el compromiso del DO_2 no fue posible de documentarse y en segundo lugar las alteraciones hemodinámicas que conllevaron al desarrollo de choque fueron multifactoriales y no estuvieron directamente controladas durante la experimentación.

Análisis integral de los metabolitos cuantificados durante la endotoxemia.

Previamente se han descrito los fundamentos con los que se plantea la reprogramación del CAT durante la endotoxemia; en congruencia con esta posibilidad, nuestros resultados evidencian la acumulación de lactato en condiciones de un DO_2 estable y sin un aumento considerable en la relación L/P evidenciando un incremento del metabolismo oxidativo; el cual, ocurrió de manera paralela al incremento de los intermediarios del CAT,

dicho incremento se encontró caracterizado por el predominio del succinato respecto a los demás intermediarios, de acuerdo a nuestro criterio esto puede representar la instauración de un fenómeno de reprogramación metabólica no mediado por hipoxia tisular. Sin embargo, para establecer esta relación se hace necesario contrastar la sumatoria de nuestros resultados con las investigaciones que han cuantificado diferentes intermediarios del CAT en modelos experimentales de sepsis o durante la progresión de esta patología en pacientes sépticos.

Modelos experimentales:

Liu et al. en 1985 fueron los primeros en reportar los cambios que ocurren durante la endotoxemia en las concentraciones de los intermediarios del CAT (268); en su estudio emplearon un biomodelo canino al cual se le suministraron dosis letales de endotoxina para posteriormente llevar a cabo la cuantificación de los intermediarios a nivel hepático. En esta investigación se observó el ascenso de oxalacetato junto con la disminución de cetoglutarato y malato 2 horas posterior a la infusión de endotoxina, dentro de otros resultados relevantes se reportó el descenso significativo en la concentración de glucosa, en los niveles de ATP y el ascenso significativo de la relación L/P evidenciando la aparición de hipoxia tisular. En conjunto los resultados obtenidos por Liu et al. fueron interpretados como evidencia del predominio del metabolismo reductor a nivel celular. En estas condiciones también se documentó el ascenso de oxalacetato y la disminución del fosfoenolpiruvato como producto de la inhibición de las rutas gluconeogénicas que aconteció durante la endotoxemia; fenómeno que se puede observar en fases avanzadas de la sepsis y que por lo general se asocia a un compromiso severo (11, 269, 270); por tanto los resultados de Liu et al. son el producto de un modelo más severo de endotoxemia el cual emplea dosis letales de endotoxina y por ende permite el desarrollo de alteraciones en la obtención de energía a nivel celular. Las principales divergencias metodológicas entre los análisis de Liu et al. con nuestros resultados radican en que nuestros análisis se ejecutaron a nivel sérico y no a nivel tisular, además, en nuestro estudio la cuantificación de oxalacetato no se realizó debido a que su vida media en una muestra de suero es cercana a los 70 segundos (183) lo cual superaba el tiempo que

disponíamos para la preparación y el almacenamiento de las muestras, y por último, nuestro modelo no empleo dosis letales de endotoxina sino subletales, por lo que se desarrolló un modelo menos severo y en el cual se observó el predominio del metabolismo oxidativo acompañado del incremento del citrato y succinato, sin observarse el descenso de ningún intermediario del CAT.

Más recientemente, Whelan et al. reportaron en un modelo murino de sepsis el ascenso a nivel hepático de múltiples intermediarios del CAT en conjunto con el descenso en la actividad del complejo II de la cadena transportadora de electrones (CTE) lo que sugiere la persistencia del funcionamiento del CAT en condiciones en las cuales la fosforilación oxidativa presenta una disminución en su funcionamiento (24). En el modelo empleado por estos autores los cambios en la actividad del complejo II de la CTE se documentaron a las 8 horas de inducción de sepsis mediante punción y ligación cecal (PLC) por lo que probablemente este deterioro en la actividad mitocondrial ocurrió como producto de la señalización de mediadores inmunológicos y no necesariamente por un compromiso del DO_2 ya que modelos de punción y ligación cecal similares no han reportado la instauración de una fase hipodinámica en este tiempo (271, 272, 273). Si bien el biomodelo que nosotros empleamos diverge del empleado por Whelan et al. en materia de la especie utilizada y el mecanismo de inducción de sepsis, es factible que el estado de hipermetabolismo que fue evidenciado en nuestro biomodelo se encuentre relacionado con los fenómenos de reprogramación metabólica que han sido documentados por estos autores a nivel tisular. Sin embargo, diferencias significativas de nuestro trabajo nos impiden plantear de manera absoluta tal relación ya que nuestro biomodelo no analizó muestras tisulares y además nuestra metodología para el análisis de intermediarios del CAT únicamente incluyó la realización de cromatografía líquida (CL) y la espectrometría de masas (EM) no se llevó a cabo.

Las observaciones anteriormente descritas contrastan con lo reportado en otros tipos de biomodelos que analizaron tejidos diferentes al hepático. Hotchkiss et al. llevaron a cabo un biomodelo de sepsis murino inducido por PLC en el cual la cuantificación de

intermediarios metabólicos se realizó en tejido cardiaco y mediante espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN) (274). Los hallazgos de este estudio describen la estabilidad en las concentraciones de citrato, cetoglutarato y malato a las 42 horas de haberse llevado a cabo la PLC, reportando posterior a este intervalo de tiempo la estabilidad concomitante en los niveles tisulares de ATP y fosfocreatina lo que descarta la presencia de disfunción mitocondrial durante estas condiciones experimentales. De manera similar a nuestros resultados Hotchkiss et al. reportan la estabilidad en los valores de la relación sérica de L/P pese a la instauración de hiperlactatemia, llamativamente en su modelo experimental los niveles de lactato y piruvato a nivel cardiaco no presentaron variaciones significativas por lo que podemos inferir que el ascenso en las concentraciones de lactato y piruvato que fue observado a nivel sérico correspondió a la instauración de hipermetabolismo en tejidos que no fueron analizados en dicho estudio. Recientemente Lado et al. analizaron también tejido cardiaco mediante espectroscopia por RMN en un modelo porcino de endotoxemia, tomaron las muestras de tejido al cabo de 72 horas de infusión de LPS y reportaron la estabilidad de los intermediarios del CAT y a su vez el incremento de lactato a nivel miocárdico, incremento que se atribuyó al descenso del metabolismo oxidativo de la glucosa (275). Probablemente los hallazgos de Lado et al. contrastan con los datos de Hotchkiss et al. en materia del tiempo en el cual se registraron las mediciones metabólicas a nivel tisular.

En el tejido renal también se han llevado a cabo mediciones de los intervalos del CAT; Waltz et al. observaron una disminución en los niveles de fumarato y malato en murinos posterior a las 8 horas de la inducción de sepsis mediante punción y ligación cecal (25), lo cual contrasta con las observaciones previas a nivel tisular ya que hasta donde tenemos conocimiento esta es la única cuantificación tisular en la que se reporta un descenso de los intermediarios del CAT en un modelo de sepsis. Esta observación; a nuestro criterio, también sugiere un fenómeno de reprogramación metabólica mediado por factores inmunológicos ya que su instauración temprana durante la experimentación no corresponde a la progresión usual de las alteraciones en el DO_2 que acontecen durante un modelo de PLC (271, 272, 273). El descenso en las vías metabólicas del CAT

que se reporta a nivel renal es indicativo de una alteración en la actividad mitocondrial en este tejido, lo cual, probablemente esté relacionado con la instauración de un metabolismo hibernante en un órgano que en condiciones basales presenta altos requerimientos energéticos (43,101).

A partir de los anteriores análisis podemos plantear que a nivel tisular la actividad del CAT durante la sepsis es órgano específica y posiblemente tiempo dependiente, por lo que su actividad puede encontrarse inhibida o incrementada dependiendo el tejido y el momento en el cual esta se analice. Aunque nuestros resultados son sugestivos de un incremento en la actividad del CAT durante un estado de hipermetabolismo no es posible concluir la contribución particular de cada órgano.

Estudios clínicos:

Los estudios clínicos que han analizado las concentraciones de los intermediarios del CAT han empleado en su mayoría herramientas provenientes de la metabolómica. Estas herramientas permiten la identificación de múltiples metabolitos de una manera no dirigida que permite la cuantificación de múltiples intermediarios relacionados.

Un estudio de gran importancia en este campo fue realizado por el grupo de Langley et al., en dicho estudio se identificó el perfil metabolómico de pacientes con diagnóstico de sepsis (9). Los análisis metabolómicos fueron realizados mediante cromatografía líquida (CL) o cromatografía de gases (CG), ambas técnicas se acoplaron a EM y se realizaron a muestras de suero obtenidas al ingreso a urgencias y 24 horas después. Uno de los principales hallazgos de este estudio radicó en la cuantificación de mayores concentraciones de intermediarios de la vía glucolítica y del CAT en los individuos no supervivientes. Específicamente se reportó la elevación de citrato y malato en este grupo de pacientes, observación que ha sido corroborada por otros autores que han empleado metodologías similares en pacientes sépticos, tal es el caso del estudio de Liu et al. (276) quienes identificaron el ascenso de Citrato, α -cetoglutarato, succinato y malato en individuos no supervivientes. En este último estudio se analizaron pacientes con

diagnóstico de choque séptico y la mortalidad del grupo de pacientes analizado fue cercana al 60%, lo que puede explicar la presencia de un mayor compromiso del CAT en estos pacientes.

Recientemente, el grupo de investigación de Beloborodova et al. han analizado de manera dirigida y mediante CG-EM las concentraciones de los intermediarios del CAT en pacientes sépticos con diferentes grados de severidad, como resultado principal dicho estudio evidencia el ascenso de succinato, α -cetoglutarato y fumarato y además establece una correlación entre el ascenso de los niveles de succinato y la progresión de la disfunción multiorgánica secundaria a la sepsis (246). A partir de estos hallazgos, se ha interpretado que en individuos no supervivientes existe una actividad anaplerótica que permite la generación de intermediarios del CAT, sin embargo, estos pacientes presentan alteraciones a nivel del metabolismo oxidativo que impiden la utilización efectiva de estos intermediarios para la obtención de energía.

