

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Grupo de Bioquímica Experimental y Computacional



**ACTIVIDAD MITOCONDRIAL EN PACIENTES
CRÍTICAMENTE ENFERMOS.**

Trabajo de grado presentado por:

Juan Carlos Ayala Acosta MD

Tutor:

Ludis Morales PhD

Bogotá D.C., 2018

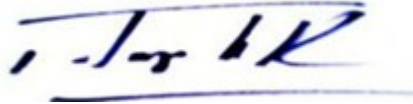
**ACTIVIDAD MITOCONDRIAL EN PACIENTES
CRÍTICAMENTE ENFERMOS**

Juan Carlos Ayala Acosta

Nota de aceptación



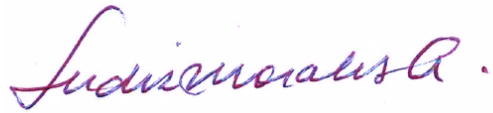
Jhon Jairo Sutachan Rubio MSc, PhD



Alba Alicia Trespacios Rangel, MSc, PhD

Decana de Facultad de Ciencias

Aprobado:



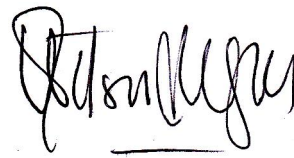
Ludis Morales PhD

Directora de tesis



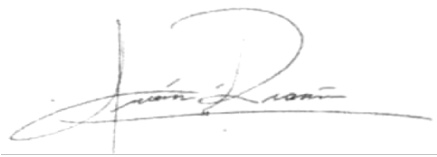
Cesar Enciso MD M. Sc.

Jurado.



Wilson Mejia M. Sc PhD

Jurado



Iván Riaño MD M.Sc.

Jurado.



Marcos López Casillas PhD

Jurado

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.	16
3.1. Problemática actual del estado crítico en el mundo	16
3.2. Respuesta metabólica al estrés	18
3.3. Función mitocondrial en respuesta inflamatoria sistémica	20
3.4. Consecuencias patológicas de la disfunción mitocondrial	24
Depleción de ATP	24
Liberación de Citocromo C y de Factor Inductor de Apoptosis	24
Especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y monóxido de carbono	25
Biogénesis mitocondrial y autofagia	27
Transporte de Oxígeno (DO ₂).....	29
4. OBJETIVOS.....	36
4.1. Objetivo General	36
4.2. Objetivos Específicos.....	36
5. METODOLOGÍA.....	37
5.1. Tipo y diseño de investigación.....	37
Criterios de Inclusión.....	37
Criterios de exclusión	37
Tamaño de la muestra.....	38
5.2. Materiales y métodos.	38
Aislamiento de linfocitos por FICOLL	38
5.3 Analisis de resultados y estadístico.....	38
5.4 Hipotesis de Investigacion.....	39
6. RESULTADOS	41
6.1. Análisis de resultados por objetivo	48
7. DISCUSIÓN.....	58
8. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	66
9. BIBLIOGRAFÍA.....	75
10. ANEXOS	85

10.1. DROGAS CON TOXICIDAD MITOCONDRIAL 85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Presión arterial de oxígeno desde la atmósfera hasta la mitocondria	29
Figura 2. Curva de disociación de la hemoglobina	31
Figura 3. Relación entre el aporte de O ₂ (DO ₂) y el consumo (VO ₂)	31
Figura 4. Saturaciones venosas promedio individuales de cada tejido.....	33
Figura 5. Promedios del logaritmo natural de la variable de consumo de oxígeno, corregidos por las covariables evaluadas para las tres condiciones de los pacientes (No sepsis-caso, No sepsis-control y Sepsis-caso). Promedios con la misma letra son estadísticamente igual es con $p < 0.05$ bajo prueba de <i>t</i> protegida por Fisher.....	49
Figura 6. Modelo de pronóstico entre la edad de los pacientes y la producción de SUPEROXIDO, seleccionado mediante procedimiento Stepwise y $p = 0.15$	50
Figura 7. Promedios de la variable potencial de membrana, corregidos por las covariables evaluadas para las tres condiciones de los pacientes (No sepsis-caso, No sepsis-control y Sepsis-caso). Promedios con la misma letra son estadísticamente igual es con $p < 0.05$ bajo prueba de <i>t</i> protegida por Fisher.....	52
Figura 8. Biplots para los componentes principales 1, 2, 3 y 4, de las variables PCR (PCR), lactato (LAC), saturación venosa de oxígeno (SVO ₂) consumo de oxígeno (CONO ₂), potencial de membrana (DYM) y producción de oxígeno (PO ₂); a) componente 1 contra componente 2; b) componente 1 contra componente 3; c) componente 1 contra componente 4. Las variables que representan cada componente están resaltadas con un óvalo: ◊ componente 1; ◊ componente 2; ◊ componente 3; ◊ componente 4.	54
Figura 9. Activación mitocondrial por alarminas en la respuesta inflamatoria	67
Figura 10. Papel de los mROS en la respuesta inflamatoria sistémica. Bases celulares para el Inmunometabolismo	69

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos demográficos.....	42
Tabla 2. Datos de Función mitocondrial.....	43
Tabla 3. Mediciones clínicas y de función mitocondrial en tiempo de pacientes críticos	44
Tabla 4. Variables clínicas y de función mitocondrial de pacientes que fallecieron.....	45
Tabla 5. Datos demográficos y variables clínicas y de función mitocondrial de los pacientes críticos vivos y los que fallecieron.....	47
Tabla 6. Análisis de covarianza para evaluar el efecto del estado de los pacientes (No sepsis-caso, No sepsis-control y Sepsis-caso) y las covariables sexo, IMC y edad sobre el consumo de oxígeno ...	48
Tabla 7. Análisis de regresión entre las variables consumo de oxígeno, IMC, sexo y edad en función de producción de superóxido.....	50
Tabla 8. Análisis de covarianza para evaluar el efecto del estado de los pacientes (No sepsis-caso, No sepsis-control y Sepsis-caso) y las covariables sexo, IMC y edad sobre el potencial de membrana	52
Tabla 9. Componentes principales de los datos de PCR (PCR), lactato (LAC), saturación venosa de oxígeno (SVO2) consumo de oxígeno (CONO2), potencial de membrana (DYM) y producción de superóxido (PO2).....	53
Tabla 10. Autovectores de los componentes principales de las variables PCR (PCR), lactato (LAC), saturación venosa de oxígeno (SVO2) consumo de oxígeno (CONO2), potencial de membrana (DYM) y producción de oxígeno (PO2). Aparecen solo los valores absolutos más altos para cada componente principal (PRIN)	54

LISTA DE SIMBOLOS Y GLOSARIO

$\Delta\Psi$ M: Potencial de membrana mitocondrial.

mtVO₂: Consumo de Oxígeno mitocondrial.

mROS: Especies reactivas de oxígeno mitocondriales.

SvO₂: Saturación Venosa de Oxígeno.

C-RP: Proteína C Reactiva.

FOM: Falla Orgánica Multisistémica.

SIRS: Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment

APACHE: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation.

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno.

RNS: Especies Reactivas de Nitrógeno.

ATP: Adenosina Tri Fosfato.

DAMPs: Danger Associated Molecular Patterns.

PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns.

LPS: Lipopolisacaridasa.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

TNF: Tumor Necrosis Factor.

HMGB1: High Mobility Group Box 1.

NF- κ B: Nuclear Factor Kappa Beta.

IL: Interleuquinas.

mtDNA: Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial.

PRR: Pattern Recognition Receptor.

FAD: Flavin Adenin Dinucleotide

NAD: Nicotinamide Adenin Dinucleotide

NO: Oxido Nítrico.

CO: Monóxido de Carbono

RESUMEN

La respuesta inflamatoria sistémica se instaura en respuesta a un estímulo agresor tanto infeccioso como traumático, bajo la percepción celular de señales de peligro. Esta respuesta está compuesta por tres elementos fundamentales, el sistema neurológico, endocrino e inmunológico, dividida en dos respuestas, una innata mediada por células inflamatorias tales como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas y una respuesta adaptativa liderada por Linfocitos. Esta respuesta impone al individuo una carga súbita y elevada de demanda energética que busca contener el estímulo agresor y según el caso en favorecer una adecuada cicatrización. Del desarrollo homogéneo de la misma se obtienen adecuados desenlaces, entendidos como una alta tasa de sobrevida y especialmente con una adecuada calidad de vida.

Esta situación induce al paciente a una condición crítica, en donde la funcionalidad de la mayoría de los órganos corporales es llevada a su límite, favoreciendo la aparición de Falla Orgánica Mulsistémica. Este fenómeno es responsable de una alta tasa de mortalidad, con cifras cercanas al 30%, en las unidades de cuidado intensivo en Colombia y en el mundo entero. Estas cifras reflejan por qué la enfermedad crítica se considera un problema de salud pública, en donde los costos de atención son exageradamente altos y a pesar de los esfuerzos diagnósticos y terapéuticos los desenlaces continúan siendo desfavorables. La investigación científica considera actualmente que el denominador común de este problema a nivel celular es la disfunción mitocondrial. Razón por la cual la mayoría de las investigaciones se centran en intentar determinar su estado en enfermedad crítica e identificar todos los aspectos relacionados que influyan en su funcionalidad. Este trabajo investigativo, evaluó en tiempo real y en vivo, la función mitocondrial en Linfocitos de sangre periférica, en pacientes críticos sometidos a estímulos inflamatorios infecciosos y no infecciosos. Esta medición de la función mitocondrial se centró en tres aspectos claves de su función en la respuesta inflamatoria, como lo es la producción de especies reactivas de oxígeno (mROS), el consumo de oxígeno mitocondrial (mtVO₂) y el potencial de membrana ($\Delta\Psi M$) por citometría de flujo. Estas tres variables citométricas se compararon y relacionaron con variables clínicas rutinarias tales como Lactato

sérico, la proteína c reactiva sérica (C-RP) y la saturación venosa de Oxígeno (SvO₂). Este es, en nuestro conocimiento, el primer estudio que evalúa en tiempo real y *in vivo* la función mitocondrial en células inflamatorias de pacientes en cuidado crítico. En esta cohorte de pacientes se encontró que en las primeras 24 horas post injuria la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales es la característica principal del estrés inflamatorio a nivel celular, teniendo dos funciones principales: Una función de defensa celular y segunda y aun más importante, una función de señalización celular. La producción de mROS se constituye como un marcador inflamatorio agudo, con una relación estadísticamente significativa con escalas clínicas de falla orgánica como el SOFA, y con marcadores clínicos rutinarios de inflamación como el Lactato sérico. A partir de los resultados obtenidos, los esfuerzos investigativos futuros deben concentrarse en evaluar en tiempo real y *in vivo*, cómo se encuentran los factores de regulación mitocondrial en el paciente crítico. Es promisorio evaluar *in vivo* igualmente, la actividad de Sirtuinas y AMPK en estos pacientes y de esta forma complementar el cuadro de actividad mitocondrial *in vivo* en pacientes críticos.

Palabras clave: Función mitocondrial, falla mitocondrial, cuidado crítico, sepsis, falla orgánica multisistémica, mROS, Lactato.

1. INTRODUCCIÓN

La disfunción orgánica múltiple secundaria a la respuesta metabólica al estrés es responsable de las altas tasas de mortalidad de los pacientes críticamente enfermos cuyas cifras son cercanas al 30% en Colombia y en el mundo (Meléndez et al., 2011; Vincent et al., 2006). El concepto de respuesta inflamatoria sistémica, describe la respuesta fisiopatológica a un evento infeccioso, traumático o quirúrgico, siendo su principal objetivo maximizar la capacidad de cicatrización y de defensa del organismo (Balk, 2014). El origen y naturaleza de esta condición varía dramáticamente entre los individuos haciendo el diagnóstico y pronóstico difíciles de establecer, debido especialmente al pobre entendimiento de su compleja fisiología, a la variedad de los pacientes, y a la heterogeneidad temporal en el transcurso de la enfermedad. La respuesta inflamatoria sistémica es una condición clínica de gran relevancia; no solo porque su incidencia se incrementa anualmente, afectando a más de 750000 pacientes anualmente en Estados Unidos (Angus DC, 2010), sino porque acrecienta considerablemente los costos en salud, consumiendo un promedio diario de 200000 USD (Alvear et al., 2013); no obstante, ahora bien el fenómeno de respuesta inflamatoria sistémica es fisiológico y la clave está en determinar su causa, especialmente si es de origen infeccioso. A pesar de estos altos gastos, los avances que se han logrado para mejorar los desenlaces siguen siendo mínimos.

Los hallazgos a nivel celular sugieren que el problema se deriva de la utilización del oxígeno, fenómeno hoy conocido como hipoxia citopática, que involucra y establece a la mitocondria como el principal organelo celular responsable de la falla energética, siendo éste el compromiso funcional más característico en los pacientes críticos (Fink, 2001). Es entonces, la disfunción bioenergética la principal causa de los pobres desenlaces. En la práctica clínica, aunado al estado clínico del paciente, el monitoreo continuo de biomarcadores inflamatorios es rutinario, y a partir de éstos se diseñan escalas de severidad y pronóstico. No obstante, el monitoreo de estos biomarcadores tales como TNF alfa, IL 1-6-8-10, Procalcitonina, Proteína C Reactiva PCR y Lactato sérico ha mostrado resultados contradictorios en términos de sensibilidad, especificidad y efectividad tanto en adultos como en población pediátrica (Rivers et al., 2013).

La ausencia de biomarcadores específicos que predigan precozmente el inicio temprano, progresión y severidad de la respuesta inflamatoria ha tenido un impacto negativo en la habilidad médica para desarrollar terapias efectivas dirigidas a mejorar la morbilidad y mortalidad de los pacientes críticamente enfermos. Surge en este aspecto la necesidad de monitorear la función mitocondrial en esta población de pacientes como factor promisorio más específico. Algunos estudios en modelos animales con sepsis han revelado alteraciones en la estructura y en la función mitocondrial (Lee et al., 2013). En humanos, a partir de mediciones estructurales de Citocromo C y ADN mitocondrial (Kung et al., 2012) se ha sugerido una asociación entre falla estructural y riesgo aumentado de complicaciones; sin embargo, la medición indirecta de la actividad mitocondrial hecha de esta forma es inexacta y se hace necesario, en consecuencia, investigar y evaluar de forma directa la funcionalidad mitocondrial.

En este trabajo se propuso la evaluación de tres aspectos básicos de la función mitocondrial como son, el consumo de oxígeno, potencial de membrana ($\Delta\Psi M$) y la producción de ROS en linfocitos en una cohorte de pacientes críticamente enfermos; la evaluación y comparación de estos parámetros con los biomarcadores tradicionales inflamatorios, permitirán avanzar en el conocimiento del grado de alteración de estas variables en enfermedad crítica y su capacidad pronosticada de severidad y de mortalidad. Se espera que el presente proyecto permita esclarecer si la medición de la función mitocondrial por citometría de flujo es una herramienta sensible y específica para determinar pronóstico de sobrevida en pacientes críticamente enfermos y si se puede constituir en una herramienta clínica de uso rutinario en esta población de pacientes.

Por último, este proyecto servirá para la formación doctoral de un estudiante médico, con práctica primordialmente clínica, permitiéndole no solo adquirir destrezas de laboratorio y fortalecer su formación científica, sino que especialmente permitirá la integración de la ciencia básica e investigativa con la práctica clínica rutinaria, aspecto muy poco establecido en Colombia.

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Uno de cada tres pacientes hospitalizados está en condición crítica. La condición crítica se define como la condición de un paciente en la que existe alto riesgo de descompensación fisiológica. Esta condición requiere de monitoreo constante, presentando una alta posibilidad de intervención inmediata y es debida en gran parte a una patología infecciosa. La determinación de las tendencias de los desenlaces en esta población de pacientes se considera actualmente un problema importante de salud pública.

La sepsis, definida como la presencia de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica más un foco infeccioso confirmado, afecta a uno de cada tres pacientes en las unidades de cuidado intensivo (Vincent et al., 2006) y es una de las diez principales causas de muerte en el mundo con costos anuales que ascienden a 24.3 millones de USD (Stevenson et al., 2014). La condición crítica genera en el organismo una respuesta inflamatoria sistémica diseñada para responder en contra del estímulo agresor y facilitar el proceso de cicatrización de los tejidos lesionados (Balk R, 2014). Esta respuesta inflamatoria involucra la participación de tres fenotipos: el sistema nervioso, el sistema endocrinológico y el sistema inmunológico quienes potencian el sistema inmune (Aller et al., 2004). Una respuesta inflamatoria sostenida y no controlada compromete otras poblaciones celulares del huésped promoviendo falla orgánica multisistémica, entendida como la alteración funcional de dos o más órganos (Fry et al., 1980). La presencia de Falla Orgánica Multisistémica (FOM) es responsable de las altas tasas de mortalidad encontradas en esta población de enfermos, con valores promedio de 30% (Vincent et al. 2006).