Datos del estudio de Cambiaghi et al. aportan una perspectiva dinámica al análisis de los intermediarios metabólicos en el choque séptico. Dichos autores analizaron el metaboloma en individuos con choque séptico y compararon los perfiles metabólicos de los individuos respondedores de acuerdo al descenso del puntaje de SOFA ($\Delta \geq 5$) 48 horas después del ingreso a UCI, en comparación a aquellos individuos catalogados como no respondedores ($\Delta < 5$) a las 48 horas. En este estudio el único intermediario del CAT que se reportó elevado fue el citrato, y llamativamente sus concentraciones únicamente descendieron de manera significativa en los individuos respondedores (23).

Las anteriores observaciones se relacionan con lo encontrado en las investigaciones de la década de los 80 de Cerra y Siegel (170, 171, 277), quienes plantearon de manera

reveladora para la época la presencia de un catabolismo sostenido en los individuos no supervivientes a la sepsis, este patrón hipercatabólico exhibía como característica la elevación persistente de aminoácidos ramificados (170,171). La hipótesis de este comportamiento metabólico se centraba en una capacidad preservada de los supervivientes para incorporar sustratos del metabolismo intermediario en el CAT, lo cual se encontraba limitado para los pacientes no supervivientes, dando lugar a la elevación plasmática de sus intermediarios.

En contraposición con el previo planteamiento metabólico, Fedotcheva et al. reportaron niveles disminuidos de succinato, α -cetoglutarato, malato y fumarato en pacientes con disfunción multiorgánica, y plantearon que en esta etapa de la sepsis el descenso de los intermediarios del CAT se puede explicar por la presencia de un metabolismo quiescente (36), hallazgo que es consistente con lo reportado en diferentes especies de mamíferos hibernantes en las cuales el descenso de los intermediarios del CAT a nivel plasmático representa un metabolismo persistentemente deprimido lo que permite conservar las reservas energéticas celulares (278, 279, 280). Los resultados de Fedotcheva et al. fueron interpretados dentro de un fenómeno de reprogramación metabólica probablemente más tardío y más severo.

El análisis de las investigaciones recopiladas previamente en conjunto con nuestros resultados nos permite plantear una hipótesis frente al comportamiento de los intermediarios del CAT, una hipótesis en la que se incluyen los cambios temporales en el funcionamiento del CAT (**Fig. 11**); y en la cual, en una fase inicial prima la elevación sérica de los intermediarios debido al predominio de una respuesta hipermetabólica a nivel tisular que incorpora múltiples sustratos del metabolismo intermediario hacia la obtención de energía, en estas condiciones suponemos que el CAT opera de manera no canónica y genera la acumulación de succinato y citrato como productos de la respuesta humoral e inmunitaria que ocurre durante la sepsis. En una fase posterior; dependiendo de la respuesta del huésped y del tratamiento instaurado se puede presentar el sostenimiento de esta fase hipercatabólica indicando la persistencia de la señalización

proinflamatoria y de las alteraciones en el metabolismo celular; como se ha descrito previamente, los individuos no supervivientes cursan con la elevación sérica de los intermediarios del CAT, mientras que en pacientes supervivientes se ha observado la tendencia contraria. Finalmente, en aquellos individuos en quienes persiste la respuesta hipercatabólica el descenso posterior de los intermediarios del CAT se encontraría relacionado con el desarrollo de un metabolismo hibernante en el que se preserva la supervivencia celular a costa de la función tisular, esta respuesta ha sido considerada como “adaptativa” y según algunos autores es la causa primaria del desarrollo de la disfunción multiorgánica en la sepsis (43,50,61).

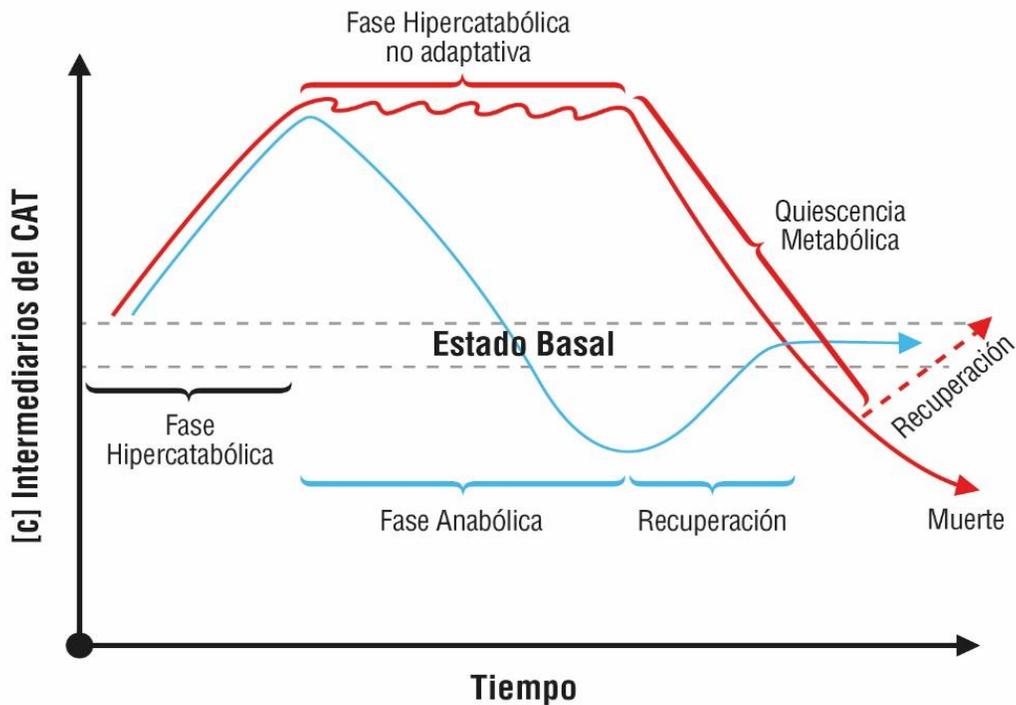


Figura 11. Representación hipotética del cambio de la concentración de los intermediarios del CAT a nivel sanguíneo conforme a la temporalidad de la noxa séptica.

LIMITACIONES.

Nuestro estudio posee varias limitaciones:

- 1- La cuantificación de los intermediarios del CAT a partir de la metodología de HPLC permite una cuantificación aproximada en comparación a otros métodos con mayor capacidad de discriminación y sensibilidad. En nuestro caso, de manera previa realizamos una identificación cualitativa de los intermediarios mediante una serie de titulaciones de muestras patrón de cada uno de los metabolitos, lo cual nos permitió conocer el tiempo de retención de cada uno y la variación de su absorbancia a diferentes concentraciones, con lo cual, posteriormente identificamos las concentraciones presentes en las muestras de nuestros biomodelos (184). Sin embargo, metodologías como la EM permiten identificar intermediarios del metabolismo con mayor sensibilidad y de manera más precisa ya que esta herramienta emplea un análisis de la carga y la masa de las moléculas a identificar con lo que es posible lograr, sin la necesidad de un proceso de calibración previo, un mejor grado de discriminación entre múltiples metabolitos (281,282).
- 2- Otro punto importante en torno a la cuantificación de los intermediarios del CAT radica en la complejidad metodológica para su análisis, ya que es conocido que sus concentraciones son dependientes del tiempo entre su extracción y su análisis (182). Nosotros realizamos un proceso de centrifugación semi-refrigerada en el lugar de obtención de las muestras, posteriormente un almacenamiento a -80 grados Celsius, y finalmente los análisis por HPLC ocurrían en menos de 24 horas, aunque este procedimiento ha sido llevado a cabo de manera similar por otros autores (183), no está exento de que existan variaciones preanalíticas generadas por la centrifugación semi-refrigerada y por los lapsos de tiempo que se presentaron entre la extracción de las muestras, su almacenamiento y su análisis.

- 3- Nuestro biomodelo no incluyó el análisis tisular de los intermediarios del CAT. Por lo tanto, los resultados de nuestro estudio identifican únicamente el resultado de la medición en sangre y no la contribución particular de cada tejido. Este punto es una limitación importante de nuestra investigación ya que como se ha mencionado previamente la actividad del CAT en la sepsis es órgano-específica y ha sido detallada por otros autores (24,25,268,274,275). Si bien nuestros resultados indican la tendencia global del metabolismo, nos impiden establecer el origen de las altas concentraciones de intermediarios del CAT que fueron encontradas a nivel sérico. Por tanto, nuestra hipótesis respecto al funcionamiento del CAT durante la sepsis debe corroborarse mediante estudios enfocados en el componente tisular.

- 4- Otra de las limitaciones de nuestro biomodelo radica en el análisis de los intermediarios del CAT y del comportamiento hemodinámico en un periodo de tiempo aproximado de tres horas posterior al desarrollo de choque por endotoxina, por este motivo las alteraciones observadas no pueden ser extrapoladas a la instauración del compromiso orgánico que se presenta durante la sepsis, el cual está enmarcado en una serie de alteraciones que tienen a lugar de manera paulatina y se desarrollan a partir de un compromiso inicialmente local.

- 5- Una limitación propia de los biomodelos de sepsis por endotoxina radica en el empleo de un fuerte inductor de la respuesta inmunitaria innata como lo es el LPS (193), por lo tanto, no abarcan la complejidad total de la respuesta inmunológica que ocurre durante la infección microbiana que acontece en la sepsis, además de esto, la infección bacteriana genera la interacción del huésped con diversos productos metabólicos de origen bacteriano, los cuales, también contribuyen al desarrollo de las alteraciones hemodinámicas y metabólicas que se observan en la sepsis (283). Teniendo en cuenta esta limitación intrínseca de nuestro

biomodelo, no es posible la extrapolación total de sus resultados al contexto clínico.

- 6- En nuestra experimentación se observaron alteraciones metabólicas que pueden correlacionarse con la respuesta inflamatoria propia de la endotoxemia, sin embargo, su relación con el compromiso hemodinámico o el soporte vasopresor suministrado es igualmente probable, ya que es posible que alteraciones hemodinámicas más severas deriven en mayor compromiso metabólico si estas consiguen generar la instauración de anaerobiosis tisular, e igualmente, es factible que el suministro de catecolaminas como la noradrenalina haya contribuido en algún grado al desarrollo de hiperlactatemia. El hecho de que no se realizó un grupo en el cual las alteraciones hemodinámicas fuesen mayores o el cual no estuviese sujeto a suministro de catecolaminas, nos impiden evaluar la relación que existe entre el deterioro hemodinámico, la resucitación con catecolaminas y el cambio en el funcionamiento del metabolismo intermediario que nosotros documentamos.

- 7- Debido al carácter exploratorio de nuestro estudio no es posible realizar conclusiones con relación al pronóstico y la concentración de los intermediarios del CAT. Así mismo, tampoco es posible justificar con nuestros resultados las variaciones temporales previamente planteadas ya que nuestros resultados únicamente nos permiten interpretar la respuesta inicial del metabolismo intermediario a la noxa séptica.

FORTALEZAS Y PERSPECTIVAS FUTURAS.

Nuestro estudio posee algunas fortalezas:

- 1- Desde nuestro punto de vista, la experimentación con biomodelos animales permite la caracterización de patologías complejas y multifactoriales mediante el control de diversas variables que no son posibles de manipular en el

paciente críticamente enfermo. En este contexto, un modelo porcino de endotoxemia permite obtener resultados más extrapolables al ser humano ya que esta especie comparte características inmunológicas, metabólicas y hemodinámicas específicas de nuestra especie. Por lo tanto, el adiestramiento en este tipo de experimentación es metodológicamente valioso y con su estandarización esperamos que sea posible el desarrollo de otras hipótesis de trabajo. A nuestro saber, este es el primer estudio en Colombia que lleva a cabo un modelo de endotoxemia como parte de la experimentación en sepsis, experimentación que en el momento también se lleva a cabo en otras instituciones del país (18, 284). Con nuestra investigación contribuimos a la generación de conocimiento y al planteamiento de estudios generadores de hipótesis que son posibles de continuarse en nuestro departamento de Fisiología.

- 2- Datos como los reportados por nuestro grupo no se encuentran en la literatura; nosotros analizamos de manera dirigida el cambio temporal de los intermediarios del CAT en las muestras de suero de un biomodelo porcino de endotoxemia; análisis que no se ha ejecutado de manera previa en ninguna especie ya que convencionalmente se encuentran en la literatura resultados que son el producto de análisis metabólicos no dirigidos, en los cuales, se cuantifican gran cantidad de metabolitos (9, 23, 159, 223, 268). Si bien, el uso de análisis metabólicos no dirigidos permite obtener una perspectiva global del metabolismo, y su vez, realizar una identificación cualitativa de múltiples sustancias con un alto grado de precisión, nosotros consideramos que los resultados aquí expuestos mediante la metodología de HPLC son congruentes con los encontrados mediante el uso de tecnologías más costosas y poco exequibles en nuestro medio.
- 3- El desarrollo del modelo nos ha permitido identificar datos que sugieren una respuesta hemodinámica no homogénea entre los animales, por lo que no es

posible suponer que un modelo animal está exento de variabilidad biológica. Lo anterior, puede orientar el desarrollo de biomodelos futuros que permitan identificar fenotipos resistentes al colapso hemodinámico o que exhiban un grado de adaptación metabólica más favorable.

- 4- La estandarización de nuestro modelo se encuentra ligada a la adquisición de habilidades y de conocimientos que nos permitirán desarrollar biomodelos en los cuales el colapso hemodinámico sea mayor; ya que de acuerdo a nuestras observaciones esta especie tolera la endotoxemia por más de 6 horas, igualmente, es posible desarrollar biomodelos que no empleen el uso de líquidos y vasopresores, con lo cual se logre la instauración de hipoxia global y la observación de alteraciones hemodinámicas y metabólicas más marcadas.
- 5- Múltiples perspectivas futuras son factibles y dependen principalmente de la hipótesis de trabajo, sin embargo, es necesario tener en cuenta que los biomodelos animales deben buscar la estandarización de sus protocolos con el fin de no generar resultados confusos que generen ruido en la literatura, a favor de nuestra metodología, en esta investigación seguimos un protocolo similar al empleado por Hatib et al para el suministro de la endotoxina (180). Con esto se lograron condiciones de colapso hemodinámico similares a las reportadas por estos autores; observándose la inducción de choque por endotoxemia en un periodo de tiempo similar (3 horas), sin embargo, a diferencia de Hatib et al. nosotros empleamos una resucitación protocolizada con líquidos y vasopresores buscando asemejar las intervenciones hemodinámicas que se llevan a cabo durante la resucitación de los pacientes con choque séptico.
- 6- En cuanto a nuestros resultados metabólicos se refiere, se hace necesario el desarrollo de otros protocolos que nos permitan observar la dinámica temporal de la respuesta metabólica a la sepsis en escenarios más tardíos y más

severos, continuando así, el estudio de las hipótesis generadas por esta investigación.

- 7- La investigación en torno a la anaplerosis y la cataplerosis del CAT contribuye al entendimiento de la reprogramación metabólica que ocurre en la sepsis, reprogramación que no se limita únicamente a la alteración de la fosforilación oxidativa y al daño por estrés oxidativo como marcadores de disfunción mitocondrial, sino que también incluye la respuesta dinámica del metabolismo intermediario a nivel tisular y plasmático.

CONCLUSIONES.

- 1- Nuestro biomodelo exhibió un perfil hiperdinámico en su fase inicial, y de manera concomitante fue posible observar el ascenso de la VPP y la VVS indicando que nuestros biomodelos se encontraron en la porción ascendente de la curva de Frank-Starling.
- 2- Nuestro biomodelo de choque por endotoxemia no conllevó hacia el deterioro del DO_2/VO_2 , solo en 2 de 9 biomodelos fue posible observar el ascenso de la relación L/P a valores superiores a 10, por lo cual no fue posible identificar la instauración de hipoxia a nivel sistémico durante nuestro protocolo de endotoxemia.
- 3- Todos los intermediarios del CAT se incrementaron durante la endotoxemia, sin embargo, los únicos metabolitos que presentaron un ascenso estadísticamente significativo fueron el succinato y el citrato.
- 4- El succinato fue el metabolito del CAT predominante a nivel sérico al final de nuestra experimentación.
- 5- La elevación de succinato y los otros intermediarios del CAT no estuvo ligada a la instauración de hipoxia y probablemente correspondió a la señalización proinflamatoria e inmunológica que aconteció durante la progresión de la endotoxemia.

- 6- Durante nuestra experimentación se observó el desarrollo de hipoglicemia, la instauración de hiperlactatemia manteniendo una relación L/P menor a 10 y el incremento sérico de los intermediarios del CAT los cuales son indicadores indirectos de un estado hipercatabolico.
- 7- Encontramos una correlación parcial entre las concentraciones de succinato y lactato durante el desarrollo de endotoxemia. De acuerdo a nuestro planteamiento ambos metabolitos ascendieron a consecuencia del incremento del metabolismo oxidativo, sin embargo, las causas que conllevaron a su acumulación sérica son múltiples y solo se encuentran parcialmente relacionadas.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Seymour CW, Kennedy JN, Wang S, Chang CH, Elliott CF, Xu Z, et al. Derivation, validation, and potential treatment implications of novel clinical phenotypes for sepsis. *JAMA*. 2019; 321(20): 2003-2017.
2. Rhee C, Dantes R, Epstein L, et al. Incidence and trends of sepsis in US hospitals using clinical vs claims data, 2009-2014. *JAMA*. 2017;318(13):1241- 1249.
3. Rhodes, A., Evans, L.E., Alhazzani, W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med* 2017; 43: (3) 304-377
4. Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, et al. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 286: 1869-78.
5. Vincent JL, Francois B, Zabolotskikh I, Daga MK, Lascarrou JB, Kirovet MY, et al. Effect of a recombinant human soluble thrombomodulin on mortality in patients with sepsis-associated coagulopathy: the SCARLET randomized clinical trial. *JAMA* 2019; 321: 1993-2002.
6. Vincent JL. Improved survival in critically ill patients: are large RCTs more useful than personalized medicine? No. *Intensive Care Med* 2016; 42: 1778-80.
7. Kent DM, Hayward RA. Limitations of applying summary results of clinical trials to individual patients: the need for risk stratification. *JAMA*. 2007;298(10):1209-1212.
8. Itenov TS, Murray DD, Jensen JUS. Sepsis: personalized medicine utilizing “omic” technologies-a paradigm shift? *Healthcare (Basel)* 2018; 6:1-9.
9. Langley RJ, Tsalik EL, Velkinburgh JCV, Glickman SW, Rice BJ, Wang C, et al. An integrated clinico-metabolomic model improves prediction of death in sepsis. *Sci Transl Med*. 2013; 5: 195ra95.
10. Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O, Antti H, Charuel C, Hanton G. et al. Pharmacometabonomomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature* 2006; 440: 1073-7.
11. Van Wyngene L., Vandewalle J., Libert C. (2018). Reprogramming of basic metabolic pathways in microbial sepsis: therapeutic targets at last? *EMBO Mol. Med*. 10:e8712.
12. Gomez H, Kellum JA, Ronco C. Metabolic reprogramming and tolerance during sepsis-induced AKI. *Nat Rev Nephrol* 2017; 13: 143-15119.
13. Pool R, Gomez H, Kellum JA. Mechanisms of Organ Dysfunction in Sepsis. *Crit Care Clin* 2018; 34: 63-80.
14. Sun J, Zhang J, Tian J, Virzì GM, Digvijay K, Cueto L, et al. Mitochondria in Sepsis-Induced AKI. *JASN* 2019; 30 (7): 1151-1161.
15. Hotchkiss RS, Karl IE. Reevaluation of the role of cellular hypoxia and bioenergetic failure in sepsis. *JAMA* 1992; 267:1503–1510.
16. Spronk P, Zandstra D, Ince C. Bench-to-bedside review: Sepsis is a disease of the microcirculation *Crit Care* 2004; 8 (6): 462–68.
17. Nelson DP, Samsel RW, Wood LDH, et al: Pathological supply dependence of systemic and intestinal O₂ uptake during endotoxemia. *J Appl Physiol*. 1988; 64:2410-2419.