La demanda súbita e incrementada de energía forjada por estos grupos celulares, aumenta el consumo de oxígeno para satisfacer las demandas energéticas, forzando a la mitocondria (central energética celular) a un máximo rendimiento funcional, razón por la cual actualmente se plantea que la alteración de su función o de su capacidad de utilización del

oxígeno (fenómeno hoy conocido como Hipoxia citopática) es responsable de la falla energética, compromiso funcional que es característico en los pacientes críticos (Fink, 2001).

Los mecanismos responsables de esta disfunción mitocondrial son motivo de continuo estudio, y se identifica como uno de los principales responsables el papel del transporte y consumo de oxígeno. Éste, ve comprometido su normal funcionamiento en lo referente a la producción de radicales libres de oxígeno, lo que condiciona la alteración y desacoplamiento de su membrana promoviendo aún más la muerte celular (Koslov et al., 2011). Este papel protagónico de la mitocondria en la respuesta inflamatoria, apoya la necesidad de evaluar su función en condiciones de estrés.

En la práctica clínica rutinaria, adicional a la condición clínica del paciente, se recurre a la medición de biomarcadores séricos para determinar el grado de inflamación y el compromiso sistémico presente, a partir de lo cual se establecen criterios pronósticos de complicaciones y mortalidad (Jones et al., 2006); sin embargo, estos marcadores no predicen, con altas cifras de sensibilidad y mortalidad, estos negativos desenlaces (Jaehne et al., 2013). Estos resultados se explican por la heterogeneidad de los pacientes críticos y la heterogeneidad temporal de su enfermedad. Estas razones también evidencian la necesidad de contar con herramientas de evaluación rápidas y confiables que sean fácilmente aplicables.

En el 2013, Jeger y colaboradores revisaron toda la literatura existente desde 1964 al 2012 referente a la función mitocondrial en escenarios de sepsis tanto en modelos animales experimentales como en estudios clínicos. De los 76 artículos incluidos en esta revisión, once se realizaron en humanos: cinco de ellos evaluaron la función mitocondrial en biopsias de tejidos (músculo e hígado) y los otros seis lo hicieron en muestras sanguíneas encontrando una considerable variabilidad entre los resultados reportados con función mitocondrial normal, aumentada o disminuida. Estas discrepancias se atribuyen a la diversidad de especies, tejidos investigados y en el grado de injuria.

Otros estudios reportan también diversidad en la función mitocondrial, la cual también se explica por las diferentes técnicas usadas para la medición de la función mitocondrial en tejidos o en mitocondrias aisladas (Singer et al., 1999). Esta variabilidad de resultados no permite formular conclusiones sólidas y obliga a proponer diferentes métodos de medición de su función, idealmente en humanos con inflamación activa.

La medición de la función mitocondrial en tejidos de órganos claves en la inflamación como el corazón y el hígado requiere de la obtención de biopsias en vivo lo cual implica un riesgo adicional para el paciente. Además, no existe un sustento ético suficiente para que se justifique este procedimiento como una intervención diagnóstica/terapéutica en medicina. Las anteriores consideraciones éticas son las que obligan a explorar otras fuentes para la obtención de otro material biológico para estudio como sangre periférica.

En el presente estudio se propuso evaluar la función mitocondrial en linfocitos, obtenidos a partir de muestras de sangre periférica de pacientes sometidos a diferentes estímulos inflamatorios; se evaluaron tres aspectos fundamentales de la función mitocondrial en respuesta inflamatoria, como son el consumo de oxígeno, potencial de membrana ($\Delta\Psi_M$) y la producción de anión superóxido mediante citometría de flujo, tecnología bifásica usada de forma rutinaria en el diagnóstico y seguimiento de múltiples patologías como leucemias, granulomatosis crónica y SIDA (Overview of Flow Cytometry. Current Protocols in Immunology. Supl. 20. 1996). La función mitocondrial en linfocitos es clave; dado que este grupo celular tiene un papel protagónico en la respuesta inflamatoria al estrés especialmente en la fase adaptativa, su activación y diferenciación depende exclusivamente del metabolismo energético (Lenz et al., 2007). Este trabajo pretende proporcionar una herramienta adicional de evaluación y seguimiento de los pacientes críticos que permita establecer pronósticos más exactos, dirigir terapias médicas e incluso plantear la limitación de esfuerzos terapéuticos más oportunamente, factores que contribuirían con un mejor uso de los recursos económicos asociados a la atención hospitalaria.

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.

3.1. Problemática actual del estado crítico en el mundo

En Colombia, las cifras de mortalidad global en las unidades de cuidado intensivo superan el 20% (Meléndez et al 2011), siendo la principal causa la patología infecciosa seguida por la traumática; estas cifras reflejan la complejidad de esta población de pacientes en el mundo y en nuestro medio, cuyos costos de atención en Latinoamérica en promedio diario oscilan entre 700 y 1000 USD, y el 27% del total de los recursos son utilizados en pacientes que finalmente mueren (Alvear et al. 2011). Los intentos para limitar los recursos generan serias inquietudes éticas por la necesidad de racionalizar el cuidado intensivo y la evidencia de costo-efectividad en pacientes críticamente enfermos es muy débil, siendo muy difícil implementar y justificar éticamente estudios aleatorizados en pacientes en cuidado intensivo que solventaran la actual evidencia (Edbrooke et al., 2011).

La disfunción orgánica que se desarrolla en el curso de una respuesta inflamatoria sistémica se ha considerado por largo tiempo como la consecuencia de una alteración de la disponibilidad de oxígeno, secundaria a alteraciones hemodinámicas micro y macro circulatorias; sin embargo, en la última década el concepto de disfunción mitocondrial asociado con la producción de mediadores pro inflamatorios durante la respuesta inflamatoria del huésped a una invasión por microorganismos o al daño celular traumático, ha ganado progresivamente mayor atención (Singer et al., 1999). Es ampliamente aceptado que el compromiso de la función mitocondrial contribuye de forma significativa con la falla orgánica de los pacientes críticamente enfermos; no obstante, en el escenario clínico las estrategias que mejoren el diagnóstico y promuevan modalidades terapéuticas más eficientes siguen siendo escasas y deficientes.

La respuesta inflamatoria desencadenada por estímulos infecciosos o traumáticos está encaminada a controlar el estímulo agresor y a proveer las herramientas necesarias para cicatrizar el tejido lesionado. Esta respuesta obliga a una movilización rápida y masiva de

diversos grupos celulares, aumentando la demanda energética (Maclver et al., 2013). Las células de los pacientes en respuesta inflamatoria sistémica son incapaces de mantener la homeostasis del metabolismo intermediario y consecuentemente desarrollan una falla energética que promueve muerte celular amenazando la vida del individuo (Hotchkiss et al. 1992).

El metabolismo oxidativo es altamente energético comparado con la glicólisis anaerobia, por lo tanto, la viabilidad de las células dependientes de alta energía como neuronas, miocitos y/o hepatocitos entre otros, dependen directamente de un aporte continuo de oxígeno. Son varios los factores que limitan el aporte de oxígeno a los tejidos de estos pacientes, entre los cuales se pueden mencionar, el daño pulmonar, caída de la precarga y el gasto cardiaco por la permeabilidad aumentada y vasodilatación presente, disminución en la función ventricular izquierda secundaria al compromiso de la contractibilidad cardiaca y por la incrementada formación de micro trombos por la lesión eritrocitaria y la activación local de plaquetas (Hotchkiss et al., 1992). Por estos factores, la célula prioriza su funcionamiento en la producción de energía y es la mitocondria la responsable de lograr este cometido, para lo cual recurre al oxígeno disponible, aumentando su demanda como su utilización, con el fin de evitar ingresar a procesos anaeróbicos más costosos desde el punto de vista metabólico.

La disfunción mitocondrial por alteración en la producción de energía o por desacoplamiento de su membrana se ha asociado con pobres desenlaces en pacientes con sepsis y con FOM (Brealy et al 2002). Bajo este concepto, el interés clínico es la valoración del aporte de oxígeno a los tejidos para determinar la relación entre el aporte y su tasa de utilización, y de esta manera, establecer el grado de demanda metabólica, permitiendo una más completa interpretación clínica y biológica del paciente. Esta información a su vez permite establecer metas de reanimación en estados de choque, mientras que en patología tumoral permite predecir respuesta de la terapia (radioterapia específicamente) (Kizaka et al 2009); en cuidado crítico, permite establecer la respuesta al tratamiento, así como el pronóstico a corto y a largo plazo.

Hallazgos como anormalidades en el flujo micro vascular (Ince et al. 1999), disminución del consumo (Kreymann et al. 1993) y tensiones elevadas de oxígeno (Rosser et al. 1995), sugieren que el problema se deriva en la utilización celular de oxígeno más que en el aporte del mismo *per se*. La hipótesis acuñada por Fink (2001) bajo el término **Hipoxia citopática**, que describe una falla intrínseca en la respiración celular y una alteración del consumo de oxígeno, apoyan el concepto de la hipoxia citopática mitocondrial como principal factor en sepsis, la cual

postula que el compromiso de la fosforilación oxidativa mitocondrial reduce la producción de Adenosina Trifosfato (ATP) y potencialmente induce FOM (Skrupky et al., 2011; Fink et al., 1995). El mecanismo permanece aún sin esclarecer en su totalidad, pero involucra un desacoplamiento de la producción de ATP del metabolismo aeróbico y/o una inhibición de alguno o de todos los cinco complejos proteicos enzimáticos implicados en la fosforilación oxidativa y en el aumento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) o en las especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Andrades et al., 2009).

La mitocondria, considerada la central energética de la célula, convierte el 90% del oxígeno disponible en agua mediante una serie de reacciones con una producción intrínseca de energía (ATP) en el proceso; adicional a su papel en la producción de energía, la mitocondria regula diversas reacciones fisiológicas y patológicas, incluyendo muerte celular (apoptosis), la generación y aclaramiento de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sheu et al., 2006) y regula de forma importante la dinámica del calcio intracelular, el cual a su vez es un sensor intracelular de las concentraciones de Oxígeno (Davidson et al., 2007). Por tanto, el papel protagónico de la mitocondria en la respuesta inflamatoria, apoya la necesidad de evaluar su función en condiciones de estrés.

Desde hace más de 30 años se han reportado anomalías mitocondriales tanto estructurales como funcionales (Singer et al 1999). Característicamente se observa una considerable variabilidad entre los resultados reportados por los diferentes estudios, presentando una función mitocondrial normal, aumentada o disminuida. Estas discrepancias se atribuyen a la diversidad de especies, tejidos investigados y al grado de injuria, así como en la presencia o no de reanimación. Además de los factores anteriormente mencionados, esta diversidad de resultados también se debe a las diferentes técnicas usadas para la medición de la función mitocondrial en tejidos o en mitocondrias aisladas (Singer et al., 1999; Jeger et al., 2013). Optimizar las intervenciones terapéuticas impresiona como la mejor estrategia para disminuir costos de atención, pero estas intervenciones dependen de la adecuada valoración e interpretación del paciente desde su ingreso al hospital o a la unidad de cuidado intensivo, razón por la cual es necesario implementar otras herramientas de valoración y estratificación de riesgo, adicionales a las clínicamente convencionales (O'Brien et al. 2013).

3.2.Respuesta metabólica al estrés

La infección, el trauma y el daño tisular desencadenan una respuesta inflamatoria que sirve como un mecanismo de reparo posterior a la injuria para controlar el sangrado, prevenir infecciones, remover el tejido lesionado y reemplazarlo con uno nuevo (Weidenbusch et al., 2012). Esta respuesta inflamatoria involucra varios sistemas corporales que están íntimamente conectados formando una compleja red de inflamación y se desarrolla a través de la expresión de tres sucesivos y superpuestos fenotipos: endocrinológico, inmunológico y neurológico encaminados a potenciar la respuesta inmune (Aller et al., 2004).

La respuesta inmune es regulada por células presentadoras de antígeno como macrófagos/monocitos y células dendríticas que componen el sistema inmune innato y por linfocitos (T Helper como citotóxicos) que son constituyentes del sistema inmune adaptativo (Lenz et al., 2007).

El grado de respuesta varia en magnitud según el estímulo agresor y puede resultar en un daño adicional a las células del huésped lo que favorece el desarrollo de FOM (Fry et al., 1980). Es un proceso dinámico que es conducido por numerosos mediadores denominados alarminas las cuales son señales de peligro para el huésped, originados tanto por productos de microorganismos como por productos de células traumatizadas, necróticas o estresadas que activan a los sistemas inmunes tanto innato como adaptativo (Matzinger et al. 1994). Estas alarminas, también conocidas como patrones moleculares de peligro o patógeno, (DAMPs: productos celulares o PAMPs: productos de microorganismos. siglas en inglés) (Bianchi et al., 2007) son moléculas generadas por la superficie de microorganismos o productos celulares liberados por daño celular.

La molécula asociada a patógenos más conocida es la Lipopolisacaridasa (LPS) y las moléculas asociadas a peligro más conocidas son las proteínas de la caja del grupo de alta movilidad (HMGB1: en inglés), la interleuquina 1 α , el DNA mitocondrial (mtDNA) y las especies reactivas de oxígeno mitocondriales (mROS). Ellas son reconocidas por un grupo de receptores de superficie denominados receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs: en inglés) (Aderem et al., 2000).

Los PRRs son proteínas expresadas por las células del sistema innato y se clasifican de acuerdo a su especificidad de ligando, función y localización. Basados en su función, estos PRRs se dividen en receptores endocíticos o de señalización. La lista de PRRs que censan DAMPs y PAMPs es extensa y están agrupadas en 4 familias: receptores Toll-Like, receptores

de dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD), receptores de Lectina del tipo C (CLRs) y receptores del gen inducible de ácido retinoico (RLRs) (Kerrigan et al., 2010).

La activación de PRRs por parte de las alarminas inducen la expresión de factores de transcripción nuclear como el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- κ) y β la proteína activadora 1 (AP-1) con la subsecuente producción de citoquinas pro inflamatorias, que incluye factor de necrosis tumoral (TNF α), Interleuquina 1 (IL-1), IL-6, IL8 (Akira et al., 2007), quienes a su vez activan células Th0 Cd4 +, del sistema adaptativo, células que son bipotenciales y se pueden diferenciar en los subtipos Th1 o Th2. Las respuestas Th (Th 1 pro inflamatoria/ th2 anti inflamatoria) son dependientes de la activación de factores activadores de la transcripción de la señal (STAT: en inglés) 4 y 6 respectivamente (STAT4 y STAT6) (Franchimont et al., 2000).

3.3.Función mitocondrial en respuesta inflamatoria sistémica

La mitocondria es un organelo dinámico de doble membrana implicado en un amplio rango de procesos celulares, incluyendo la generación de ATP, la muerte celular programada, la homeostasis del calcio, la producción de ROS y la biosíntesis de aminoácidos, lípidos, nucleótidos, así como del grupo hem. Aunque la mitocondria posee su propio genoma, ADN mitocondrial (mtDNA), que codifica 13 proteínas de la maquinaria de la fosforilación oxidativa, 2 ARNs y 22 ARN de transferencia, la mayoría de sus 1500 proteínas de su proteoma son codificadas por el núcleo (Bonawitz et al., 2006). Estas proteínas, además de participar en la fosforilación oxidativa y en otros procesos metabólicos, también están involucradas en la replicación y expresión del mtADN, por lo tanto, la coordinación entre el genoma nuclear y mitocondrial es esencial para el ensamblaje y función de la cadena mitocondrial. Esta cadena mitocondrial es la responsable de la regulación de la dinámica mitocondrial (movimiento y regulación de la morfología mitocondrial: fusión –fisión) (Soubannier et al., 2009). La dinámica mitocondrial regula casi todos los aspectos de su biología y está influenciada por una gran variedad de señales metabólicas y celulares. De hecho, la mitocondria es el ente energético más importante dentro de las células eucariotas, encargado de producir aproximadamente el 90% de energía química (ATP) en condiciones aeróbicas (McBride et al., 2006).

Las membranas mitocondriales (interna y externa) le permiten tener un microambiente controlado en cuanto a lo que permea o no, y facilitan la eficiente captación de gran cantidad de sustratos oxidables. Dentro de la mitocondria, los electrones son extraídos de estos sustratos en forma de FADH₂ y NADH, los cuales luego se transportan a través de 4 complejos que se encuentran ubicados a lo largo de la membrana interna mitocondrial. El transporte de estos

electrones se asocia con la extrusión de protones y la generación de un gradiente electroquímico (diferencia de PH y carga eléctrica) también llamado potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_M$); generado gracias a la impermeabilidad que la Cardiolipina le otorga a la membrana interna mitocondrial. Posteriormente, estos protones pueden difundirse a través del complejo ATP-sintasa (Complejo V) el cual permitirá finalmente la transformación de energía electroquímica en energía química (ATP). De manera inherente, todo el anterior proceso de síntesis energética está acoplado a la respiración celular, y depende de la presencia de oxígeno. En consecuencia, medir el consumo de oxígeno y $\Delta\Psi_M$ podrían informar de manera directa la eficiencia del metabolismo mitocondrial. (Moreno et al., 2007).