18. Ospina-Tascón GA, García Marin AF, Echeverri GJ, Bermudez WF, Madriñan-Navia H, Valencia JD, et al. Effects of dobutamine on intestinal microvascular blood flow heterogeneity and O₂ extraction during septic shock. *Journal of Applied Physiology*. (1985) 2017; 122 (6): 1406-1417.
19. Fink MP. Cytopathic Hypoxia Mitochondrial Dysfunction as Mechanism Contributing to Organ Dysfunction in Sepsis. *Crit Care Clin* 2001; 17: 219-237
20. Warburg O. The metabolism of carcinoma cells. *Cancer Res* 1925; 9: 148-163.
21. Srivastava A, Mannam P. Warburg revisited: lessons for innate immunity and sepsis. *Front Physiol* 2015; 6: 70.
22. Cheng S, Scicluna B, Arts R. Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. *Nat. Immunol.* 2016; 17:406-413.
23. Cambiaghi A, Pinto BB, Brunelli L, Falcetta F, Aletti F, Bendjelid K, et al. Characterization of a metabolomic profile associated with responsiveness to therapy in the acute phase of septic shock. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 9748.
24. Whelan SP, Carchman EH, Kautza B, et al. Polymicrobial sepsis is associated with decreased hepatic oxidative phosphorylation and an altered metabolic profile. *J Surg Res* 2014; 186:297–303.
25. Waltz P, Carchman E, Gomez H, and Zuckerbraun B. Sepsis results in an altered renal metabolic and osmolyte profile. *J Surg Res.* 2016; 202: 8-12.
26. Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF, Nissim I. Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2826–2831.
27. Chinopoulos C. Which way does the citric acid cycle turn during hypoxia? - The critical role of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex. *J. Neurosci. Res.* 2013; 91: 1030–1043.
28. Randall HM Jr, Cohen JJ. Anaerobic CO₂ production by dog kidney in vitro. *Am J Physiol* 1966; 211: 493-505.
29. Baldwin JE, Krebs H. the evolution of metabolic cycles. *Nature* 1981; 291: 381-382.
30. Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem* 2002; 277:30409-30412.
31. Tannahill, G.M et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature.* 2013; 496:238-242
32. Koivunen P, Hirsilä M, Remes AM, et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J Biol Chem* 2007; 282: 4524-4532.
33. Mills, E. L. et al. Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages. *Cell.* 2016; 167: 457-470.
34. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 2014; 525: 431-436.
35. Mickiewicz B, Duggan GE, Winston BW, Doig C, Kubes P, Vogel HJ. Metabolic profiling of serum samples by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy as a potential diagnostic approach for septic shock. *Crit Care Med.* 2014; 42: 1140–1149.

36. Fedotcheva NI, Litvinova EG, Osipov AA, Olenin AY, Moroz VV, et al. Influence of Microbial Metabolites of Phenolic Nature on the Activity of Mitochondrial Enzymes. *Biofizika* 2015; 60 (6): 1118-1124.
37. Mackenzie IM. The haemodynamics of human septic shock. *Anaesthesia* 2001; 56: 130-144.
38. Hotchkiss R, et al. Sepsis & Septic Shock. *Nature Review* 2016; 45 (2): 1-21.
39. Ince C, Mik E. Microcirculatory and mitochondrial hypoxia in sepsis, shock, and resuscitation. *J Appl Physiol* 2016; 120: 226-35.
40. Delabranche X, Helms J, Meziani F. Immunohaemostasis: a new view on haemostasis during sepsis. *Ann. Intensive Care* 2017; 7: 117
41. Koutroulis I, Batabyal R, McNamara B, Ledda M, Hoptay C, Freishtat R. Sepsis immunometabolism: from defining sepsis to understanding how energy production affects immune response. *Critical Care Explorations* 2019; 1 (11):e0061.
42. Andrades M, Spasic M, Spasic S, Spasojević I. Bench to bedside review: Sepsis - from the redox point of view. *Crit Care* 2011; 15(5): 230.
43. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence* 2014; 5: 66–72.
44. Weil M, Afifi A. Experimental and clinical studies on lactate and pyruvate as indicators of the severity of acute circulatory failure (Shock). *Circulation* 1970; 41: 989-1001.
45. Chertoff J, Chisum M, Garcia B, et al. Lactate kinetics in sepsis and septic shock: a review of the literature and rationale for further research. *J Intensive Care*. 2015; 3: 39-42.
46. Lee I, Huttemann M. Energy crisis: the role of oxidative phosphorylation in acute inflammation and sepsis. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842: 1579-1586.
47. D'Alessandro A, Moore HB, Moore EE, Wither M, Nemkov T, Gonzalez E, Slaughter A, Fragoso M, Hansen KC, Silliman CC, et al. Early hemorrhage triggers metabolic responses that build up during prolonged shock. *Am J Physiol – Regul Integr Comp Physiol*. 2015; 308 (12): R1034–44.
48. Servià L, Jové M, Sol J, Pamplona R, Badia M, Montserrat N, et al. A prospective pilot study using metabolomics discloses specific fatty acid, catecholamine and tryptophan metabolic pathways as possible predictors for a negative outcome after severe trauma. *J Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2019; 27 (1): 56.
49. Liu Z, Triba MN, Amathieu R, Lin X, Bouchemal N, Hantz E, et al. Nuclear magnetic resonance-based serum metabolomic analysis reveals different disease evolution profiles between septic shock survivors and non-survivors. *Crit. Care*. 2019; 23: 169.
50. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Bernard GR, Annane D, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801-810.
51. Silva S, Teboul JL. Defining the adequate arterial pressure target during septic shock: not a “micro” issue but the microcirculation can help. *Crit care*. 2011; 15:1004.
52. Saugel B, Trepte CJ, Heckel H, Wagner JY, Reuter DA. Hemodynamic management of septic shock: is it time for “individualized goal-directed hemodynamic therapy” and for specifically targeting the microcirculation? *Shock* 2015. 43 (6): 522-529.
53. Monnet X, Saugel B. Could resuscitation be based on microcirculation data? We are not sure. *Intensive Care Med*. 2018; 44: 950-953.

54. Ince, C. Hemodynamic coherence and the rationale for monitoring the microcirculation. *Crit Care* 2015; 19: S8
55. Hernandez, G., Teboul J.L. Is the macrocirculation really dissociated from the microcirculation in septic shock? *Intensive Care Med* 2016; 42:1621-24.
56. Dubin A, Pozo MO, Casabella CA, Palizas F jr; Murias G, Moseinco MC, et al. Increasing arterial blood pressure with norepinephrine does not improve microcirculatory blood flow: a prospective study. *Crit Care* 2009; 13 (3): R92
57. De Backer D, Foulon P. Minimizing catecholamines and optimizing perfusion. *Critical Care* 2019; 23 (1): 149.
58. Hotchkiss RS, Rust RS, Dence CS, et al. Evaluation of the role of cellular hypoxia in sepsis by the hypoxic marker [18F] fluoromisonidazole. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1991; 261: R965–72
59. Groeneveld AB, van Lambalgen AA, van den Bos GC, et al. Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxin shock. *Cardiovasc Res* 1991; 25: 80–8
60. Chew MS, Johansson A, Anderson C, Ersson A, et al. Decreases in myocardial glucose and increases in pyruvate but not ischaemia are observed during porcine endotoxaemia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008; 52: 959–68
61. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med* 2007; 35: 2408–16.
62. Fink MP. Cytopathic hypoxia and sepsis: is mitochondrial dysfunction pathophysiologically important or just an epiphenomenon. *Pediatr Crit Care Med* 2015; 16: 89-91.
63. Shoemaker W, Appel P, Kram HB, Bishop MH, Abraham E. Temporal hemodynamic and oxygen transport patterns in medical patients. *Septic Shock. Chest* 1993; 1529-36.
64. Elbers PW, Ince C. Bench-to-bedside review: Mechanisms of critical illness – classifying microcirculatory flow abnormalities in distributive shock. *Critical Care* 2006; 10: 221.
65. Kakahana Y, Ito K, Nakahara M, Yamaguchi K, Yasuda T. Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. *Journal of Intensive Care* 2016; 4:22,
66. Marx G, Vangerow B, Burczyk C, Gratz KF, Maassen N, Cobas Meyer M, et al. Evaluation of noninvasive determinants for capillary leakage syndrome in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2000; 26:1252–1258.
67. Magder S, Vanelli G. Circuit factors in the high cardiac output of sepsis. *J Crit Care* 1996; 11: 155–166.
68. Jianhui L, Rosenblatt-Velin N, Loukili N, Pacher P, Feihl F, Waeber B, et al. Endotoxin impairs cardiac hemodynamics by affecting loading conditions but not by reducing cardiac inotropism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299: H492–H501.
69. Groeneveld AB, Nauta JJ, Thijs LG. Peripheral vascular resistance in septic shock: its relation to outcome. *Intensive Care Med* 1988; 14:141-147.
70. Chan CM, Klinger JR. The Right Ventricle in Sepsis. *Clin Chest Med* 2008; 29: 661 – 676.
71. Court O, Kumar A, Parrillo JE, et al. Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care* 2002; 6:500-508.

72. Silva Ramos FJ, Azevedo LC: Hemodynamic and perfusion end points for volemic resuscitation in sepsis. *Shock*. 2010; 34: 34-39.
73. Marx G, Pedder S, Smith L, Swaraj S, Grime S, Stockdale H, et al. Resuscitation from septic shock with capillary leakage: Hydroxyethyl starch (130 kd), but not Ringer's solution maintains plasma volume and systemic oxygenation. *Shock* 2004; 21: 336–41.
74. Perner A, Cecconi M, Cronhjort M, Darmon M, Jakob S, Pettila V. Expert statement for the management of hypovolemia in sepsis. *Intensive Care Med* 2018; 44: 791-798.
75. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113: 227-242.
76. Guarracino F, Bertini P, Pinsky MR. Cardiovascular determinants of resuscitation from sepsis and septic shock. *Critical Care* 2019; 23: 118.
77. De Backer D. Detailing the cardiovascular profile in shock patients. *Critical Care* 2017; 21 (3): 311.
78. Garcia-Alvarez M, Paul Marik, Rinaldo Bellomo. Sepsis-associated hyperlactatemia. *Critical Care* 2014; 18: 503-513.
79. Suetrong B, Walley KR. Lactic Acidosis in Sepsis: It's Not All Anaerobic Implications for Diagnosis and Management. *CHEST* 2016; 149:252-261
80. Vincent JL, Quintairos A, Couto L, et al. The value of blood lactate kinetics in critically ill patients: a systematic review. *Critical Care* 2016; 20: 257-270.
81. Dunser M, Takala J, Brunauer A, Bakker J. Rethinking resuscitation: leaving blood pressure cosmetics behind and moving forward to permissive hypotension and a tissue perfusion-based approach. *Critical Care* 2013; 17 (5): 326
82. Aird WC. Endothelium as an organ system. *Crit Care Med* 2004; 32: S271-S279.
83. Segal S. Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation* 2005; 12: 33-45.
84. Davis MJ. Perspective: physiological role(s) of the vascular myogenic response. *Microcirculation* 2012; 19: 99-114.
85. Moore J, Dyson A, Singer M, et al. Microcirculatory dysfunction and resuscitation: why, when, and how. *British Journal of Anaesthesia* 2015: 366–75
86. Chen K, Popel AS. Theoretical analysis of biochemical pathways of nitric oxide release from vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 668-80.
87. Trzeciak S, Cinel I, Phillip Dellinger R, et al. Resuscitating the microcirculation in sepsis: the central role of nitric oxide, emerging concepts for novel therapies, and challenges for clinical trials. *Acad Emerg Med* 2008; 15: 399-413.
88. De Backer D, Ospina-Tascon G, Salgado D, et al. Monitoring the microcirculation in the critically ill patient: current methods and future approaches. *Intensive Care Med* 2010; 36: 1813 – 1825.
89. Chelazzi C, Villa G, Mancinelli P, De Gaudio AR, Adembri C. Glycocalyx and sepsis-induced alterations in vascular permeability. *Crit Care* 2015; 19: 26.
90. Price SA, Spain DA, Wilson MA, Harris PD, Garrison RN. Subacute sepsis impairs vascular smooth muscle contractile machinery and alters vasoconstrictor and dilator mechanisms. *J Surg Res* 1999; 83: 75–80.

91. Marechal X, Favory R, Joulin O, et al. Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress. *Shock* 2008; 29: 572-576.
92. Eichelbrönnner O, Sielenkämper A, Cepinskas G, Sibbald WJ, ChinYee IH. Endotoxin promotes adhesion of human erythrocytes to human vascular endothelial cells under conditions of flow. *Crit Care Med* 2000; 28: 1865–70.
93. Ince C, Sinaasappel M. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Crit Care Med* 27: 1369 –1377, 1999.
94. Hernandez G, Bruhn A, Ince C. Microcirculation in sepsis: new perspectives. *Curr Vasc Pharmacol* 2013; 11: 161–69.
95. Trzeciak S, McCoy JV, Phillip Dellinger R. Early increases in microcirculatory perfusion during protocol-directed resuscitation are associated with reduced multi-organ failure at 24 h in patients with sepsis. *Intensive Care Med* 2008; 34: 2210-2217.
96. Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, Ljunggren L, Bodelsson M. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock* 2008; 30: 623–27.
97. Bateman RM, Sharpe MD, Jagger JE, et al. Sepsis impairs microvascular autoregulation and delays capillary response within hypoxic capillaries. *Crit Care* 2015. 19: 389.
98. Borutaite V, Matthias A, Harris H, et al. Reversible inhibition of cellular respiration by nitric oxide in vascular inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H2256 –H2260.
99. Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG. Microvascular dysfunction in sepsis—hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care* 2003; 7: 359 –73.
100. Marik PE. The demise of early goal directed therapy for severe sepsis and septic shock. *Acta Anaesthesiol Scand* 2015; 59: 561-567.
101. Singer M, De Santis V, Vitale D, et al. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet* 2004; 364: 545-8.
102. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999; 27:1230-1251.
103. VanderMeer TJ, Wang H, Fink MP. Endotoxemia causes ileal mucosal acidosis in the absence of mucosal hypoxia in a normodynamic porcine model of septic shock. *Crit Care Med* 1995; 23: 1217-1226.
104. Sair M, Etherington PJ, Winlove CP, et al. Tissue oxygenation and perfusion in patients with systemic sepsis. *Crit Care Med* 2001; 29: 1343 -1349.
105. Singer M. Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure. *Crit Care Med* 2007; 35: 441-448
106. Schumacker PT, Chandel N, Agusti AG. Oxygen conformance of cellular respiration in hepatocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1993; 265: 395- 400.
107. Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, et al. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 2004; 286: 491-497.

108. Levy RJ. Mitochondrial dysfunction, bioenergetic impairment, and metabolic down-regulation in sepsis. *Shock*. 2007; 28: 24–28.
109. Carré, J.E. & Singer, M. Cellular energetic metabolism in sepsis: the need for a systems approach. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1777:763–771.
110. Fink MP. Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia. *Crit Care* 2002; 6: 491–99.
111. Bar-Or D, Carrick MM, Mains CW, Rael LT, Slone D, Brody EN. Sepsis, oxidative stress, and hypoxia: are there clues to better treatment? *Redox Rep* 2015; 20: 193-197.
112. Levy B, Desebbe O, Montemont C, et al. Increased aerobic glycolysis through beta2 stimulation is a common mechanism involved in lactate formation during shock states. *Shock* 2008; 30: 417-21.
113. Robergs R, Ghiasvand F, Parker D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: 502-516.
114. Crouser ED, Julian MW, Blaho DV, Pfeiffer DR. Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. *Crit Care Med*. 2002; 30: 276–284.
115. Eyenga P, Roussel D, Morel J, et al. Early septic shock induces loss of oxidative phosphorylation yield plasticity in liver mitochondria. *J Physiol Biochem* 2014; 70: 285-296
116. Taylor DE, Ghio AJ, Piantadosi CA. Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Arch Biochem Biophys*. 1995; 316: 70-76.
117. Galley H. F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *British Journal of Anaesthesia*. 2011; 107: 57–64.
118. Levy RJ, Deutschman CS. Deficient mitochondrial biogenesis in critical illness: cause, effect, or epiphenomenon? *Crit Care*. 2007; 11: 158-159
119. Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. *Surgery*. 1979; 85: 205-211.
120. Hotchkiss RS, Morikawa S, Inubushi T, et al. Gluconeogenesis and phosphoenergetics in rat liver during endotoxemia. *J Surg Res*. 1998; 74: 179-186.
121. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 2002. 360: 219-23.
122. Frayn KN, et al. *Metabolic regulation. A human perspective*. 3rd edn. 2010. Oxford: Willey Blackwell, 2010.
123. Alberts B, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 6th edn. 2015. New York. Taylor & Francis Group: Garland Science, 2015.
124. Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 1997; 77: 731-758.
125. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry* 6th edn 2010. New York. Worth Publishers, 2010.
126. Nalos M, Robergs R. Understanding hyperlactatemia in human sepsis: Are we there yet?. *Am J Respir Critic Care Med* 2019; 200: 1069-70.
127. Corrêa TD, Jakob SM, Takala J. Mitochondrial function in sepsis. *Crit Care Horizons*. 2015; 1: 31-41.

128. Solaini G, Baracca A, Lenaz G, et al. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 2010; 1797: 1171–1177.
129. Connett RJ, Honig CR, Gayeski EJ, et al. Defining hypoxia: a systems view of VO₂, glycolysis, energetics, and intracellular PO₂. *J Appl Physiol* 1990; 68: 833-842.
130. Duke T. Dysoxia and lactate. *Archives of Disease in Childhood* 1999; 81: 343-350.
131. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 5447-5454.
132. Hochachka PW, Somero GN. *Biochemical Adaptations. Mechanisms and Process* 1st edn 1983. Princeton NJ, Princeton Univ Press 1983.
133. Hochachka PW. Oxygen, homeostasis, and metabolic regulation. *Adv Exp Med Biol* 2000; 475: 311-335.
134. Zhang JZ., Behrooz A., Ismail-Beigi F. Regulation of glucose transport by hypoxia. *American Journal of Kidney Diseases* 1999; 34 (1): 189-202.
135. Greijer A, van der Groep P, Kemming D, Shvarts A, Semenza G, Meijer G, et al. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *The Journal of Pathology* 2005; 206(3): 291–304.
136. Lum JJ, Bui T, Gruber M, et al. The transcription factor HIF-1 α plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes Dev* 2007; 21: 1037-1049.
137. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006; 3: 177-185.
138. Viollet B, Athesa Y, Mounier R, et al. AMPK: lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci Review* 2009; 14: 19-44.
139. Chandel NS, E. Maltepe E, Goldwasser E, et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11715-11720.
140. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123: 309-314.
141. Bar-Or D, Carrick M, Tanner A, et al. Overcoming the Warburg Effect: Is it the key to survival in sepsis? *J Crit Care* 2018; 43:197-201.
142. Ganeshan K, Ajay Chawla A. Metabolic Regulation of Immune Responses. *Annual Review of Immunology*. 2014; 32:1, 609-634.
143. Staples JF. Metabolic suppression in mammalian hibernation: the role of mitochondria. *J Exp Biol* 2014; 217:2032-2036.
144. Senyilmaz D, Teleman AA. Chicken or the egg: Warburg effect and mitochondrial dysfunction. *F1000Prime Rep* 2015; 7: 41-47
145. Carré JE, Orban J-C, Re L, Felsmann K, Iffert W, Bauer M, et al. Survival in critical illness is associated with early activation of mitochondrial biogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182: 745-51.
146. Kim V, Tchernyshyov I, Semenza GL, et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006; 3: 177-185.