Es importante mencionar que de manera intrínseca (a través de los complejos I y III) el sistema de transporte de electrones produce ROS (moléculas altamente reactivas debido a la presencia de electrones no apareados) las cuales pueden producir daño en el DNA, oxidación de lípidos, proteínas etc. En particular, los complejos I y III producen el anión superóxido (O_2^-), resultado de la reacción del oxígeno con un electrón “fugado” de la cadena de transporte. Como este anión superóxido puede ser partícipe del estrés oxidativo responsable de la disfunción orgánica múltiple, cuantificar esta ROS podría ser de utilidad pronóstica y/o diagnóstica (Bulguer et al., 2001; Visser et al., 2011).

En el contexto de enfermedad crítica, las funciones mitocondriales más importantes son la fosforilación oxidativa y los procesos de señalización relacionados con las ROS. La inhibición de la fosforilación oxidativa y la producción de ATP, alteran la homeostasis iónica, específicamente la homeostasis del Ca^{2+} , generando una producción excesiva de ROS tanto mitocondriales como de otros tejidos (Victor et al., 2009). Adicionalmente, la morfología mitocondrial y su dinámica se ve comprometida, llevando a una fragmentación de la cadena mitocondrial (Karbowski et al., 2003).

Un número importante de estudios sugieren que la preservación de la homeostasis e integridad mitocondrial está relacionada directamente con la protección celular bajo condiciones de estrés celular. Específicamente, la producción de ROS se establece como la responsable de la disfunción mitocondrial, jugando un papel importante en el desarrollo de mal funcionamiento celular y falla orgánica inducida por mediadores inflamatorios e hipoxia (Zapelini et al., 2008; Bulua et al., 2011; Kuznetsov et al., 2011). La actividad de la fosforilación oxidativa está controlada por el substrato, disponibilidad de ADP y por la

composición específica de los supercomplejos respiratorios en la mitocondria (Huttemann et al., 2007).

Otros niveles de control incluyen regulación alostérica, fosforilación reversible y otras formas de modificación post traduccional. Se ha propuesto que la fosforilación es de especial importancia en el control de la función mitocondrial (Pagliarini et al., 2006). La mejor evidencia de este modo de regulación es la presencia de la Protein kinasa A (PKA) que afecta la actividad de varias enzimas de la fosforilación, sirviendo de modulador de la generación de ATP y ROS (Cin-Perez et al., 2009). Un gran interrogante es cómo los estímulos patológicos se comunican con la mitocondria afectando su función y cómo es la respuesta mitocondrial para organizar la respuesta celular a estas condiciones de estrés.

Se ha propuesto a la proteína P66SHC (Src Homology 2 Domain Containing Transforming Protein) como un posible candidato, cuya acción directa promueve la producción de ROS bajo condiciones de estrés celular. En este proceso, la proteína citoplasmática se transloca a la mitocondria en un mecanismo que compromete la protein kinasa C (PKC) y la prolil-isomerasa 1 (Pin-1) (Georgio et al., 2005; Pinton et al., 2007). Experimentos de ablación génica, han resaltado los beneficios de silenciar P66SHC en diferentes estados patológicos, como envejecimiento e injuria por reperfusión (Pellegrini et al., 2009). En condiciones de estrés, la comunicación mitocondria-núcleo es importante para asegurar una adecuada respuesta celular. También, la expresión de genes codificados en el núcleo es fundamental para la síntesis de proteínas mitocondriales y la biogénesis mitocondrial por mecanismos que incluyen: PGC 1- α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alfa), Factor Respiratorio Nuclear (NRF: en inglés) y el factor A de transcripción mitocondrial (mtTFA). Notablemente, la depleción de ATP activa la biogénesis mitocondrial vía AMPK (AMP activated protein kinase) (Canto et al., 2010).

Más allá de la producción de ROS, considerada como uno de los principales mecanismos de defensa celular, la mitocondria también está implicada en otras vías de inflamación. Durante la infección viral, los receptores similares a RIG-I (RLRs) se anclan al ARN viral facilitando su interacción con el adaptador mitocondrial viral (MAVS: en inglés), impulsando la formación de Interferón tipo 1 (Saitoh et al., 2010). Sin embargo, con la pérdida de la regulación de estos procesos por compromiso mitocondrial, tanto por mutaciones como por daño estructural, se observa un incremento en la producción de ROS y el estrés celular no se puede resolver de forma efectiva. De este modo, la mitocondria es considerada como un

importante mediador del estado pro inflamatorio, participando a través de la modulación de la inmunidad innata por la vía de señalización sensible al estado de óxido reducción (REDOX) o por activación directa de un complejo de estructuras proteicas, denominado *inflamósoma*, el cual activa a la Caspasa -1, permitiendo el clivaje y activación de precursores inactivos de Interleuquina 1B e IL-18 (Strowig et al., 2012).

Adicionalmente, ambas vías (REDOX e Inflamósoma) pueden en conjunto activar citoquinas inflamatorias, sobre estimulando la respuesta inflamatoria (Escames et al., 2011). Asimismo, un gran número de mediadores inflamatorios, incluidos TNF α e IL1 β , pueden inducir daño de la función mitocondrial ya que disminuyen la actividad del complejo I, disminuyen la producción de ATP y alteran el potencial de membrana (Lopez-Armada et al., 2006; Maneiro et al., 2003

Es así que, en enfermedad crítica es evidente el papel del compromiso de la función mitocondrial, en donde el desacoplamiento de su membrana altera la producción de energía y promueve la muerte celular. Esta condición, teóricamente, es mediada por activación de Caspasa 9, incrementando la apoptosis; sin embargo, este proceso requiere a su vez mayor demanda de ATP (Exline et al., 2011), lo que sugiere que, dentro de este ciclo y ante una menor energía disponible, esta muerte sería más por necrosis celular, cerrando y promoviendo el proceso patológico indefinidamente.

La cantidad de oxígeno que se libera en cada tejido es proporcional a sus demandas metabólicas y a su capacidad de extracción, determinando una presión venosa de oxígeno (PvO₂) particular para cada tejido.

La disfunción mitocondrial y el consumo de oxígeno alterado están implicados en la repuesta inflamatoria y en la sepsis; la severidad de esta última ha mostrado correlación con el daño mitocondrial tanto en humanos como en modelos celulares experimentales (Garrabou et al., 2012; Kung et al., 2012) en donde se han descrito cambios en la ultra estructura de la mitocondria y/o inhibición significativa de la funcionalidad de los complejos mitocondriales en varios tipos celulares de muestras aisladas de pacientes sépticos. También se ha observado durante estados sépticos severos un incremento de flujo de calcio hacia la mitocondria, alterando su funcionalidad, liberando Citocromo C y provocando muerte celular (Dada et al., 2012). En este contexto, observaciones corroboradas en plasma de pacientes sépticos han mostrado que el daño mitocondrial favorece la liberación de alarminas de peligro (DAMPs) y del mDNA, y a la consiguiente activación del factor de transcripción nuclear NF κ B; estos

hallazgos se han asociado a inadecuados desenlaces y a tasas de mortalidad mayores (Escames et al., 2011). El mtDNA también activa el inflamosoma NLRP3 cuya importancia en la patogénesis de la sepsis es notable (Zhang et al., 2011).

3.4. Consecuencias patológicas de la disfunción mitocondrial

Depleción de ATP

La síntesis de ATP mitocondrial está regulada por el suministro de sustrato y por el acoplamiento de la fosforilación al gradiente de protones generado por la transferencia de electrones mitocondriales y las demandas de ATP. Este acoplamiento de la fosforilación al gradiente de protones es regulado por las Proteínas Desacopladoras (UCP: uncoupling proteins: inglés) así como por las variaciones fisicoquímicas de la membrana mitocondrial interna. Bajo condiciones patológicas, las aperturas de poros transitorios de permeabilidad mitocondrial también desacoplan la membrana mitocondrial. Aunque existen reportes de niveles de mRNA de UCP en biopsias de hígado de modelos murinos con sepsis, no existe evidencia confiable que relacione el desacoplamiento mitocondrial con el estado inflamatorio (Yu et al., 2000). En estos modelos se observó valores de control respiratorio idénticos o mejores que los controles sanos (Koslov et al., 2006).

La depleción de ATP se acompaña con una inhibición de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, facilitando una concentración intracelular mayor de Na^+ , que resulta en edema celular reversible (Trunkey et al., 1973). Periodos prolongados de hipoxia promueven pérdida y desintegración de la matriz mitocondrial con la expansión y formación de vesículas en el retículo endoplásmico y en el citoplasma, con ruptura lisosomal y la subsecuente liberación de enzimas, paso final de la muerte celular (Wattiaux et al., 1984). Aparte del daño directo de la mitocondria, también se sugiere una reducción en el aporte de NADH+H como sustrato, el cual es consumido por una incrementada actividad de polil (ADP-ribose) polimerasa (PARP) para la reparación del ADN bajo condiciones de sepsis (Wendel et al., 2010).

Liberación de Citocromo C y de Factor Inductor de Apoptosis

Sin importar el estímulo agresor, el compromiso de la función mitocondrial manifestada por la alteración del potencial de su membrana, se caracteriza por la liberación de factores pro-

apoptóticos como Citocromo C del espacio intermembrana con la subsecuente activación de las caspasas (Basanez et al., 2001; Jang et al., 2004). Si bien se piensa que el poro de permeabilidad mitocondrial está involucrado, el mecanismo exacto no está definido. La inflamación también induce peroxidación lipídica, fenómeno asociado con disfunción mitocondrial. Se ha planteado que las ROS inducen oxidación de cardiolipina, lo que perturba su asociación con Cyt C, promoviéndole mayor movilidad membranal y su liberación de la mitocondria (Orrenuis et al., 2007); esto probablemente por supra regulación de Bax, una proteína pro-apoptótica que permite el ensamblaje de canales en la membrana mitocondrial externa. Esta regulación por aumento de Bax en levaduras se ha asociado con un aumento de la oxidación lipídica (Priault et al. 2002) lo cual no se ha confirmado en mamíferos aún.

Otra proteína que induce apoptosis es el Factor Inductor de Apoptosis (AIF: en inglés); su actividad proapoptótica se asocia a niveles intracelulares elevados de Ca^{2+} (injurias por isquemia/reperfusión) que, a su vez, despolarizan la membrana mitocondrial con la pérdida del potencial de membrana y el consiguiente aumento en la generación de ROS (Dawson et al., 2004; van Wijk et al., 2005). La apoptosis mediada por AIF requiere su translocación posterior al núcleo para inducir degradación del ADN (Boujard et al., 2007).

Especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y monóxido de carbono

ROS son un grupo de moléculas con una amplia reactividad y potencial lesivo en los sistemas biológicos; las principales son el anión superóxido (O_2^-), Hidroxilo (HO^\bullet) y Peróxido de Hidrogeno (H_2O_2). Clásicamente las ROS se han identificado como moléculas de defensa del huésped liberadas por neutrófilos para destruir patógenos externos; no obstante, actualmente se reconocen como moléculas claves en la determinación del “destino” celular, dada su función de segundos mensajeros y su activa participación en múltiples vías de señalización celular (Bae Y.S. et al, 2011). Bajo condiciones normales la producción de ROS se mantiene estable en un equilibrio dinámico y este balance está dado por los procesos de producción y los de eliminación (antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos). Las fuentes de producción de ROS se pueden dividir en dos (Finkel T, 2011) (Grivennikova V. G et al 2013):

- a. Procesos biológicos, principalmente metabolismo oxidativo mitocondrial (OXPHOS), en donde se liberan ROS como un bioproducto o como un producto de desecho.

- b. Por procesos celulares en respuesta a xenobióticos, citoquinas o a invasión bacteriana, en donde de forma intencional se generan ROS, como parte de una señal de transducción o como parte de un mecanismo de defensa.

Para el control de celular de la acción de las ROS existen múltiples proteínas con función antioxidante; las principales son superóxido dismutasa (SOD1 y SOD2) que contienen Cobre (Cu), Zinc (Zn) (Cu-Zn-SOD1) y Manganeseo (Mn) (Mn-SOD2) (Miller A.F. 2012). SOD1 en la matriz mitocondrial convierte O^{2-} en H_2O_2 , el cual es reducido a H_2O por catalasas.

Adicional a su función de defensa celular las ROS están involucrados en múltiples vías de señalización, confiriéndoles una propiedad característica que resalta su papel protagónico en estados de enfermedad tanto aguda como crónica.

Una de las principales vías de señalización donde las ROS se involucran y resaltan su papel como segundos mensajeros, especialmente en estados de inflamación es mediada por el Factor de Transcripción Nuclear Kappa Beta (NFκB). El factor NFκB es fundamental en una serie de procesos celulares dentro de los cuales se incluyen respuesta inflamatoria, proliferación, diferenciación y adhesión celular, en autofagia, senescencia celular y apoptosis (Bonizzi G et al, 2004). La activación de este factor tiene dos vías, la canónica y la no canónica. La vía canónica está provocada por productos microbianos, estrés, citoquinas pro inflamatorias y depende de la fosforilación de su quinasa inhibitoria (IKK) β, que al degradar la proteína inhibitoria IκBα, disuelve el complejo NFκB- IκBα, permitiendo la degradación IκBα por el proteosoma, y la traslocación del NFκB al núcleo donde activa la transcripción de genes diana (Basak S et al, 2008). La vía no canónica está activada por el Factor Activador de Células B (BAFF) (Gardam S et al, 2014) y Linfotoxina β (LTβ)(Bauer J et al, 2012) principalmente. Las ROS activan IKK, la cual fosforila IκBα en el residuo de tirosina 42 (Tyr42) favoreciendo la activación del NFκB (Schoonbroodt S et al 2000). La propiedad que tienen las ROS para activar o desactivar una serie de receptores, proteínas, iones y otras moléculas de señalización determinan el equilibrio REDOX que tiene un papel esencial en los eventos fisiológicos y patológicos celulares. Una pérdida de este equilibrio por aumento o disminución de las ROS, impacta múltiples vías de señalización celular que conllevan a disfunción celular, instaurando varias condiciones patológicas, tanto agudas como, de manera especial, en enfermedades crónicas.

La inhabilidad técnica para diferenciar fácilmente las ROS de forma individual, por la mayoría de métodos analíticos, genera resultados contradictorios en este campo. La interpretación de sus efectos debe siempre tener en cuenta que las diferentes ROS tienen efectos biológicos completamente distintos. Ciertos ROS (HO[•] y ROO[•]) pueden lesionar biomoléculas (oxidación de la cardiolipina) cuando están en altas concentraciones, mientras que en concentraciones menores pueden modular la función proteica a través de modificaciones REDOX (Droge et al., 2002). Las estrategias terapéuticas para limitar o disminuir la producción de ROS no han mostrado mayores beneficios en este escenario, razón por la cual puede ser más efectivo modular su producción a nivel mitocondrial. Esto se puede lograr mediante la activación o inhibición de las vías de señalización intracelulares implicadas en la regulación de la producción de ROS mitocondriales, como también pueden ser de interés otras proteínas relacionadas como UCP, las cuales residen en la membrana interna y modulan el potencial de membrana y, en consecuencia, también la generación de ROS y el flujo de Ca²⁺ (Cadenas et al., 2010).

El óxido nítrico (NO por sus siglas en inglés) formado bajo condiciones inflamatorias e hipóxicas es un importante modulador de la función mitocondrial. Bajo condiciones de normoxia, el ON se forma por las formas constitutivas e inducibles de la enzima Óxido Nítrico Sintetasa. En la respuesta inflamatoria la forma inducible (iNOS) es supra-regulada en ciertas células por agentes pro-inflamatorios específicos como la endotoxina, el TNF α , interferón gamma e IL-1, resultando en una producción incrementada de óxido nítrico (Hauser et al., 2005). La mitocondria es uno de los principales blancos del NO, el cual se une de forma reversible al complejo IV de la cadena respiratoria, mientras que el peroxinitrito formado por Óxido Nítrico (NO) + superóxido (O²⁻), inhibe la respiración mitocondrial en múltiples sitios y causa poros de permeabilidad mitocondrial (Galkin et al., 2007).

El monóxido de Carbono (CO), es otro gas mensajero que controla la función mitocondrial. En efecto, CO ha mostrado estimular la biogénesis mitocondrial y su señalización esta mediada por ROS mitocondriales (Piantadosi et al., 2008). Además, ha mostrado participar en la modulación de la respuesta inflamatoria generada por citoquinas anti-inflamatorias (Piantadosi et al., 2011). Estos datos sugieren que el NO y el CO pueden ser benéficos o deletéreos y sólo cantidades controladas bajas de estos gases mensajeros ejercen efectos benéficos para la mitocondria.

Biogénesis mitocondrial y autofagia

Como se ha mencionado, los datos de la disfunción mitocondrial en inflamación e hipoxia son algunas veces contradictorios, lo cual se explica –entre otras razones- por la variación de las condiciones experimentales, la severidad del insulto y la duración del estudio. Otra interesante explicación puede ser la activación de reacciones adaptativas diseñadas a restaurar la función mitocondrial. Estas reacciones incluyen la biogénesis mitocondrial (Reynolds et al., 2009) y la autofagia, que remueve las mitocondrias dañadas (Decker et al., 1980).

La importancia de la biogénesis mitocondrial después de episodios de hipoxia se ha evidenciado en múltiples órganos. Ahuja y colaboradores (2010) mostraron cómo, en presencia de estresores patológicos miocárdicos como isquemia, hay una asociación por la infra regulación de la biogénesis mitocondrial vía PGC 1alfa (PGC -1 α). También se ha reportado que el Factor de Transcripción Myc tiene un papel clave en la regulación del metabolismo cardíaco y en la biogénesis mitocondrial en respuesta al estrés inflamatorio. La activación de Myc en el miocardio –en modelos murinos adultos- mostró un aumento en la captación y utilización de glucosa, así como una contra regulación de la oxidación de ácidos grasos por la disminución de los niveles de PGC -1 α . En biopsias hepáticas, se ha estudiado el rol de la enzima Hexoquinasa III, clave del metabolismo de los carbohidratos, la cual es regulada por la hipoxia- y demostró ejercer un efecto protector en contra del estrés oxidativo. Esto posiblemente debido al aumento de los niveles de ATP, los cuales reducen la producción de ROS, preservando el potencial de membrana mitocondrial e incrementando su biogénesis (Wyatt et al., 2010). En el riñón, numerosos estudios han mostrado el papel clave del PGC 1 alfa en la biogénesis mitocondrial. Por otro lado, en un modelo de estrés oxidativo por injuria de isquemia/reperfusión se evidenció que el aumento de la biogénesis mitocondrial acelera el proceso de recuperación de la función mitocondrial, mediado por p38 y por la activación del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico vía PGC1 alfa (Rasbach et al., 2007).

La biogénesis mitocondrial en sepsis es estimulada por la producción incrementada de ROS y NO, que conlleva a un daño del ADN mitocondrial (mtADN) e inicia una comunicación anormal compleja entre la mitocondria y el núcleo promoviendo una síntesis acelerada de nuevos organelos (Piantadosi et al., 2007). Suliman y colaboradores (2005), demostraron que la liposacáridasa (principal PAMPs) estimula la biogénesis mitocondrial en corazones de ratas en respuesta a daño celular por estrés oxidativo y también que la ocurrencia simultánea de daño del mtADN con una biogénesis mitocondrial compensatoria resulta de la activación de PRRs, especialmente Toll-like 4 (TLR 4). En un estudio más, el mismo grupo demostró que la

biogénesis mitocondrial es capaz de restaurar el metabolismo oxidativo en un modelo experimental de peritonitis, proponiendo un mecanismo potencial que afecta los desenlaces de la sepsis (Haden et al., 2007).

Ciertamente, datos experimentales y clínicos sugieren que la disfunción mitocondrial está relacionada estrechamente con la aparición de falla orgánica múltiple y que la resolución de esta situación depende de la habilidad celular de resolver y restaurar una adecuada función mitocondrial (Singer et al., 2007). En otros términos, una falla en el mantenimiento de la función mitocondrial a través de la biogénesis, puede contribuir con desenlaces negativos; de hecho, un estudio relativamente reciente, mostró cómo la activación de la biogénesis mitocondrial podría afectar la sobrevida en enfermedad crítica (Carre et al., 2010).

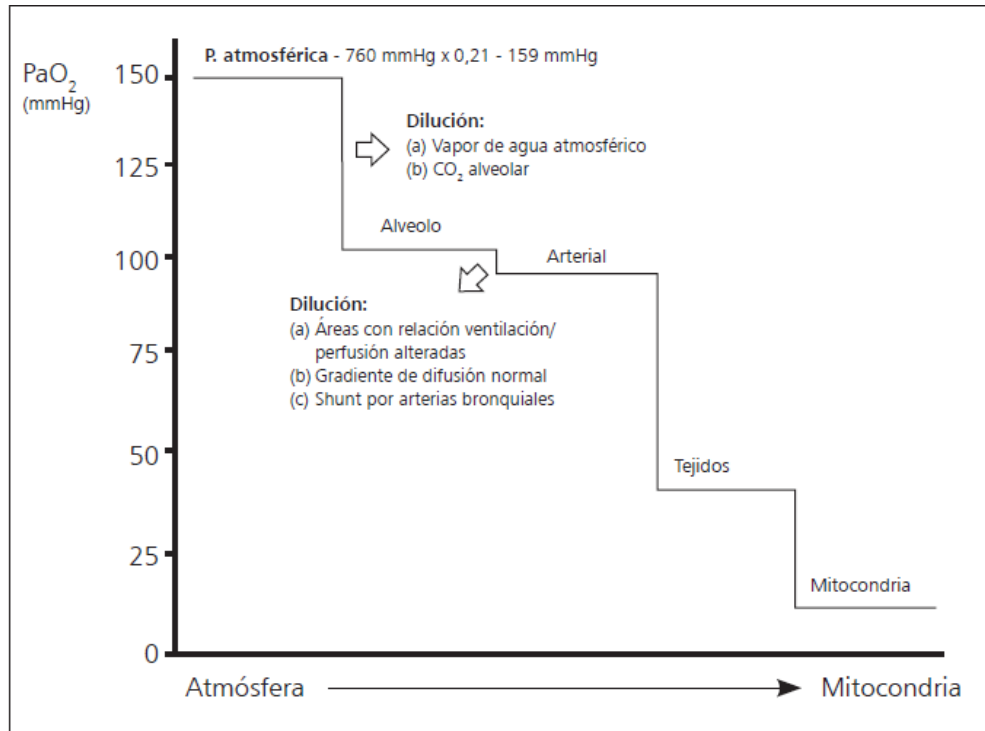
Las mitocondrias lesionadas y/o defectuosas son removidas de las células por medio de la autofagia. La autofagia se limita al daño y muerte celular, como una respuesta de sobrevida celular (Hsieh et al., 2009). Este es un proceso evolutivo, conservado, que involucra una secuencia compleja de formación de vesículas y su fusión con lisosomas, llevando a una degradación de las diferentes estructuras celulares y reciclando estos productos terminales (Levine et al. 2011). Esta autofagia puede ser modulada por las ROS (Moore et al., 2008).

La gran mayoría de los estudios clínicos determinan la función mitocondrial a partir de sustratos mitocondriales en plasma, siendo esto una forma indirecta de medición. Estudios en los que se mide citocromo C (CytC) plasmático en diferentes etapas de la reanimación reportan una importante disfunción mitocondrial por altos niveles plasmáticos de CytC; sin embargo, los niveles de CytC plasmáticos no determinan de forma exacta la función mitocondrial.

Transporte de Oxígeno (DO₂)

El sistema cardio-pulmonar se encarga del transporte desde la atmósfera hasta la mitocondria, desde una presión normal atmosférica de 156 mm /Hg hasta una presión parcial mitocondrial de 8 mm/Hg en promedio (Fig. 1), siendo la hemoglobina el principal transportador en sangre con una capacidad de transporte de 1,34 ml de O₂.

Figura 1. Presión arterial de oxígeno desde la atmósfera hasta la mitocondria



Fuente: Regueira et al. (2010).

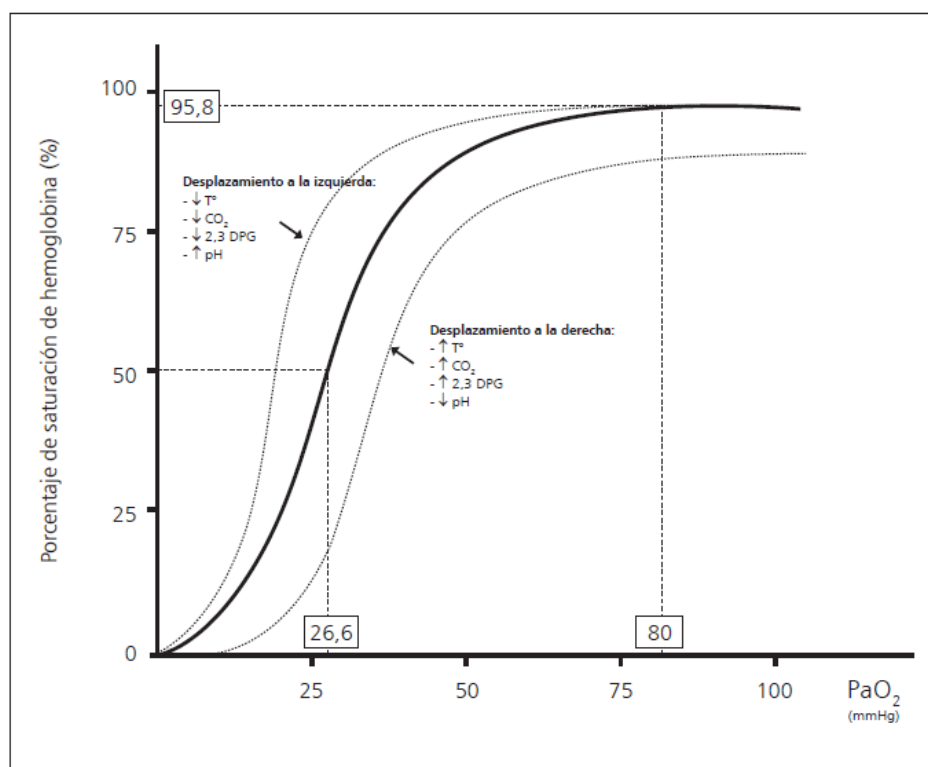
El contenido arterial de oxígeno (CaO_2) depende de la concentración de hemoglobina (Hb) y de su saturación y se calcula:

$$CaO_2 = (1,34 \times Hb \times (SaO_2/100)) + (0,003 \times PaO_2)$$

El producto del CaO_2 por el gasto cardíaco (GC) estima el DO_2 , ($DO_2 = CaO_2 \times GC$)

La saturación de Hb (SaO_2) en la sangre está determinada por la curva de disociación de la Hb, que compara la PaO_2 con la SaO_2 (Fig. 2). La curva se comporta de tal manera que, bajo una SaO_2 de 90%, pequeños cambios en la PaO_2 se asocian a grandes cambios en la SaO_2 . Una vez en los tejidos el oxígeno difunde hasta alcanzar la mitocondria y participar en los procesos oxidativos.

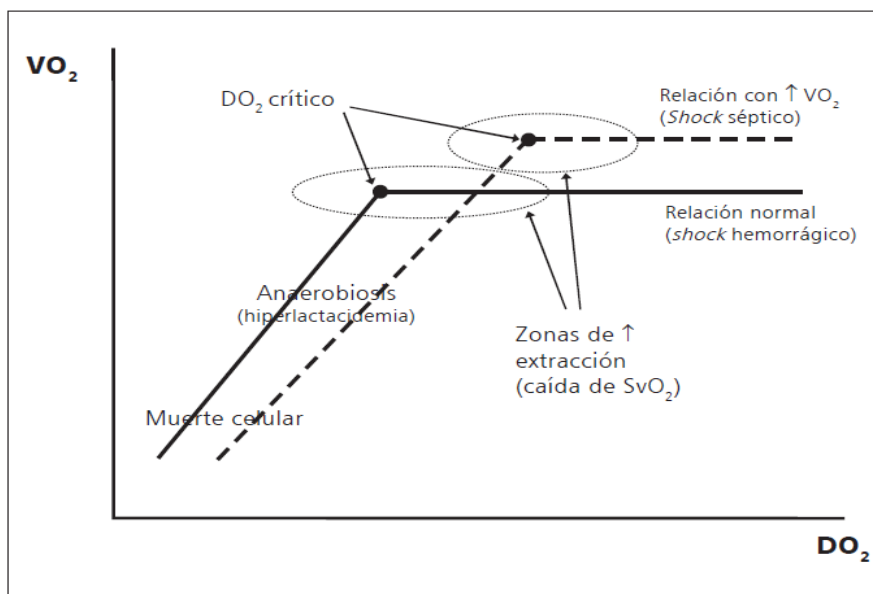
Figura 2. Curva de disociación de la hemoglobina



Fuente: Regueira et al. (2010).

En el paciente crítico, se instaura una hipovolemia relativa por redistribución del flujo sanguíneo, con reducción del mismo al miocardio, músculo esquelético, estómago, duodeno, intestino y páncreas, lo que genera una caída del DO₂ sistémico y regional, sumado al hipercatabolismo propio de esta condición, lo que genera un aumento en el gasto energético aumentando el consumo de oxígeno (VO₂) global. La caída en el DO₂ global y regional propia de esta condición, asociado al aumento en el VO₂ descrito, genera una deuda de oxígeno tisular (Cerra et al., 1990). Esta deuda de oxígeno se caracteriza por una dependencia directa del VO₂ al DO₂, la que actuaría como un elemento central en la génesis de la disfunción orgánica múltiple durante las etapas precoces de la respuesta inflamatoria y de la sepsis (Figura 3).

Figura 3. Relación entre el aporte de O₂ (DO₂) y el consumo (VO₂)



La línea continua representa relación normal en pacientes sanos y la línea punteada el comportamiento en respuesta inflamatoria sistémica.

Fuente: Regueira et al. (2010)

La persistencia de una deuda global o regional de oxígeno es una de las causas que favorecen el desarrollo de falla orgánica múltiple por lo que es fundamental reconocer el shock y la hipoperfusión tisular de forma precoz. Esto ha impulsado la búsqueda de marcadores más sensibles y específicos de oxigenación tisular. El uso de variables metabólicas como el lactato, la saturación venosa central de oxígeno, la tonometría gástrica, entre otros, se han sugerido como una manera de optimizar la sensibilidad a la presencia de hipoperfusión persistentes.

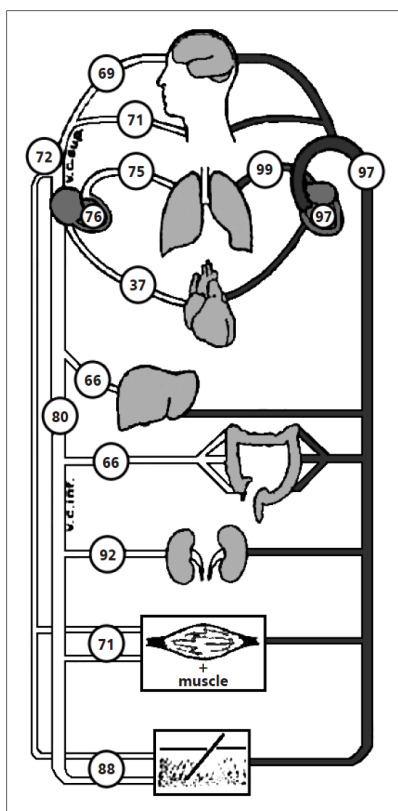
La hiperlactatemia, se ha ligado a condiciones de hipoxia tisular, sin embargo, está señalado que su producción también está fomentada por procesos metabólicos diferentes a condiciones anaeróbicas, razón por la cual su interpretación debe ser cautelosa, contextualizando la etapa de respuesta del paciente (Gladden et al., 2004).

La tonometría gástrica se basa en la medición de CO₂ en la mucosa del estómago, ante la hipoperfusión esplacnica observada en pacientes críticos por la hipovolemia ya referida, y la redistribución del flujo es útil para predecir mortalidad en pacientes críticos (Gutierrez et al., 1992), pero no han disminuido los índices de mortalidad cuando se ha usado como meta de reanimación.

La presión parcial de oxígeno con la que la sangre venosa retorna al corazón (PvO₂) determina una saturación venosa de oxígeno (valores normales 65-70%). La SvO₂ depende de

la sumatoria de las extracciones de oxígeno individuales de cada tejido, la que depende a su vez de su metabolismo y del flujo sanguíneo regional respectivo (Figura 4). La corrección precoz de la SvO₂, mediante la optimización del DO₂ como objetivo terapéutico en la sepsis, ha demostrado disminuir la aparición de Falla Orgánica Multisistémica y las tasas de mortalidad (Rivers et al., 2001). En contraste, la corrección tardía de la SvO₂ no se ha asociado a estos beneficios (Gattinoni et al., 1995).

Figura 4. Saturaciones venosas promedio individuales de cada tejido



Fuente: Regueira et al. (2010).

El conocimiento de la relación VO₂/DO₂ es fundamental en el manejo de los enfermos críticos, y en particular de aquellos sépticos. La caída en el VO₂ se relaciona al aumento en la mortalidad de los pacientes sépticos, por lo que asegurar un DO₂ suficiente para mantener el VO₂ tisular mejora el pronóstico de los enfermos. La dependencia VO₂ al DO₂ predomina en las etapas iniciales de la sepsis como mecanismo fisiopatológico de la falla orgánica multisistémica (Regueira et al., 2010).