147. Handzlik MK, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL, et al. Increasing cardiac pyruvate dehydrogenase flux during chronic hypoxia improves acute hypoxic tolerance. *J Physiol* 2018; 596 (15): 3357-3369.
148. Nuzzo E, Berg KM, Andersen LW. Pyruvate Dehydrogenase Activity Is Decreased in the Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Sepsis - A Prospective Observational Trial. *Ann Am Thorac Soc* 2015; 12 (11):1662-6.
149. Cooper CE, Giulivi C. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption II: molecular mechanism and tissue physiology. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 2007. 292: 1993–2003.
150. Galkin A, Abramov AY, Frakich N, et al. Lack of oxygen deactivates mitochondrial Complex I: implications for ischemic injury? *J Biol Chem* 2009. 284: 36055–36061.
151. Forget AP, Mangalaboyi J, Mordon S, et al. Escherichia coli endotoxin reduces cytochrome aa3 redox status in pig skeletal muscle. *Crit Care Med* 2000; 28: 3491-3497.
152. Barth E, Radermacher P, Thiemermann C, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in the reduced responsiveness of the myocardium to catecholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34: 307-313.
153. Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol. Metab* 2009; 7: 332-340.
154. Haisch M, Fukagawa NK, Matthews DE. Oxidation of glutamine by the splanchnic bed in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: 593-602.
155. Owen OE, Smalley KJ, D'Alessio DA, et al. Protein, fat, and carbohydrate requirements during starvation: anaplerosis and cataplerosis. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1998; 68: 12-34.
156. Meléndez-Hevia E, Waddell TG, Cascante M. The puzzle of the Krebs citric acid cycle: Assembling the pieces of chemically feasible reactions, and opportunism in the design of metabolic pathways during evolution. *J Mol Evol* 1996; 43: 293-303.
157. Martin W, Muller M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 1998; 392: 37-41
158. Randall HM Jr, Cohen JJ. Anaerobic CO₂ production by dog kidney in vitro. *Am J Physiol* 1966; 211: 493-505
159. D'Alessandro A, Slaughter AL, Peltz ED, et al. Trauma/hemorrhagic shock instigates aberrant metabolic flux through glycolytic pathways, as revealed by preliminary ¹³C-glucose labeling metabolomics. *J Transl Med* 2015; 13: 253-265.
160. Randle PJ, England PJ, Denton RM. Control of the tricarboxylate cycle and its interactions with glycolysis during acetate utilization in rat heart. *Biochem J* 1970; 117: 677-695.
161. Guynn RW, Gelberg HJ & Veech RL. Equilibrium constants of the malate dehydrogenase, citrate synthase, citrate lyase, and acetyl coenzyme A hydrolysis reactions under physiological conditions. *J. Biol. Chem.* 1973; 248: 6957–6965.
162. Cooney GJ, Taegtmeier H, Newsholme EA. Tricarboxylic acid cycle flux and enzyme activities in the isolated working rat heart. *Biochem J* 1981; 200: 701-703.
163. Hochachka PW, Dressendorfer RH. Succinate accumulation in man during exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1976. 35: 235-242.

164. Sanborn T, Gavin W, Berkowitz S, et al. Augmented conversion of aspartate and glutamate to succinate during anoxia in rabbit heart. *Am J Physiol* 1979; 237: H535-H541.
165. Shi Q, Gibson GE. Upregulation of the mitochondrial malate dehydrogenase by oxidative stress is mediated by miR-743a. *J Neurochem* 2011; 118: 440-448.
166. Des Rosiers C, Fernandez CA, David F, Brunengraber H. Reversibility of the mitochondrial isocitrate dehydrogenase reaction in the perfused rat liver. Evidence from isotopomer analysis of citric acid cycle intermediates. *J Biol Chem* 1994; 269: 27179-27182.
167. Comte B, Vincent G, Bouchard B, Benderdour M, Des Rosiers C. Reverse flux through cardiac NADP1-isocitrate dehydrogenase under normoxia and ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H1505-H1514.
168. Mullen AR, Wheaton WW, Jin ES, et al. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* 2012; 481: 385-388.
169. Phillips D, Aponte AM, French SA, Chess DJ, Balaban RS. Succinyl-CoA synthetase is a phosphate target for the activation of mitochondrial metabolism. *Biochemistry* 2009; 48: 7140-7149.
170. Siegel JH, Cerra FB, Coleman B, et al. Physiologic and metabolic correlations in human sepsis. *Surgery* 1979; 85:163.
171. Cerra FB, Siegel JH, Coleman B, et al. Septic autocannibalism a failure of exogenous nutritional support. *Ann Surg* 1980; 192: 570-579.
172. Infantino V, Convertini P, Cucci L, et al. The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. *Biochem. J.* 2011; 438: 433-436.
173. Infantino V, Iacobazzi V, Menga A, et al. A key role of the mitochondrial citrate carrier (SLC25A1) in TNF α - and IFN γ -triggered inflammation. *Biochimica et biophysica acta* 2014; 1839:1217-1225.
174. Cimen H, Han MJ, Yang Y, et al. Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry* 2010; 49: 304-311.
175. Mills E, O'Neill LA. Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol* 2014; 24:313-320.
176. Rubic T, Lametschwandtner G, Hinteregger S, et al. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat Immunol* 2008; 9: 1261-1269.
177. Zhang Z1, Tan M, Xie Z, et al. Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification. *Nat Chem Biol.* 2011; 7: 58-63.
178. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- prolylhydroxylase. *Cancer Cell* 2005;7: 77-85.
179. Reisz JA, Wither MJ, Moore EE, Slaughter AL, Moore HB, Ghasabyan A, et al. All animals are equal but some animals are more equal than others: plasma lactate and succinate in hemorrhagic shock-A comparison in rodents, swine, nonhuman primates, and injured patients. *J Trauma Acute Care Surg.* 2018;84(3):537-41.
180. Hatib F, Jansen JRC, Pinsky MR. Peripheral vascular decoupling in porcine endotoxic shock. *J Appl Physiol.* 2011; 111:853-60.

181. Parkin WG, Leaning MS. Therapeutic control of the circulation. *J Clin Comput Monit.* 2008; 22:391.
182. Forni LG, McKinnon W, Lord GA, et al. Circulating anions usually associated with the Krebs cycle in patients with metabolic acidosis. *Crit Care.* 2005; 9: R591-R595.
183. McKinnon W, Lord GA, Forni LG, et al: A rapid LC-MS method for determination of plasma anion profiles of acidotic patients. *J Chromatogr* 2006, B833: 179-185.
184. Shurubor YI, Cooper AJ, Isakova EP, Deryabina YI, Beal MF, Krasnikov BF. Simultaneous determination of tricarboxylic acid cycle metabolites by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Analytical Biochemistry.* 2017; 503: 8-10.
185. Mycielska ME, Patel A, Rizaner A, Mazurek MP, Keun H, Patel A, et al. Citrate transport and metabolism in mammalian cells: prostate epithelial cells and prostate cancer. *Bioessays* 2009; 31 (1): 10–20.
186. Dabek M, Kruszewska D, Filip R, Hotowy A, Pierzynowski L, Wojtasz-Pajak A, et al. Alpha-Ketoglutarate (AKG) absorption from pig intestine and plasma pharmacokinetics. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2005; 89: 419–426.
187. Hofmann GF, Meier-Augenstein W, Stöckler S, Surtees R, Rating D, Nyhan WL. Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 1993; 16 (4): 648–669.
188. Mongan, PD, Fontana, JL, Chen, R, Bünger, R. Intravenous pyruvate prolongs survival during hemorrhagic shock in swine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 277: H2253–63.
189. Hofmaier F., Dinger K., Braun R., Sterner-Kock A. Range of blood lactate values in farm pigs prior to experimental surgery. *Lab. Anim.* 2013; 47: 130–132.
190. Jakob SM, Suistomaa M, Takala J. Lactate, Lactate/Pyruvate Ratio, Low Tissue Perfusion and Outcome. En: Vincent JL editor, *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine* 2001. Berlin, Heidelberg: Springer; 2001:268-277.
191. Hess M, Hastillo A, Greenfield L. Spectrum of cardiovascular function during gram negative sepsis. *Progress in cardiovascular diseases.* 1980;23(4):279-289
192. Pinsky M Rico P. Cardiac Contractility Is Not Depressed in Early Canine Endotoxic Shock. *Am. J. Respir.* 1999; 161:4
193. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J. Surg. Res.* 1990; 49: 186–196.
194. Schmidhammer R, Wassermann E, Germann P, Redl H, Ullrich R. Infusion of increasing doses of endotoxin induces progressive acute lung injury but prevents early pulmonary hypertension in pigs. *Shock* 2006;25(4):389-94.
195. Houser B, Vogt J, Wachter U, Brückner UB, Fink MP. Ethyl pyruvate improves systemic and hepatosplanchnic hemodynamics and prevents lipid peroxidation in a porcine model of resuscitated hyperdynamic endotoxemia. *Crit Care Med* 2005;33(9):2034-42.
196. Cunha-Goncalves, Perez-de-sa V. Inotropic support during experimental endotoxemic shock: part I. The effects of levosimendan on splanchnic perfusion. *Anesth Analg* 2009;109(5):1568-75.