La medición del consumo de oxígeno se puede realizar por métodos directos que miden la presión parcial de oxígeno, dentro de los cuales se destacan:

1. Sensor polarográfico: considerado como el patrón de oro, que, a partir de electrodos, mide la presión de oxígeno a nivel tisular, siguiendo los principios de los electrodos de Clark (Clark et al., 1958). Estos electrodos de metal (plata, oro o platinum) reducen el oxígeno por el voltaje de polarización negativa. La diferencia en el voltaje del electrodo de referencia y la obtenida por el electrodo de medición es proporcional a la cantidad de moléculas de oxígeno reducidas por este último. Esta técnica se ha utilizado por más de cuatro décadas, sin embargo, presenta algunas desventajas, que generan variaciones importantes en el momento de la medición.

2. Sensor Óptico: mediante un sistema de fibra óptica se obtienen los cambios dependientes de la presión de oxígeno, alcanzados por una probeta con colorante fluorescente (Vanderkooi et al., 1987). Este proceso no consume oxígeno, pero se basa exclusivamente en la cantidad de oxígeno presente.

3. Espectrometría de masa: principio que consiste en la medición de la proporción masa-carga de las moléculas generadas por compuestos químicos ionizantes, permitiendo identificar y medir el oxígeno molecular cuantitativamente (Seylaz et al. 1983). La invasividad y el tiempo de respuesta hacen a este método menos atractivo que los anteriores.

Estos métodos son invasivos, ocasionalmente prolongados y costosos razón por la cual entran cada vez más en desuso, facilitando la entrada de marcadores indirectos de hipoxia. Estos marcadores pueden ser endógenos o exógenos que permiten ubicar áreas de bajo contenido de oxígeno. A partir del conocimiento del consumo elevado de oxígeno por parte las células tumorales, se reconoció la generación del factor inductor de hipoxia (HIF) (Semenza GL 2007), descrito previamente, considerado como el marcador endógeno de hipoxia más confiable.

Con respecto a los marcadores exógenos, se encuentran los marcadores basados en imágenes como son la Tomografía con Emisión de Positrones (PET), la espectroscopia infrarroja o cromatografía (NIRS), la espectroscopia por resonancia magnética y la espectroscopia por resonancia paramagnética electrónica. Estas técnicas obtienen una imagen precisa del área hipóxica, usualmente por marcación del contenido tisular de oxígeno. No obstante, estas herramientas proporcionan información de la oxigenación relativa errando en la cuantificación del contenido de oxígeno (Carreu et al., 2011) y su disponibilidad y accesibilidad es limitada, especialmente por sus altos costos. Por último, y considerado como el marcador exógeno estándar, está el Pimonidazol, el cual es un derivado de los compuestos nitromidazoles.

La unión de este marcador exógeno a las macromoléculas celulares ha mostrado aumentar dramáticamente cuando la concentración de oxígeno está por debajo de 10 mmHG y es indicador de hipoxia crónica. La correspondencia entre marcadores exógenos y endógenos es mucho más equilibrada entre Pimonidazol y el factor inductor de hipoxia, situación que respalda el uso de este tipo de marcador de hipoxia exógeno especialmente en patología tumoral (Kizhaka et al. 2009).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Establecer la relación entre la actividad mitocondrial y los parámetros clínicos convencionales de hipoxia y estrés metabólico, en linfocitos de una cohorte de pacientes en estado crítico.

4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el consumo de oxígeno mitocondrial en las primeras 24 horas en linfocitos de pacientes en estado crítico, sépticos o no y, en individuos sanos.
- Evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno (mROS) en linfocitos de pacientes en estado crítico, sépticos o no, en las primeras 24 horas y, en individuos sanos.
- Evaluar el potencial de membrana mitocondrial en linfocitos de pacientes en estado crítico, sépticos o no, en las primeras 24 horas y, en individuos sanos.
- Determinar las variables clínicas convencionales de concentración de lactato, Proteína C Reactiva y Saturación venosa de O₂ en pacientes en estado crítico, sépticos o no.

5. METODOLOGÍA

5.1. Tipo y diseño de investigación

Investigación exploratoria; estudio de cohorte prospectivo descriptivo observacional, empleando técnica de muestreo simple.

Posterior a la aprobación por el comité de ética del Hospital San Ignacio, se reclutaron tres cohortes de pacientes divididos de la siguiente manera:

1. Cohorte de pacientes críticos sin infección, denominados no sépticos.
2. Cohorte de pacientes críticos con infección aguda, denominados sépticos.
3. Cohorte de pacientes sanos.

Criterios de Inclusión

1. Pacientes mayores a 18 años hospitalizados en la unidad de cuidado intensivo (UCI) del Hospital Universitario de San Ignacio, Bogotá, Colombia por condición crítica, con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica dado por 2 o más de los siguientes signos (Singer M et al, 2016) :
 - a. Temperatura corporal $>38^{\circ}\text{C}$ o menor a 36°C .
 - b. Frecuencia cardiaca > 90 latidos por minuto.
 - c. Frecuencia respiratoria > 20 respiraciones por minuto o Presión arterial de CO_2 $\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$.
 - d. Cifra de Leucocitos $>12000/\text{mm}^3$ o $<4000 \text{mm}^3$ o $> 10\%$ de células en cayado.
 - Pacientes en la cohorte de sepsis con diagnóstico de infección activa y/o hemocultivos positivos.

Criterios de Inclusión Grupo Control

- Mayores de 18 años
- IMC entre 20 y 25.
- Sin antecedentes de patologías crónicas de base.
- Sin ingesta de medicamentos que afecten la función mitocondrial.

Criterios de exclusión

- Menores a 18 años
- Pacientes mujeres embarazadas o con sospecha de embarazo.
- Paciente con historia familiar de enfermedad primaria mitocondrial, con tratamiento activo con medicamentos que afecten la función mitocondrial (Tabla 1 Suplemento).
- Pacientes con enfermedades crónicas tipo Diabetes Mellitus, Hipertensión Arterial y/o Cáncer.
- Pacientes con IMC mayor a 30 y menor a 18.
- Estado de choque dado por Presión arterial media menor a 60 mm/hg.

Tamaño de la muestra

Teniendo en cuenta el diseño descriptivo del estudio, la estimación del tamaño de muestra se basó en dos aspectos: primero, el promedio de pacientes de otros estudios reportados en la literatura con poblaciones similares en humanos, encontrando que el máximo número es de 67 pacientes; en segundo lugar, dado que se analizaran 6 variables, se estiman 10 observaciones por cada una.

Se estima un número total de participantes de 60 distribuidos de la siguiente forma:

- 10 voluntarios
- 50 de UCI (sépticos y no sépticos).

5.2. Materiales y métodos.

- Procesamiento de las muestras

Las muestras de sangre de los pacientes estudiados se hicieron de líneas venosas centrales (catéteres centrales yugulares y subclavios) 10 cc tubo tapa amarilla. La muestra se procesó dentro de los 30 minutos después de su obtención.

- *Aislamiento de linfocitos por FICOLL*

Los linfocitos de pacientes críticos e individuos sanos control fueron aislados por gradiente de densidad FICOLL a partir de una muestra de 10 ml de sangre total colectada en tubos tapa amarilla. Las muestras fueron centrifugadas a 1800 rpm durante 10 minutos, la capa media, en

la cual se encuentran los glóbulos blancos y el plasma, fue colectada y diluida en 30 ml de PBS; los 40 ml resultantes fueron depositados sobre 10 ml de FICOLL en un tubo falcon de 50 ml y centrifugados a 1800 rpm durante 30 minutos. Una vez centrifugado, el buffy coat, o fracción en la cual se encuentran únicamente glóbulos blancos y plaquetas, fue colectado, lavado dos veces con PBS y separado en 3 grupos de igual volumen, en los cuales se llevaron los análisis que se describen a continuación.

- *Medición del Potencial de membrana mitocondrial en linfocitos*

Las mediciones de potencial de membrana mitocondrial se realizaron con la sonda JC-1. La fracción de muestra designada para este análisis fue dividida en 7 tubos diferentes que correspondían a: 1) Muestra sin marcar, 2-4) Potencial de membrana mitocondrial basal por triplicado (muestras marcadas con JC-1) y 5-7) controles positivos de despolarización de membrana mitocondrial por triplicado (muestras marcadas con JC-1 y tratadas con valinomicina). Todas las muestras fueron marcadas con anticuerpo anti CD45 con el fin de delimitar los análisis por citometría de flujo únicamente a la población de linfocitos y excluir las demás células mononucleares. Las muestras fueron marcadas con JC-1 a una concentración de 2.5 ug/ml y despolarizadas con valinomicina a una concentración de 10 nM e incubadas durante 15 minutos a 37°C. Cumplido el tiempo de incubación, las células fueron adquiridas en citómetro de flujo Becton Dickinson y se realizó análisis de intensidad media de fluorescencia roja y verde.

- *Medición de producción de superóxido en linfocitos.*

Las mediciones de producción de radical superóxido se realizaron con la sonda dihidroetidina (DHE). La fracción de muestra designada para este análisis fue dividida en 7 tubos diferentes que correspondían a: 1) Muestra sin marcar, 2-4) Producción de radical superóxido basal por triplicado (muestras marcadas con DHE) y 5-7) controles positivos de producción de superóxido por triplicado (muestras marcadas con DHE y tratadas con rotenona). Todas las muestras fueron marcadas con anticuerpo anti CD45 con el fin de delimitar los análisis por citometría de flujo únicamente a la población de linfocitos y excluir las demás células mononucleares. Las muestras fueron marcadas con DHE a una concentración de 2.5 uM, incubadas durante 30 minutos a 37°C, a continuación, fueron tratados con rotenona a una concentración de 1 uM e incubadas durante 40 minutos más a 37°C. Cumplido el tiempo de incubación, las células fueron adquiridas en citómetro de flujo Becton Dickinson y se realizó análisis de intensidad media de fluorescencia roja.

- *Medición consumo de oxígeno en linfocitos.*

Las mediciones de consumo de oxígeno se realizaron con el kit hypoxyprobe. La fracción de muestra designada para este análisis fue dividida en 8 tubos diferentes distribuidos así: 1) Muestra sin marcar, 2) Anticuerpo anti pimonidazole unido a FITC, 3-5) Consumo de oxígeno basal por triplicado (muestras incubadas con pimonidazole e incubadas con anti pimonidazole) y 6-8) controles negativos de consumo de oxígeno por triplicado (muestras incubadas con pimonidazole, incubadas con NaCN y marcadas con anti pimonidazole). Todas las muestras fueron marcadas con anticuerpo anti CD45 con el fin de delimitar los análisis por citometría de flujo únicamente a la población de linfocitos y excluir las demás células mononucleares. Las muestras fueron incubadas con pimonidazole a una concentración de 200 μM y NaCN 5 mM, cubiertas con aceite mineral e incubadas durante 2 horas a 37°C. Pasadas las 2 horas, las células fueron transferidas cuidadosamente a través del aceite a un nuevo tubo, fijadas con formaldehído al 1.6% durante 20 minutos y permeabilizadas con metanol absoluto a -20°C durante la noche. Al día siguiente, las células fueron lavadas dos veces con solución de tinción (PBS + 2% de suero bovino fetal) e incubadas con anticuerpo anti pimonidazole en dilución 1:400 durante 1 hora a temperatura ambiente. Cumplido el tiempo de incubación, las células fueron lavadas y adquiridas en citómetro de flujo Becton Dickinson y se realizó análisis de intensidad media de fluorescencia verde.

5.3. Análisis de resultados y estadístico.

EL tipo de paquete estadístico utilizado (SPSS v22 para Windows(Chicago IL, USA).

- Se reportan los valores individuales para cada sujeto en cada cohorte.
- Se realiza un análisis uni como multivariado determinando las mediciones de consumo de oxígeno, $\Delta\Psi\text{M}$, y la producción de superóxido en comparación con las otras medidas (SaVo2-PCR-Lactato).
- Los resultados de la citometría de flujo para cada variable de función mitocondrial se reportan como una media de valor de fluorescencia.
- A partir de las mediciones anteriormente mencionadas, se determina la asociación con mortalidad a 30 días en los grupos de pacientes enfermos mediante análisis operacionales.

La información obtenida se presenta en gráficos y tablas de frecuencias. Las variables categóricas se presentan como proporciones y las variables continuas como promedio y desviación estándar.

Para la comparación de las variables citométricas de función mitocondrial entre pacientes sépticos y no sépticos se usó un análisis de covarianza.

Para la comparación de las variables citométricas y variables clínicas se hizo un análisis por componentes principales.

5.4.Hipótesis de investigación

Como hipótesis de trabajo se consideró que existe una asociación entre la función mitocondrial de linfocitos y los biomarcadores clásicos evaluados en pacientes en estado crítico, durante las primeras 24 horas siguientes a la noxa inflamatoria.

6. RESULTADOS

Se reclutaron 54 pacientes en total (25 sépticos, 29 no sépticos) y 10 controles sanos (voluntarios).

Los 29 pacientes no sépticos presentaban condiciones clínicas inflamatorias (Cirugía mayor (abdominal, cardíaca y ortopédica), Falla respiratoria aguda y Trauma).

Los 25 pacientes sépticos presentaban sepsis abdominal (65%), sepsis pulmonar (26%) y sepsis urinaria (9%).

Los datos demográficos y de variables clínicas rutinarias de la población estudiada y los pacientes control se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Datos demográficos

	Séptico	No-séptico	Control	<i>p</i>
Edad	58,55 ± 18,2	58,83 ± 19,8	30,6 ± 13,4	<0,001 ^a
Sexo				0,351 ^c
Mujer	10	10	6	
Hombre	12	19	4	
IMC	23,23 ± 3,9	24,16 ± 2,9	22,88 ± 2,1	0,435 ^a
SOFA	7,90 ± 4,1	8,03 ± 2,5	1	0,899 ^b
APACHE II	14,00 ± 7,6	11,97 ± 5,5	2	0,303 ^b
Cultivos	70% Gram (-)			
WBC	12,7	13,2	8.0	0,821 ^b
Lactato	2,03mmol/lit	1,88mmol/lit	0,5mmol/lit ± 0,0	<0.01 ^a
SvO2	75,68	68,72	75 ± 0,0	0,069 ^a
CRP	19,23 mg/lit	13,7 mg/lit	3mg/lit	0,139 ^b

Abreviaciones: **SOFA** (Sequential Organ Failure Scale) **APACHE** (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation). **IMC** (Índice de Masa Corporal). **SvO2** (Saturación venosa de Oxígeno). **C-RP** (C reactive protein en inglés: Proteína C reactiva).

En cada casilla se presentan los valores de media ± desviación estándar.

^a ANOVA de un factor. Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los pacientes de UCI.

^b test de *t-student* de dos colas

° test de *Chi-Square*

Los valores de las escalas de falla orgánica y severidad de la enfermedad mostraron valores elevados, SOFA > 6, lo que refleja compromiso orgánico moderado al ingreso a la unidad de cuidados intensivos con una probabilidad de muerte entre el 15 y 20% (Ferreira FL et al 2001) y APACHE > 8 que corrobora un compromiso sistémico de los pacientes evaluados (KNaus W.A et al 1985). La elevación del lactato sérico, estadísticamente significativo, confirma, aunado al estado de SIRS, una condición inflamatoria aguda. Este aumento en las primeras 24 horas, confirma la capacidad predictiva del lactato sérico como marcador de estrés celular (Kraut JA et al, 2014).

La tabla 2 muestra los valores de media de fluorescencia de las variables citométricas de función mitocondrial de la cohorte de pacientes evaluados y de los pacientes control.

Tabla 2. Datos de Función mitocondrial

	Séptico	No-séptico	Control	p
($\Delta\Psi\text{M}$)	2,24 ± 1,1	2,22 ± 0,9	2,56 ± 0,7	0,631 ^a
mtVO2	1193 ± 981	1015,16 ±	485,14 ±	0,135 ^a
mROS	183,7 ± 71,4	189,3 ± 84,9	95,67 ± 2,5	<0,001 ^a

Abreviaciones: ($\Delta\Psi\text{M}$) (Potencial de membrana mitocondrial), **mtVO2** (Consumo de oxígeno mitocondrial) **mROS** (Especies reactivas de oxígeno mitocondriales).

En cada casilla se presentan los valores de media ± desviación estándar.

^a ANOVA de un factor. Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los pacientes de UCI. En azul esta resaltado la variable con significancia estadística.

En las primeras 24 horas se observa un aumento significativo en la producción de mROS, asociado a una tendencia de un consumo de oxígeno en aumento. Siendo el aumento de mROS estadísticamente significativo respecto a la población control. Este análisis univariado refleja cómo, entre más crítico se encuentre el paciente (SOFA-Lactato elevados) más respuesta inflamatoria se instaura, elevando la producción de mROS que conllevaría un incremento en el trabajo mitocondrial, reflejado en el aumento del consumo oxígeno (mtVO2). Estos hallazgos son consecuentes con lo hasta ahora establecido: cómo el aumento en la producción de mROS infiere un aumento en al trabajo mitocondrial, lo cual aumenta el mtVO2.

En las primeras 24 horas no se observaron cambios en el potencial de membrana, situación que confirma que la mitocondria participa activamente en la respuesta aguda, y que la pérdida del potencial de membrana es un fenómeno tardío en una condición irreversible que demarca ya muerte celular. Es de anotar que los pacientes evaluados no cursaban con enfermedades previas, por lo tanto, su reserva de función mitocondrial, se puede considerar intacta, y sugiere que, en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas, en donde ya existe una disfunción mitocondrial previa, la presencia de un estrés inflamatorio agudo tiene menor respaldo de la función mitocondrial y, por ende, la falla energética es más temprana. Esto explica, en parte, las altas tasas de mortalidad en poblaciones de obesos, cáncer y con síndrome metabólico en la unidad de cuidado intensivo (Trivedi V et al, 2015).

Igualmente, de forma aleatoria se escogieron 10 pacientes críticos y se les realizó al 3er día mediciones de los parámetros clínicos y de las tres variables de la función mitocondrial, con la intención de evaluar en tiempo si existía algún cambio en la función mitocondrial en estos pacientes. La tabla 3 muestra estos resultados.

Tabla 3. Mediciones clínicas y de función mitocondrial en tiempo de pacientes críticos

	Séptico		<i>p</i>	No-séptico		<i>p</i>
	Day 1	Day 3		Day 1	Day 3	
SOFA	9,5	7,5	0,092	7,0	5,5	0,205
APACHE II	16,7	12,7	0,191	14,0	18,5	0,323
WBC mil/mm³	17,2	12,3	0,087	12,5	9,8	0,189
Lactato mmol/lit	1,9	1,3	0,108	1,3	1,2	0,900
SvO2	69,2	64,4	0,537	78,2	81,8	0,661
CRP	25,6	14,1	0,223	6,5	8,4	0,404

mg/lt						
($\Delta\Psi_M$) mF	2,8	2,9	0,854	2,7	3,2	0,634
mtVO2 mF	581,6	1012,1	0,394	644	1005	0,369
mROS mF	151,3	157,6	0,437	190,9	165,9	0,193

No se encontraron diferencias significativas; no obstante, es de destacar en esta evaluación en tiempo, la tendencia observada en una disminución en la producción de mROS en el paciente no séptico con una tendencia en ambas cohortes de pacientes de aumentar el consumo de oxígeno. Esto apunta a un trabajo mitocondrial constante y en aumento, en estrés agudo, interpretado en un aumento del consumo de oxígeno mitocondrial, lo cual también explica la producción sostenida de mROS. Paradójicamente la PCR disminuyó en la cohorte de pacientes sépticos mientras en la cohorte de no sépticos la tendencia fue a aumentar, condición que insinúa que ante un estímulo infeccioso que es susceptible de control (antibióticos), la activación mediada por PAMPS disminuye y por ende la producción hepática de proteínas de fase aguda. Desde el punto de vista metabólico, considerando que no presentaban estado de choque, el estrés oxidativo puede ejercer funciones de señalización celular en estrés inducido por DAMPS a nivel hepático a través de IL 6, lo cual podría favorecer una mayor producción de proteínas de fase aguda.

a. Mortalidad.

8 de los 29 pacientes no sépticos fallecieron antes de los 30 días (27.5%) y 12 de los 25 sépticos fallecieron (48%).

La tabla 4 muestra los valores de los parámetros clínicos y de función mitocondrial de los pacientes fallecidos en comparación con los controles sanos.

Tabla 4. Variables clínicas y de función mitocondrial de pacientes que fallecieron

Mortalidad sépticos	Mortalidad no sépticos	Control

EDAD	55.75	59.5	34.8
H:M	3:1 M: F	3:1	1.5:1
IMC	23.21	25.1	22.88
SOFA	10.58	9.75	1
APACHE II	17.41	14.75	2
Cultivos	Gram (-) 70%	-----	-----
WBC	11.38 mil/mm ³	16.42 mil/mm ³	8.0 mil/mm ³
Lactato	2.35 mmol/lit	2.17 mmol/lit	0.8mmol/lit*
SvO2	73.25 %	72.7 %	80%
CRP	15.56 mg/lit	18.9mg/lit	3mg/lit*
($\Delta\Psi M$)	2.01 mF	2.165 mF	2.55 mF
mtVO2	1178.47 mF	1293.54 mF	465 mF*
mROS	175.4 mF	213.86 mF	95.3 mF*

* estadísticamente significativas

La tasa de mortalidad de este estudio de 37.7 % en promedio, refleja las cifras ya mencionadas de mortalidad en los pacientes en cuidado intensivo. No encontramos en esta cohorte de pacientes, alteraciones del $\Delta\Psi M$, persistiendo los hallazgos ya descritos de una producción elevada de mROS y un alto consumo de oxígeno. En las primeras 24 horas, a pesar del alto mtVO₂, no hubo una caída marcada de la SvO₂.

Es característico cómo una alta producción de mROS y el alto consumo de oxígeno mtVO₂ se asocian a una alta probabilidad de muerte en pacientes críticos. De igual forma el lactato elevado también se asocia a mortalidad.

Tabla 5. Datos demográficos y variables clínicas y de función mitocondrial de los pacientes críticos vivos y los que fallecieron

	Séptico Mortalidad	Séptico Sobreviviente	p	No- Séptico Mortalidad	No-séptico sobreviviente	P value
Edad	55.75	61.9	0,617	59.5	58.7	0,912
SOFA	10.58	5.5	0,019	9.75	7.38	0,021
APACHE II	17.41	10.5	0,069	14.75	10.9	0,096
WBC mil/mm ³	11.38	14.28	0,289	16.42	12.02	0,225
Lactato mmol/lt	2.35	1.62	0,138	2.17	1.76	0,429
SvO ₂	73.25%	78.6%	0,488	72.7%	67.19%	0,242
CRP mg/lt	15.56	23.64	0,142	18.9	11.7	0,114
($\Delta\Psi$ M) mF	2.01	2.24	0,530	2.16	2.21	0,836
mtVO ₂ mF	1178.47	1013.23	0,755	1293.54	901.6	0,320
mtROS mF	175.4	75.3	0,348	213.86	180.72	0.807

Las variables resaltadas en azul son las que presentaron significancia estadística. Se resalta en verde el consumo de oxígeno mitocondrial en los pacientes no sépticos que fallecen es mayor que en los que sobreviven, también se resalta en verde la mROS en los pacientes sépticos fallecidos respecto a los sobrevivientes en donde el aumento des 2.32 veces más.

Las escalas de severidad en UCI, las cuales han sido ampliamente validadas, de forma consistente en este estudio comprueban que entre más crítico el paciente se encuentre (SOFA y APACHE altos) mayor es la probabilidad de muerte.

Esta comparación expresa cómo si existe una importante tendencia a que la producción de mROS sea marcadamente mayor en los pacientes que fallecen comparado con los pacientes que sobreviven, especialmente en los pacientes sépticos en donde los mROS se producen 2.32 veces más en los pacientes muertos respecto a los sobrevivientes, sin ser en este estudio estadísticamente significativa. Se puede entonces afirmar que las ROS mitocondriales son la

forma más determinante por medio de la cual la mitocondria participa en la respuesta inflamatoria sistémica en la fase inicial de respuesta.

6.1. Análisis de resultados por objetivo

Metodología objetivo 1

Evaluar el consumo de oxígeno mitocondrial en las primeras 24 horas en linfocitos de pacientes en estado crítico, sépticos o no y, en individuos sanos.

Para comparar el consumo de oxígeno entre diferentes estados de los pacientes (No sepsis-caso, No sepsis-control y Sepsis-caso), se realizó un análisis de covarianza que evaluó el efecto de dicho factor y las covariables sexo, edad e índice de masa corporal (IMC). Se declaró efecto significativo de los factores cuando los valores de $p < 0.05$. La normalidad de los residuales del modelo fue evaluada bajo prueba de Shapiro-Wilk. Los análisis fueron hechos con el software SAS v. 9.4.

Resultados

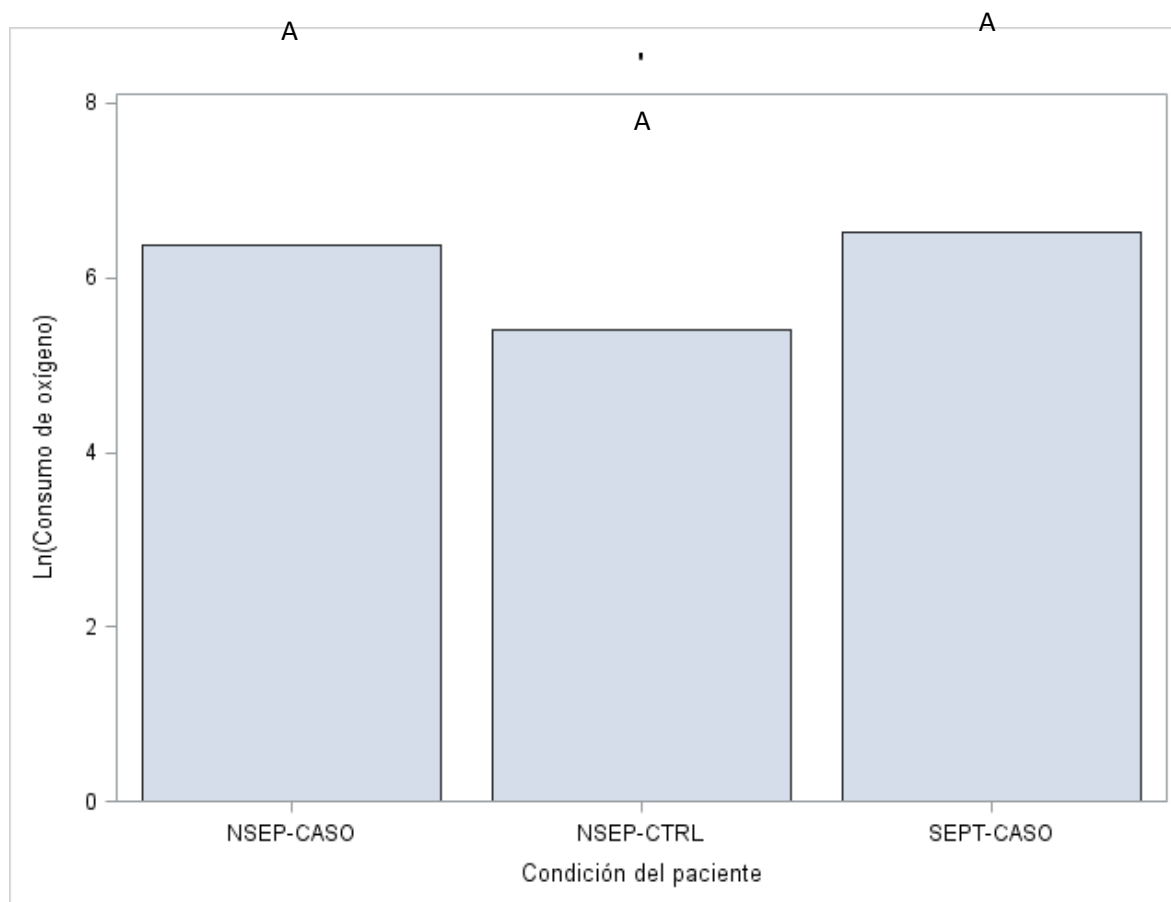
En la evaluación preliminar del modelo se encontró que los residuales no mostraban un comportamiento normal bajo prueba de Shapiro-Wik, por lo que se procedió a su transformación a través de la función logaritmo, lo cual permitió la estabilización de la varianza y la validación del supuesto. Con la variable transformada se encontró que ninguno de los factores, estado del paciente y covariables, tenía efecto sobre la variable de respuesta, Tabla 6, Fig. 5.

Tabla 6. Análisis de covarianza para evaluar el efecto del estado de los pacientes (No sepsis-caso, No sepsis-control y Sepsis-caso) y las covariables sexo, IMC y edad sobre el consumo de oxígeno

Fuente de variación	Valor F	Pr>F
Estado del paciente	2.05	0.1389
Sexo	0.05	0.8237
IMC	2.22	0.1415
Edad	0.24	0.6232

* $P < 0.05$

Figura 5. Promedios del logaritmo natural de la variable de consumo de oxígeno, corregidos por las covariables evaluadas para las tres condiciones de los pacientes (No sepsis-caso, No sepsis-control y Sepsis-caso). Promedios con la misma letra son estadísticamente igual es con $p < 0.05$ bajo prueba de t protegida por Fisher.



Metodología objetivo 2

Evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno (mROS) en linfocitos de pacientes en estado crítico, sépticos o no, en las primeras 24 horas y, en individuos sanos.

Para evaluar este objetivo se utilizaron técnicas de análisis de regresión múltiple, donde el modelo incorporaba las variables de consumo de oxígeno, sexo (binomial), IMC y edad, como variables independientes, supuesto que fue confirmado con la estimación de las estadísticas de Factor de Inflación de Varianza (VIF), y tolerancia (TOL), contra la variable dependiente producción de ROS (anión superóxido). Se evaluó la distribución normal de residuales mediante prueba de Shapiro-Wilk.

Para la selección del modelo de predicción se optimizó el modelo mediante las técnicas de selección de *Stepwise* con puntos de corte a $p=0.15$. Los análisis fueron hechos con del software SAS v. 9.4.

Resultados

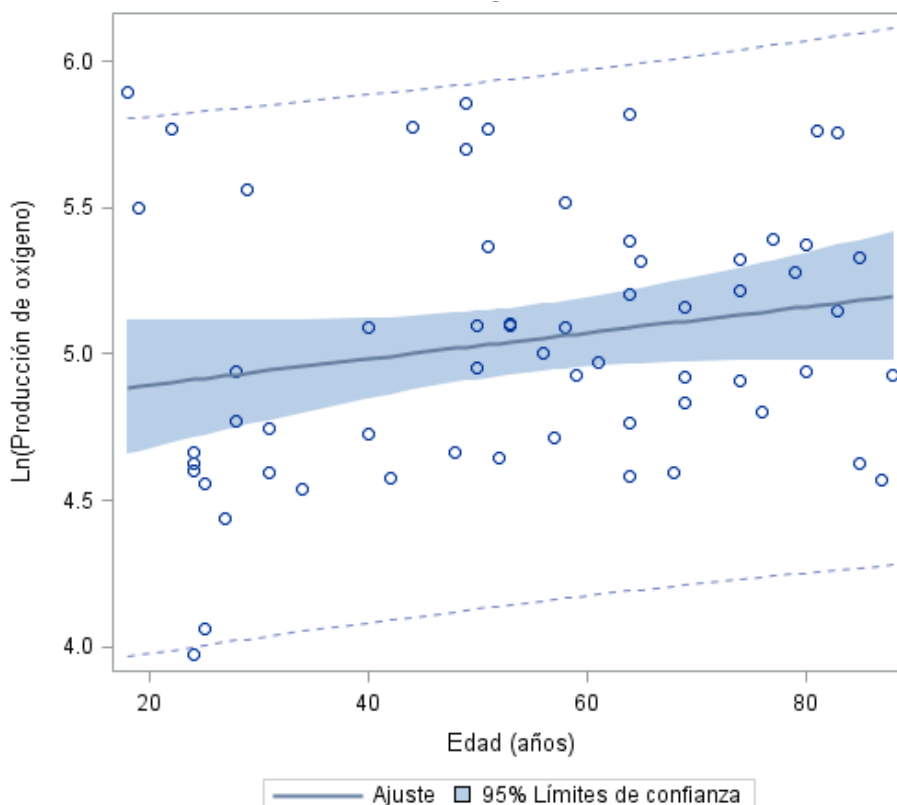
Para este modelo, la variable dependiente producción de oxígeno se transformó mediante la función logaritmo natural, para corregir problemas en la distribución normal de los residuales. Al evaluar el modelo no se detectaron efectos significativos sobre la variable dependiente, Tabla 7, por lo que el modelo de pronóstico no incluyó la variable consumo de oxígeno, solo se ingresó la variable edad, Fig. 6, Ec. 1, la cual muestra que hay ganancias en los consumos de oxígeno en 1.005 unidades, por cada año de vida que se incrementa en el paciente. **A MAYOR EDAD SE AUMENTA LA PRODUCCION DE SUPERÓXIDO.**

Tabla 7. Análisis de regresión entre las variables consumo de oxígeno, IMC, sexo y edad en función de producción de superoxido

Variable	Estimator	Standar erros	T value	Pr > t
Interceptum	520.667	0.44232	11.77	<.0001*
mtVO2	0.00003553	0.00006321	0.56	0.5763
BMI	-0.01941	0.01907	-1.02	0.3130
Sex	-0.01818	0.11740	-0.15	0.8775
Age	0.00497	0.00286	1.74	0.0870

* P<0.05

Figura 6. Modelo de pronóstico entre la edad de los pacientes y la producción de SUPEROXIDO, seleccionado mediante procedimiento Stepwise y p=0.15



Ecuación 1. Ecuación de predicción de los niveles de consumo de oxígeno como función de la edad del paciente. Valores entre paréntesis corresponden con los errores estándar de la estimación de cada parámetro.

$$\text{Consumo de oxígeno} = \frac{4.8055}{(0.15967)} + \frac{0.00445(\text{Edad})}{(0.00276)}$$

Metodología objetivo 3

Evaluar el potencial de membrana mitocondrial en linfocitos de pacientes en estado crítico, sépticos o no, en las primeras 24 horas y, en individuos sanos.