197. Udhoji VN, Weil MH. Hemodynamic and metabolic studies on shock associated with bacteremia. *Ann Intern Med.* 1985; 62: 966-978.
198. van Genderen, J De Jonge, Visser SS, Voorbeijtel J. Microvascular Perfusion as a Target for Fluid Resuscitation in Experimental Circulatory Shock. *Crit Care Med* 2014;42(2):e96-e105.
199. Byrne L, Obonyo NG, Diab S, Dunster K, Passmore M. An ovine model of hyperdynamic endotoxemia and vital organ metabolism. *Shock* 2018;49(1):99-107.
200. Cunha-Goncalves Perez-de-sa V. Inotropic support during experimental endotoxemic shock: part II. A comparison of levosimendan with dobutamine *Anesth Analg* 2009 Nov;109(5):1576-83.
201. Natanson C, Danner RL, Fink MP, MacVittie TJ, Walker RI, Conklin JJ, Parrillo JE. Cardiovascular performance with *E. coli* challenges in a canine model of human sepsis. *Am J Physiol.* 1988; 254: H558-H569.
202. Shoemaker WC. Cardiorespiratory patterns in complicated uncomplicated septic shock. *Ann Surg.* 1971; 174: 119-125.
203. Natanson C, Fink MP, Ballantyne HK, MacVittie TJ, Conklin JJ, Parrillo JE. Gram-negative bacteremia produces both severe systolic and diastolic cardiac dysfunction in a canine model that simulates human septic shock. *J Clin Invest.* 1986;78(1):259-270.
204. Chittock DR, Ronco JJ, Rusell JA. Monitoring of oxygen transport and oxygen consumption. En: Tobin JM editor, *Principles and practice of intensive care monitoring.* New York: McGraw-Hill; 1998. 317-344.
205. Chemla D, Coirault C, Hebert JL, Lecarpentier Yves. Mechanics of relaxation of the human heart. *Physiology* 2000; 15: 2: 78-83.
206. Schumacker PT, Cain SM. The concept of a critical oxygen delivery. *Intensive Care Med* 1987; 13: 223-9.
207. Friedman G, De Backer D, Shahla M, Vincent JL. Oxygen supply dependency can characterize septic shock *Intensive Care Medicine* 1998; 24 (2): 118-123.
208. Walley KR. Heterogeneity of oxygen delivery impairs oxygen extraction by peripheral tissues: theory. *J Appl Physiol* 1996; 81: 885-894.
209. Grist G. Oxygen pressure field theory: a detailed description of vital gas exchange, at the capillary level for perfusionist. *Progress in Pediatric Cardiology*; 24 (2): 89-99
210. Donati A, Damiani E, Domizi R, Romano R, Adrario E, Pelaia P, et al. Alteration of the sublingual microvascular glycocalyx in critically ill patients. *Microvasc Res.* 2013; 90: 86-89.
211. Siegemund M, van Bommel J, Schwarte LA, Studer W, Girard T, Marsch S, Radermacher P, Ince C. Inducible nitric oxide synthase inhibition improves intestinal microcirculatory oxygenation and CO₂ balance during endotoxemia in pigs. *Intensive Care Med* 2005; 31: 985-992,
212. Stratton HH, Feustel PJ, Newell JC: Regression of calculated variables in the presence of shared measurement error. *J Appl Physiol.* 1987; 62: 2083-2093.
213. Ronco JJ, Phang PT, Walley KR, et al: Oxygen consumption is independent of changes in oxygen delivery in severe adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1991; 143:1267-1273.

214. Vincent JL, Roman A, De Backer D, Kahn RJ. Oxygen uptake/supply dependency: effects of short-term dobutamine infusion. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 142: 2–8.
215. Liu MS, GF Kang. Liver glycogen metabolism in endotoxin shock. I. Endotoxin administration decreases glycogen synthase activities in dog livers. *Biochem. Med. Metab. Biol* 1987; 37: 61–72.
216. van der Crabben SN, Blümer RM, Stegenga ME, Ackermans MT, Endert E, Tanck MW, et al. Early endotoxemia increases peripheral and hepatic insulin sensitivity in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Feb; 94 (2): 463-8.
217. Hagar JA, Edin ML, Lih FB, Thurlow LR, Koller BH, Cairns BA, et al. Lipopolysaccharide potentiates insulin-driven hypoglycemic shock. *The Journal of Immunology.* 2017; 199 (10): 3634-3643.
218. Bradley D, Singer M. Hyperglycemia in critical illness: A review *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3 (6):1250-1260.
219. Kvidera SK, Horst EA, Mayorga EJ, Sanz-Fernandez MV, Abuajamieh M, Baumgard LH. Estimating glucose requirements of an activated immune system in growing pigs. *J Anim Sci.* 2017; 11: 5020-5029.
220. Raetzsch CF, Brooks NL, Alderman JM, Moore KS, Hosick PA, Klebanov S, et al. Lipopolysaccharide inhibition of glucose production through the Toll-like receptor-4, myeloid differentiation factor 88, and nuclear factor kappa b pathway *Hepatology* 2009; 50: 592–600.
221. Tanaka H, Nishikawa Y, Fukushima T, Taniguchi A, Fujita Y, Tsuda K, et al. Lipopolysaccharide inhibits hepatic gluconeogenesis in rats: The role of immune cells. *Journal of diabetes investigation* 2017; 9 (3): 494–504.
222. Lv S, Qiu X, Li J, Li W, Zhang C, Zhang ZN et al. Suppression of CRTC2-mediated hepatic gluconeogenesis by TRAF6 contributes to hypoglycemia in septic shock. *Cell Discov* 2016; 2: 16046.
223. Clendenen N, Nunns GR, Moore EE, Reisz JA, Gonzalez E, Peltz E, et al. Hemorrhagic shock and tissue injury drive distinct plasma metabolome derangements in swine. *J Trauma Acute Care Surg.* 2017; 83(4): 635–642.
224. Varvarousis D, Xanthos T, Ferino G, Noto A, Iacovidou N, Mura M, Scano P, Chalkias A, Papalois A, De-Giorgio F, Baldi A, Mura P, Staikou C, Stocchero M, Finco G, d'Aloja E, Locci E. Metabolomics profiling reveals different patterns in an animal model of asphyxial and dysrhythmic cardiac arrest. *Sci Rep* 2017; 7:16575.
225. Solberg R, Enot D, Daigner HP, Koal T, Scholl-Bürgi S, Saugstad OD, Matthias K. Metabolomic analyses of plasma reveals new insights into asphyxia and resuscitation in pigs. *PLoS One.* 2010; 5: e9606.
226. Chinopoulos C. Succinate in ischemia: Where does it come from? *Int J Biochem Cell Biol.* 2019; 115:105580.
227. Lukyanova LD, Kirova YI, Germanova, EL. The Role of Succinate in Regulation of Immediate HIF-1 α Expression in Hypoxia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine,* 2018; 164(3): 298–303.
228. Zhang J, Wang YT, Miller JH, Day MM, Munger JC, Brookes PS. Accumulation of succinate in cardiac ischemia primarily occurs via canonical krebs cycle activity. *Cell Rep.* 2018; 23: 2617 - 2628.

229. Hunter FE. Anaerobic phosphorylation due to a coupled oxidation-reduction between alpha-ketoglutaric acid and oxalacetic acid. *J. Biol. Chem.* 1949; 177: 361–372.
230. Kiss G, Konrad C, Pour-Ghaz I, Mansour JJ, Nemeth B, Starkov AA, et al. Mitochondrial diaphorases as NAD(+) donors to segments of the citric acid cycle that support substrate-level phosphorylation yielding ATP during respiratory inhibition. *FASEB J.* 2014; 28: 1682–1697.
231. Tugtekin IF, Radermacher P, Theisen M, Matejovic M, Stehr A, Ploner K, et al. Increased ileal-mucosal-arterial PCO₂ gap is associated with impaired villus microcirculation in endotoxic pigs. *Intensive Care Med.* 2001; 27:757-766.
232. Langenberg C, Wan L, Egi M, May CN, Bellomo R. Renal blood flow in experimental septic acute renal failure. *Kidney Int* 2006; 69: 1996–2002.
233. Cossu AP, Suelzu S, Piu P, Orecchioni M, Bazzu G, Padua G. Do on- and off-pump coronary bypass surgery differently affect perioperative peripheral tissue metabolism? *Minerva Anesthesiol* 2012;78(1):26-33.
234. Sahuquillo J, Merino M-A, Sánchez-Guerrero A, Arikian F, Vidal-Jorge M, Martínez-Valverde T. Lactate and the Lactate-to-Pyruvate Molar Ratio Cannot Be Used as Independent Biomarkers for Monitoring Brain Energetic Metabolism: A Microdialysis Study in Patients with Traumatic Brain Injuries. *PLoS ONE* 9(7): e102540.
235. von Platen A, D`Souza M. Evaluation of Intrahepatic Lactate / Pyruvate Ratio As a Marker for Ischemic Complications. *Transplant Direct.* 2019; 5(12): e505
236. Kilgour E, Vernon RG. Catecholamine activation of pyruvate dehydrogenase in white adipose tissue of the rat in vivo. *Biochem J* 1987;241:415–9.
237. Kuyper AC, Mattill HA. Some aspects of citric acid metabolism. *J. Biol. Chem.* 103: 51-60.
238. Costello LC, Franklin RB. Plasma citrate homeostasis, how it is regulated, and its physiological and clinical implications. An important, but neglected, relationship in medicine. *HSOA J. Hum. Endocrinol.* 2016; 1: 5.
239. Mycielska ME, Milenkovic VM, Wetzel CH, Rümmele P, Geissler E.K. Extracellular Citrate in Health and Disease. *Curr. Mol. Med.* 2015; 15: 884–891.
240. Jha AK, Huang SC, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, Chmielewski K. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity.* 2015; 42: 419-430.
241. Williams NC, O'Neill LA. A role for the Krebs cycle intermediate citrate in metabolic reprogramming in innate immunity and inflammation. *Front. Immunol.* 2018; 9: 141.
242. Fensterheim BA, Young JD, Luan L, Kleinbard RR, Stothers CL, Patil NK, et al. The TLR4 Agonist Monophosphoryl Lipid A Drives Broad Resistance to Infection via Dynamic Reprogramming of Macrophage Metabolism. *J Immunol* 2018;200(11):3777-3789.
243. Lampropoulou V, Sergushichev A, Bambouskova M, Nair S, Vincent EE, Loginicheva E, et al. Itaconate links inhibition of succinate dehydrogenase with

- macrophage metabolic remodeling and regulation of inflammation. *Cell Metab.* 2016; 24: 158–166.
244. McBride MA, Owen AM, Stothers CL, Hernandez A, Luan L, Burelbach KR, et al. The Metabolic Basis of Immune Dysfunction Following Sepsis and Trauma. *Front Immunol* 2020;11:1–21.
245. Vary TC, Siegel JH, Nakatani T, Sato T, Aoyama H: Effect of sepsis on the activity of the pyruvate dehydrogenase complex in skeletal muscle and liver. *Am J Physiol.* 1986; 250: E634-E640.
246. Beloborodova NV, Pautova AK, Sergeev, Fedotcheva NI. Serum Levels of Mitochondrial and Microbial Metabolites Reflect Mitochondrial Dysfunction in Different Stages of Sepsis. *Metabolites.* 2019; 9 (10):196.
247. Jones AE, Shapiro NI, Trzeciak S, Arnold RC, Claremont HA, Kline JA. Lactate clearance vs central venous oxygen saturation as goals of early sepsis therapy: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2010; 303: 739-46.
248. Puskarich MA, Trzeciak S, Shapiro NI, Arnold RC, Heffner AC, Kline JA, et al. Prognostic value and agreement of achieving lactate clearance or central venous oxygen saturation goals during early sepsis resuscitation. *Acad Emerg Med.* 2012; 19: 252-258.
249. Hernandez G, Ospina-Tascón GA, Damiani LP, et al. Effect of a resuscitation strategy targeting peripheral perfusion status vs serum lactate levels on 28-day mortality among patients with septic shock: the ANDROMEDA-SHOCK randomized clinical trial. *JAMA.* 2019; 321: 654-64.
250. Hernandez G, Bellomo R, Bakker J. The ten pitfalls of lactate clearance in sepsis. *Intensive Care Med.* 2019; 45 (1): 82-85.
251. Huckabee WE. Relationships of pyruvate and lactate during anaerobic metabolism. 1. Effects of infusion of pyruvate or glucose and of hyperventilation. *J Clin Invest.* 1958; 37:244-254
252. Broder G, Weil MH. Excess Lactate: An Index of Reversibility of Shock in Human Patients. *Science.* 1964; 143:1457–1459.
253. Howell MD, Donnino M, Clardy P, Talmor D, Shapiro NI. Occult hypoperfusion and mortality in patients with suspected infection. *Intensive Care Med.* 2007 Nov; 33(11): 1892–1899.
254. Gattinoni L, Vasques F, Camporota L, Meessen J, Romitti F, Pasticci I, et al. Understanding lactatemia in human sepsis: potential impact for early management. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019; 200: 582–589.
255. Takala J, Uusaro A, Parviainen I, Ruokonen E. Lactate metabolism and regional lactate exchange after cardiac surgery. *New Horiz* 1996; 4: 483-492.
256. Mizock BA. The hepatosplanchnic area and hyperlactatemia: A tale of two lactates. *Crit Care Med.* 2001; 29 (2): 447–449.
257. Bellomo R. Bench-to-bedside review: Lactate and the kidney. *Crit Care.* 2002; 6(4): 322-326.
258. Revelly JP, Tappy L, Martinez A, Bollmann M, Cayeux MC, Berger MM, et al. Lactate and glucose metabolism in severe sepsis and cardiogenic shock. *Crit Care Med.* 2005; 33: 2235-40.

259. Myburgh JA, Higgins A, Jovanovska A, Lipman J, Ramakrishnan N, Santamaria J CAT Study Investigators. A comparison of epinephrine and norepinephrine in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2008;34:2226–2234.
260. Levy B, Sadoune LO, Gelot AM, Bollaert PE, Nabet P, Larcan A: Evolution of lactate/pyruvate and arterial ketone body ratios in the early course of catecholamine-treated septic shock. *Crit Care Med.* 2000; 28: 114-119.
261. Rimachi R, De Carvahlo FB, Orellano-Jimenez C, Cotton F, Vincent JL, De Backer D. Lactate/Pyruvate Ratio as a Marker of Tissue Hypoxia in Circulatory and Septic Shock. *Anaesthesia and Intensive Care.* 2012; 40 (3): 427-432.
262. Huckabee W. Abnormal resting blood lactate. *Am. J. Med* 1961;30: 833-839
263. Brandt S, Regueira T, Bracht H, Porta F, Djafarzadeh S, Takala J, et al. Effect of fluid resuscitation on mortality and organ function in experimental sepsis models *Crit Care.* 2009; 13(6): R186.
264. Khodakova A, Beloborodova N. Mitochondrial metabolites in the blood patients with sepsis. *Crit Care* 2007; 11 (4): P5.
265. Fedotcheva NI, Kazakov RE, Kondrashova MN, Beloborodova NV. Toxic effects of microbial phenolic acids on the functions of mitochondria. *Toxicol. Lett.* 2008; 180: 182-188.
266. Cordes T, Wallace M, Michelucci A, Divakaruni AS, Sapcariu SC, Sousa C, et al. Immunoresponsive gene 1 and itaconate inhibit succinate dehydrogenase to modulate intracellular succinate levels. *J. Biol. Chem.* 2016; 291: 14274-14284.
267. Meiser J, Kraemer L, Jaeger C, Madry H, Link A, Lepper PM, Hiller K, Schneider JG. Itaconic acid indicates cellular but not systemic immune system activation. *Oncotarget.* 2018; 9: 32098-32107.
268. Liu MS, Zhang JN. Glycolytic and tricarboxylic acid cycle intermediates in dog livers during endotoxic shock. *Biochemical medicine* 1985; 34 (3): 335-343.
269. Plummer MP, Deane AM. Dysglycemia and Glucose Control During Sepsis. *Clinics in Chest Medicine* 2016; 37(2): 309-319.
270. Ferreira FBD, dos Santos C, Bruxel MA, Nunes EA, Spiller F, Rafacho A. Glucose homeostasis in two degrees of sepsis lethality induced by caecum ligation and puncture in mice. *Int J Exp Pathol* 2017; 98: 98-40.
271. Yang S, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH, Wang P. Differential alterations in systemic and regional oxygen delivery and consumption during the early and late stages of sepsis. *J Trauma* 1999; 47: 706-12.
272. Morita Y, Chin-Yee I, Yu P, Sibbald WJ, Martin CM. Critical Oxygen Delivery in Conscious Septic Rats under Stagnant or Anemic Hypoxia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2003; 167(6): 868–872.
273. Tao W, Deyo DJ, Traber DL, Johnston WE, Sherwood ER. Hemodynamic and Cardiac Contractile Function During Sepsis Caused by Cecal Ligation and Puncture in Mice. *Shock* 2004; 21(1): 31–37.
274. Hotchkiss RS, Song SK, Neil JJ, Chen RD, Manchester JK, Karl IE, et al. Sepsis does not impair tricarboxylic acid cycle in the heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 1991; 260 (1):C50–C57.

275. Lado-Abeal J, Martinez-Sánchez N, Cocho JA, Martín-Pastor M, Castro-Piedras I, Couce-Pico ML, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-induced septic shock causes profound changes in myocardial energy metabolites in pigs. *Metabolomics* 2018; 14 (10): 131.
276. Liu Z, Yin P, Amathieu R, Savarin P, Xu G. Application of LC-MS-based metabolomics method in differentiating septic survivors from non-survivors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2016; 408 (27): 7641-7649.
277. Cerra FB. The hypermetabolism organ failure complex. *World J. Surg.* 1987; 11: 173-181.
278. Muleme HM, Walpole AC, Staples JF. Mitochondrial metabolism in hibernation: metabolic suppression, temperature effects, and substrate preferences. *Physiol Biochem Zool* 2006; 79: 474-483.
279. Fedotcheva NI, Litvinova EG, Kamzolova SV, Morguno IG, Amerkhanov ZG. Mitochondrial metabolites in tissues as indicators of metabolic alterations during hibernation. *Cryo Lett* 2010; 31: 392-400.
280. Zhao Z, Oort A, Tao Z, O'Brien WG, Lee CC. Metabolite profiling of 5'-AMP induced hypometabolism. *Metabolomics*. 2014; 10: 63-76.
281. Lei Z, Huhman DV, Sumner L.W. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *J. Biol. Chem.* 2011; 286: 25435–25442.
282. Al Kadhi O, Melchini A, Mithen R, Saha S. Development of a LC-MS-MS method for the simultaneous detection of tricarboxylic acid cycle intermediates in a range of biological matrices. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2017, 5391832.
283. Beloborodova NV, Sarshor YN, Bedova AY, Chernevskaya EA, Pautova AK. Involvement of aromatic metabolites in the pathogenesis of septic shock. *Shock* 2018, 50, 273–279.
284. Ospina-Tascón GA, Umaña M, Bermudez W, Bautista-Rincon DF, Hernandez G, Bruhn A. et al. Combination of arterial lactate levels and venous-arterial CO₂ to arterial-venous O₂ content difference ratio as markers of resuscitation in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 2015; 41: 796-805.