Para comparar el potencial de membrana entre diferentes estados de los pacientes (No sepsis-caso, No sepsis-control y Sepsis-caso), se realizó un análisis de covarianza que evaluó el efecto de dicho factor y las covariables sexo, edad e índice de masa corporal (IMC). Se declaró efecto significativo de los factores cuando los valores de $p < 0.05$. La normalidad de los residuales del modelo fue evaluada bajo prueba de Shapiro-Wilk. Los análisis fueron hechos con del software SAS v. 9.4.

Resultados

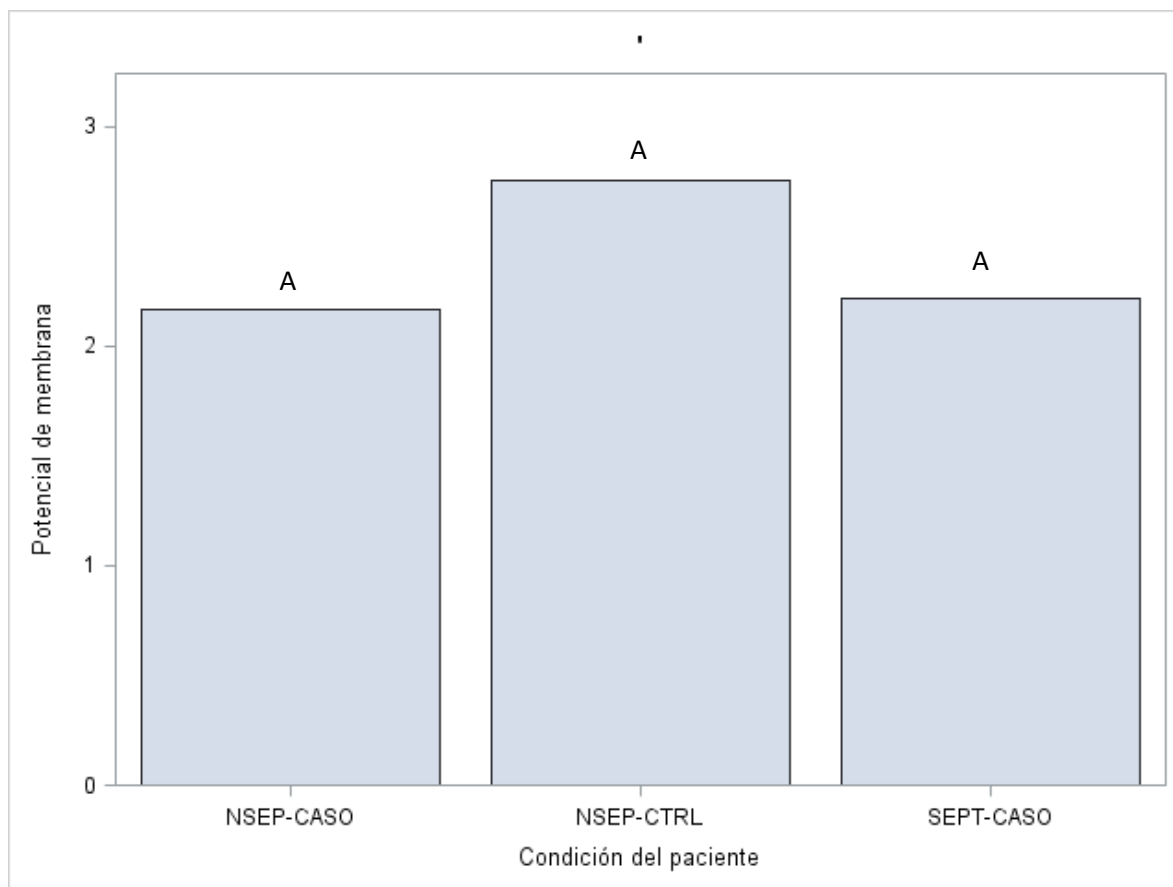
De acuerdo con el modelo propuesto se encontró que ninguno de los factores, estado del paciente y covariables, tenía efecto sobre la variable de respuesta, Tabla 8, Fig. 7.

Tabla 8. Análisis de covarianza para evaluar el efecto del estado de los pacientes (No sepsis-caso, No sepsis-control y Sepsis-caso) y las covariables sexo, IMC y edad sobre el potencial de membrana

Fuente de variación	Valor F	Pr>F
Estado del paciente	1.02	0.3666
Sexo	0.10	0.7551
IMC	0.12	0.7337
Edad	1.17	0.2833

* $P < 0.05$

Figura 7. Promedios de la variable potencial de membrana, corregidos por las covariables evaluadas para las tres condiciones de los pacientes (No sepsis-caso, No sepsis-control y Sepsis-caso). Promedios con la misma letra son estadísticamente igual es con $p < 0.05$ bajo prueba de t protegida por Fisher



Metodología objetivo 4

Determinar las variables clínicas convencionales de concentración de lactato, Proteína C Reactiva y Saturación venosa de O₂ en pacientes en estado crítico, sépticos o no.

La evaluación de la relación entre las variables fue hecha mediante técnicas de componentes principales, tomando como puntos de corte valores propios superiores a la unidad y porcentajes de acumulación de la varianza mayores al 70%. Para su descripción gráfica se utilizaron figuras de *biplots* de cada variable respecto a sus componentes principales. Los análisis fueron hechos con el software SAS v. 9.4.

Resultados

Se encontraron tres componentes con valores propios superiores a la unidad que solo retuvieron el 66% de la variación, por lo que se incluyó un cuarto componente con valor propio de 0.86 y con aporte de 15% de la variación, para un total del 80.3% entre los cuatro componentes, Tabla 9.

Tabla 9. Componentes principales de los datos de PCR (PCR), lactato (LAC), saturación venosa de oxígeno (SVO₂) consumo de oxígeno (CONO₂), potencial de membrana (DYM) y producción de superóxido (PO₂)

Componente	Autovalor	Diferencia	Proporción	Acumulaed
1	1.65	0.36	0.27	0.27
2	1.29	0.28	0.21	0.49
3	1.01	0.14	0.17	0.66
4	0.87	0.19	0.15	0.80
5	0.67	0.17	0.11	0.92
6	0.51		0.09	1.00

El componente principal 1 estuvo representado por las variables rutinarias PCR y lactato; en el segundo componente se presentan las variables producción de superóxido y saturación venosa de oxígeno; el tercer componente está fuertemente influenciado por la

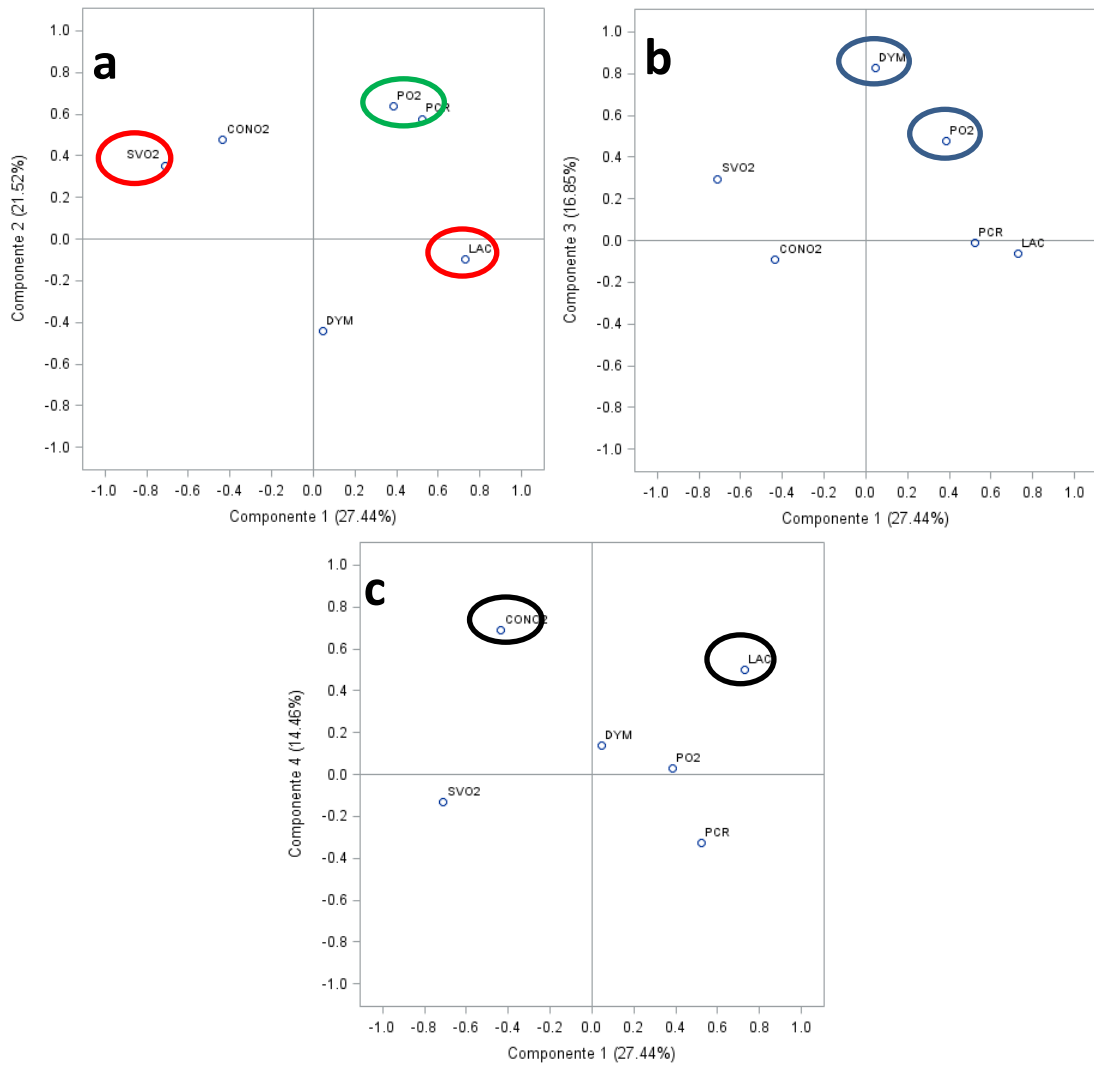
variable potencial de membrana y nuevamente la variable producción de superóxido y el cuarto componente marcado por la variable lactato y consumo de oxígeno, Tabla 5, Figs. 4 (a, b, c).

Con base en este resultado se puede decir que solo las variables consumo de oxígeno (mtVO₂) y producción de superóxido (mROS), muestran algún grado de correlación con las variables tradicionales de evaluación, proteína C reactiva, lactato y saturación venosa de oxígeno, siendo producción de superóxido una variable correlacionada de manera positiva con la PCR y consumo de oxígeno con lactato. El potencial de membrana muestra un comportamiento diferente al resto de las variables, pero con un peso importante en la descripción del estado del paciente, correlacionado con la producción de superóxido del paciente, lo que la convierte en una variable de interés para procesos de diagnóstico.

Tabla 10. Autovectores de los componentes principales de las variables PCR (PCR), lactato (LAC), saturación venosa de oxígeno (SVO₂) consumo de oxígeno (CONO₂), potencial de membrana (DYM) y producción de oxígeno (PO₂). Aparecen solo los valores absolutos más altos para cada componente principal (PRIN)

Variable	Prin1	Prin2	Prin3	Prin4
Lactato	0,57			0,53
PCR		0,51		
Saturación venosa de oxígeno	-0,55			
Consumo de oxígeno				0,74
DYM			0,83	
Producción de superóxido		0,56	0,47	

Figura 8. Biplots para los componentes principales 1, 2, 3 y 4, de las variables PCR (PCR), lactato (LAC), saturación venosa de oxígeno (SVO₂) consumo de oxígeno (CONO₂), potencial de membrana (DYM) y producción de oxígeno (PO₂); a) componente 1 contra componente 2; b) componente 1 contra componente 3; c) componente 1 contra componente 4. Las variables que representan cada componente están resaltadas con un óvalo: ◌ componente 1; ◌ componente 2; ◌ componente 3; ◌ componente 4.



Este análisis por componentes principales nos permite evaluar todas las variables practicadas en los pacientes críticos y efectuar una correlación entre las variables clínicas rutinarias y las variables de función mitocondrial medidas. De esta forma se pueden plantear posibles asociaciones cuyo valor predictivo puedan proporcionar herramientas para una mejor interpretación del paciente en estado crítico. Es de resaltar que ninguno de los componentes superó el valor para poder ser estadísticamente significativo y solo la sumatoria de todos llegó al 86%.

El primer componente, siendo el más fuerte, que se denominó *componente inflamatorio*, es entre PCR y mROS, óvalo verde, mostrando una correlación positiva; entre más producción de proteínas de fase aguda más producción de ROS mitocondriales y/o viceversa. En respuesta inflamatoria, es característico la producción hepática de proteínas de fase aguda mediada por IL6, específicamente PCR, tiene una importante propiedad diagnóstica de inflamación,

suficientemente validada en pacientes críticos (Lelubre C et al 2013). Ahora bien, el estrés oxidativo también característico en inflamación, potencia la producción de citoquinas (IL 6), vía NFκB (Schoonbroodt Set al 2000) promoviendo mayor producción de PCR.

El segundo componente, óvalo rojo, el cual se denominó *hipoxia celular*, correlaciona negativamente Lactato y SvO₂; entre más lactato se produzca menor es la saturación venosa de oxígeno, En la medida que aumenta el consumo de oxígeno (VO₂) -evidenciado por la disminución de la SvO₂- se favorece la formación de lactato ya sea por condiciones anaerobias, pero especialmente por la intermediación del HIF- 1α (Agani et al. 2000). Si se relaciona el *componente inflamatorio* (1: óvalo verde) y el componente *hipoxia celular* (2: óvalo rojo) se puede definir mediante esta relación de componentes el INMUNOMETABOLISMO. La necesidad energética elevada por la inflamación favorece vías metabólicas no dependientes de O₂ siendo mediado por mROS, los cuales activan a HIF-1 α.

El tercer componente, denominado *función mitocondrial*, óvalo azul, relaciona el ΔΨM y las especies reactivas mitocondriales. La tendencia, grafica B, es mantener un potencial alto con un aumento de las mROS. Este fenómeno se explica por la necesidad de producir, por parte de la mitocondria, especies reactivas, para lo cual su potencial aumenta, esto en la fase inicial de la respuesta inflamatoria; de persistir la injuria o de una función mitocondrial de base disminuida (enfermedades metabólicas de base), se inhibe la cadena respiratoria, ya sea por NO o por el HIF 1-α, pero este aumento de ROS intramitocondrial altera la funcionalidad de los poros transitorios de permeabilidad mitocondrial (mPTP: en inglés: mitochondrial permeability transition pore), favoreciendo la destrucción mitocondrial (Zorov DV et al, 2014).

Por último, el componente 4, óvalo negro, denominado *metabolismo mitocondrial*, relaciona el lactato (variable clínica) y el mtVO₂ (variable citométrica); en la gráfica C, se observa una correlación negativa, entre más lactato es producido menor es el consumo mitocondrial de oxígeno, condición con toda lógica y con mucho sentido, que corrobora, el aislamiento mitocondrial en condición crítica mediado principalmente por HIF-1α, aunado a el papel regulador de la mitocondrial a partir de la producción de ROS.

En síntesis, el análisis por componentes permitió relacionar las variables clínicas y citométricas en aspectos de la respuesta inflamatoria y el consumo de oxígeno, evidenciando algunas tendencias interesantes para evaluar, pero sin poder diagnóstico estadístico.

7. DISCUSIÓN

La valoración en vivo y en tiempo real de la función mitocondrial en células del sistema inmune provee una excelente herramienta para elucidar la tendencia de su comportamiento en la respuesta inflamatoria aguda. Es evidente el papel de la disfunción mitocondrial en respuesta inflamatoria. Adicional a las teorías ya mencionadas, en consenso actualmente se determinan cuatro condiciones que específicamente en SIRS/Sepsis alteran la función mitocondrial (Singer M et al, 2014), como son la *perfusión celular alterada*, secundaria a pérdidas tanto intrínsecas como extrínsecas de líquido y depresión miocárdica principalmente, que conllevan a un aporte de O₂ inadecuado para que se mantenga la cadena respiratoria (OXPHOS). La *producción de cantidades exageradas de especies reactivas de Oxígeno y de Nitrógeno*, que bloquean la cadena respiratoria mitocondrial y destruyen su membrana. Los *trastornos hormonales*, propios de la respuesta inflamatoria, que afectan su función, específicamente las alteraciones tiroideas (Goglia F et 2002), en donde el hipertiroidismo inicial de la sepsis afecta la función mitocondrial y, por último, y no menos importante la *infra regulación de los genes de transcripción de las proteínas mitocondriales* en la fase inicial de la respuesta inflamatoria.

Estas condiciones resaltan cómo la producción de especies reactivas mitocondriales (mROS), el consumo de oxígeno mitocondrial (mtVO₂) y el potencial de membrana ($\Delta\Psi$ M) son propiedades importantes de la función mitocondrial en respuesta inflamatoria sistémica. Basado en lo anterior, este estudio se planteó como objetivo general, establecer la relación entre la actividad mitocondrial y los parámetros clínicos convencionales de hipoxia y estrés metabólico, en linfocitos de una cohorte de pacientes durante las primeras 24 horas de su condición crítica.

Los resultados del presente trabajo demostraron que la producción de mROS esta incrementada en las primeras 24 horas de estrés agudo siendo este resultado estadísticamente significativo. Hasta la fecha, es escasa la literatura científica que reporte la medición de producción de mROS en pacientes críticos. De hecho, en las guías actuales de Sepsis no se contempla este aspecto como factor clave de evaluación en esta población de pacientes (Singer M et al, 2016).

Una explicación a estos hallazgos está basada en el hecho que la producción de mROS por la mitocondria “séptica” este dado en el complejo I, que produce el superóxido por una

transferencia reversible de electrones desde el complejo II bajo la oxidación del succinato en ausencia de NADH (Lenaz G et al, 2006). Durante SIRS/Sepsis, la disminución de OXPHOS desvía electrones de la cadena transportadora al ciclo de Q, favoreciendo la producción exagerada de anión superóxido, hallazgo confirmado en este estudio.

La producción de mROS está ligada con el $\Delta\Psi_M$, y existen 4 mecanismos de regulación de la producción de mROS en la cadena respiratoria; en escenarios de inflamación aguda, estos se encuentran relacionados con STAT3, JNK, Óxido Nítrico y p66Shc, como fueron mencionados anteriormente.

Es reconocido que entre más oxígeno se consuma mayor es la producción de ROS, sin embargo, a la fecha, la relación $mtVO_2/mROS$ *in vivo* es incierta, estudios *in vitro* reportan resultados contradictorios, mostrando correlaciones positivas, negativas o en algunos casos de ningún tipo. En sepsis la mayoría de las mediciones de mROS son *in vitro*, e *in vivo*; la medición se basa en sustratos resultantes del estrés oxidativo o por la disminución de AOX.

Previos estudios han encontrado en pacientes sépticos niveles de Superóxido dismutasa (SOD) y catalasa aumentados en comparación con sujetos sanos, este aumento se explica por el aumento de ROS en los pacientes sépticos; de hecho, en los pacientes que fallecen se observan niveles altos de SOD (Warner A et al, 1995). Otros estudios en sepsis han reportado niveles elevados de oxidación lipídica, proteica y de ADN asociados al consumo concomitante de AOX (Andresen M et al, 2006).

Aun no es claro cuáles marcadores de estrés oxidativo son los que mejor se correlacionan con la evolución clínica del paciente crítico. Este estudio proporciona una de las primeras evaluaciones *in vivo* de la producción de mROS (superóxido) en pacientes críticamente enfermos, caracterizando inicialmente y de forma más representativa la participación de la mitocondria en la respuesta inflamatoria.

El papel de estos mROS, es de continua investigación, y se piensa que tienen tres objetivos fundamentales:

- a. una función de defensa, a partir de la actividad moduladora de NADPH de los mROS en las células inmunes y en el endotelio, influenciando la actividad bactericida (Dikalov SI et al, 2012).
- b. Aumentar la producción de citoquinas inflamatorias y participan en la regulación de la activación de linfocitos T (Kaminski M.M. et al, 2012). Estos resultados confirman

como los linfocitos son el grupo celular que más produce mROS en pacientes críticos, hallazgo que insinúa que existe un mecanismo de retroalimentación para su activación hasta ahora no completamente establecido.

- c. Integrantes claves de la red de señalización celular inflamatoria mitocondrial, la cual se discutirá más adelante.

Este estudio no evidenció alteraciones significativas en el mtVO₂, sin embargo, sí existe una clara tendencia a incrementar el consumo de oxígeno en las primeras 24 horas y este patrón se observa más pronunciado en los pacientes que fallecieron. Para nuestro conocimiento, a la fecha no se ha reportado un estudio que mida el consumo de oxígeno mitocondrial de forma directa en pacientes sépticos, contra el cual se pueda comparar. De hecho, la mayoría de los estudios evalúan el consumo de oxígeno mitocondrial a partir de la generación de ATP en mitocondrias aisladas de modelos animales con sepsis. Por lo tanto, no existe una relación consistente entre SIRS/Sepsis y compromiso respiratorio mitocondrial; de hecho, dada la variabilidad de la función respiratoria encontrada, se puede afirmar que el compromiso de la respiración mitocondrial es un fenómeno tardío y no inicial de la respuesta inflamatoria sistémica.

El compromiso circulatorio del SIRS, que impacta negativamente la perfusión local favoreciendo la hipoxia tisular, explicaría la alteración de la función respiratoria mitocondrial más que una falla intrínseca y esto se observa ya en fases tardías. En humanos, se han evidenciado niveles bajos de ATP en linfocitos de pacientes sépticos, en donde los sobrevivientes presentaban 2 veces más niveles de ATP en comparación con los que fallecieron (Lawrence K.L et al, 2010). Es así que, la tendencia apunta a que el trabajo mitocondrial se aumenta con el estímulo y activación de PRRs, y el incremento del mtVO₂ persigue fortalecer la formación de mROS y dependiendo del compromiso circulatorio e hipoxia local, se ve comprometido en fases tardías de la respuesta inflamatoria.

Este estudio tampoco mostró una alteración del $\Delta\Psi_M$ en pacientes críticamente enfermos. El potencial de membrana refleja la función mitocondrial y es un indicador confiable del estado energético de la mitocondria, se emplea para evaluar la cadena respiratoria y el sistema de transporte de electrones.

Por citometría de flujo, se han caracterizado alteraciones del $\Delta\Psi_M$ en enfermedades crónicas tales como Diabetes Mellitus, Artritis Reumatoide, Lupus Eritematoso Sistémico y Enfermedad Renal Crónica terminal (Yamakawa K et al, 2013).

Adrie y cols (2001) evaluaron en 18 pacientes con sepsis severa, el $\Delta\Psi\text{M}$ en Monocitos (citometría de Flujo con JC-1), encontrando que el 45% de los monocitos de los pacientes sépticos presentaban una pérdida del potencial de membrana comparado con un control de sujetos sanos a las 24 horas y a las 72 horas, aún más dramático en la población de pacientes que fallecieron se mantuvo esta pérdida del potencial en comparación con los pacientes que sobrevivieron quienes sus células recuperaron en más de un 30% el $\Delta\Psi\text{M}$. Yamakawa y cols en 2013, evaluaron el $\Delta\Psi\text{M}$ en plaquetas de 36 pacientes sépticos, y encontraron que la pérdida del potencial se correlaciona con scores de severidad elevados (SOFA y APACHE II) así como con niveles de marcadores séricos elevados (lactato) y concluyen como la pérdida del $\Delta\Psi\text{M}$ de las plaquetas circulantes en pacientes sépticos se puede asociar con la progresión de la respuesta inflamatoria.

En el 2014, Grundler y cols, determinaron el $\Delta\Psi\text{M}$ en plaquetas de pacientes sépticos encontrando una correlación con la severidad de la condición clínica de los pacientes, proponiendo esta medición del $\Delta\Psi\text{M}$ como un marcador confiable para establecer la severidad de la enfermedad y para formular pronóstico de sobrevida.

Se puede entonces afirmar que la pérdida del $\Delta\Psi\text{M}$ es un fenómeno que determina un punto irreversible de daño mitocondrial durante la respuesta inflamatoria.

Los estudios en humanos anteriormente mencionados no discriminaron en la inclusión de los pacientes si existía una condición de base que implicara ya un daño mitocondrial previo. En el presente estudio y durante las primeras 24 horas post injuria se mantuvo el $\Delta\Psi\text{M}$; es muy probable que, al no cursar con enfermedad previa, durante estas primeras horas críticas, exista una conservación del potencial de membrana que permita la reserva funcional mitocondrial.

Por último, la correlación con escalas de medición rutinarias clínicas, encontró que la producción de mROS se asocia con una severidad clínica de la enfermedad en asociación al SOFA, siendo esta asociación estadísticamente significativa. El incremento en la producción de mROS se asocia con una condición de severidad elevada lo que le otorga la capacidad de ser un apropiado predictor de mortalidad. (Yamakawa y cols 2013; Grundle y cols 2014).

En cuanto a las escalas clínicas de severidad y a los marcadores clínicos rutinarios, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la producción de mROS y el lactato sérico y una interesante tendencia entre la producción de mROS y altos puntajes de SOFA.

Estos hallazgos son consistentes con lo reportado en la literatura. Montini L y cols en el 2016, quienes desarrollaron el único, a la fecha, estudio prospectivo observacional que relaciona metabolitos de estrés oxidativo, SOFA score y niveles de Lactato sérico en 25 pacientes sépticos, a quienes les practicaron mediciones seriadas de metabolitos de especies reactivas de oxígeno, encontrando un descenso significativo de estos metabolitos en los pacientes que fallecieron, atribuyendo estos hallazgos a una falla energética mitocondrial asociado a niveles de lactato sérico elevados y puntajes de SOFA altos. Este fenómeno lo explicaron por una alteración persistente del consumo de oxígeno mitocondrial.

Ferreira y cols en el 2001, demostraron que el mayor puntaje de SOFA calculado sobre el tiempo de la estancia en cuidado intensivo podría identificar el punto crítico en donde los pacientes exhiben el mayor grado de disfunción orgánica, siendo un valor mayor o igual a 11, un predictor confiable de mortalidad, cercano al 80%.

Los pacientes evaluados en este estudio que finalmente fallecieron presentaron un puntaje de SOFA promedio de 10.1, confirmando su excelente capacidad predictiva.

Respecto al Lactato sérico como marcador inflamatorio, estudios clásicos determinan que un valor > 4 mmol/lit tiene una mortalidad cercana al 80%, ya sea por inadecuado aclaramiento del mismo o por una excesiva producción (Mikkelsen M et al, 2009). De tal forma la interpretación de los niveles de lactato sérico debe basarse en la condición clínica del paciente, porque no solo se usa como predictor de mortalidad, también se puede usar como parámetro clínico para implementar estrategias terapéuticas, similar a la interpretación de la producción de mROS. Esto se basa en la medición de sus niveles al ingreso al servicio de urgencias o a la unidad de cuidado intensivo. Bajo esta consideración niveles de lactato entre 2 mmol/lit y 3 mmol/lit tienen una probabilidad de muerte del 18% en ausencia de shock y de 38% en presencia de shock.

Por lo tanto, su valor de inicio y el aumento progresivo de sus valores si denotan una situación irreversible similar a la condición energética de producción en aumento de mROS y de pérdida del $\Delta\Psi_M$.

Los pacientes de este estudio al ingreso presentaban valores de lactato mayores a 2 mmol/lit (media de 2.2) y los pacientes que fallecieron presentaron un valor lactato mayor a 2 mmol/ lit (media 2.6) en comparación con los que sobrevivieron cuyos valores descendieron a menos de 2 mmol/l (media 1.6 mmol/lit), datos que respaldan no solo su estado inflamatorio

sino la severidad de la enfermedad ya reportada con los altos puntajes de SOFA. Esto permite evaluar la asociación existente entre mROS y el lactato sérico en la respuesta inflamatoria sistémica.

Teniendo en cuenta que el aumento de la producción de lactato no solo obedece al predominio de un metabolismo anaerobio, sino que también se constituye como un marcador de inflamación severa, sus niveles elevados al inicio pueden ser premonitores de la instauración de FOM. En escenarios de respuesta inflamatoria la literatura científica es limitada que describa la asociación entre ROS y la producción de lactato, no obstante, en escenarios de cáncer si existe una asociación directa entre las mROS y la formación de Lactato.

Se sabe que mROS activan glucólisis mediada por Insulina y aumenta la expresión de PKM2 (piruvate kinase 2: en ingles) (Li Q et al, 2014). A este respecto, se ha demostrado como la mitocondria puede oxidar el lactato producido gracias a la incorporación del lactato a la mitocondria a través de la MCT1 (transportadores de monocarboxilatos), siendo mROS los principales impulsores de MCT.

Una vez se introduce el lactato a la mitocondria, este se oxida, fenómeno que explica la capacidad que tiene la mitocondria de aclarar lactato, lo cual es evidente en deportistas de alto rendimiento. Mecanicamente, el lactato estimula la producción de ROS, quienes activan al factor nuclear de transcripción kappa beta (NF- κ β), al factor nuclear eritroide (NF-E2), al factor respiratorio nuclear (NRF-2) y al elemento de unión de proteínas dependiente de cAMP (CREB) quienes favorecen la expresión de MCT1 (Hashimoto T, et al 2008).

En el 2015, un grupo de 23 expertos de los cinco continentes con notable experiencia clínica y científica (Arulkumaran N et al, 2016), plantearon 5 interrogantes con el propósito de establecer el papel de la fisiología mitocondrial en enfermedad aguda y critica. Basados en la revisión de la literatura y el consensó de los expertos, se formularon las siguientes preguntas:

1. ¿Es la mitocondria la iniciadora, amplificadora, víctima o testigo inocente de la disfunción orgánica en sepsis?
2. ¿Sobre la base del daño mitocondrial en sepsis, el mecanismo responsable está relacionado con su función bioenergética, OXPHOS (Fosforilación oxidativa dependiente de O₂), su función reguladora de muerte celular, por su capacidad de señalización celular (mediadas por ROS)? ¿Cuál es la relación entre la función alterada del endotelio y la falla orgánica?

3. Hasta qué punto una disrupción de la dinámica mitocondrial y de la homeostasis contribuyen con la disfunción celular y orgánica en sepsis?
4. ¿Las respuestas “adaptativas celulares” y “mal-adaptativas orgánicas” se contraponen y determinan la disfunción orgánica y la recuperación a largo plazo en sepsis? ¿Las diferencias órgano-específicas en esta dualidad determinan los desenlaces?
5. ¿Cuáles son las oportunidades y objetivos terapéuticos mitocondriales para posible intervención?

Como conclusiones de esta reunión de expertos, en breve, plantean que la relación entre falla orgánica y disfunción mitocondrial no está completamente esclarecida. El estrés oxidativo contribuye a la disfunción mitocondrial pero irónicamente la mitocondria es la principal fuente de formación de ROS. En este contexto la mitocondria tiene un rol dual, la respuesta inflamatoria afecta su función, pero es un activador determinante tanto como iniciador como propagador de respuesta inflamatoria y esto a través de mROS, como moléculas de señalización. Los mROS son activadores importantes de factores de transcripción claves en inflamación tales como HIF-1 α , NF κ -B, p53, y AMPK, y surge el interrogante si las señales mitocondriales pueden ser responsables de la supresión de la función celular, posiblemente como un mecanismo de adaptación celular para preservar la sobrevivencia de la célula. Otro rasgo de la inflamación aguda es el alto consumo de O₂ (VO₂), que también afecta el metabolismo celular. La hipoxia resultante compromete la función mitocondrial, activa factores propios de la hipoxia, como el HIF-1 α , quien a su vez bloquea la función energética mitocondrial.

Surge entonces la necesidad de identificar métodos de evaluación de su función cuyo valor predictivo sea óptimo, y estos expertos resaltan la necesidad de evaluarla “*in vivo*”. La mayoría de los estudios de la función mitocondrial son en células o muestras *ex vivo*, lo cual fundamenta todo lo anterior planteado, pero no permite mayor profundización sobre su dinámica real.

Los resultados de este estudio, contribuyen a responder algunos de los interrogantes planteados en esta reunión de expertos.

La mitocondria no es víctima ni testigo de la respuesta inflamatoria, es amplificadora de la respuesta inflamatoria aguda, en enfermedades crónicas es iniciadora (Molnar MJ et al 2017), el estímulo agresor sea infeccioso mediado por PAMPS o por daño celular mediado por DAMPS, converge en la activación de receptores TLR y llega a la mitocondria, en este punto según la intensidad y especialmente a partir de su funcionalidad de base, la mitocondria cataliza

esas señales y se convierte en el regulador de la inflamación ya sea para fortalecer la respuesta o para determinar el destino celular a partir de la activación de muerte celular, estos mecanismos a la fecha no han sido completamente establecidos pero es evidente que la formación de mROS es la primera forma de expresión de la intervención mitocondrial.

Se puede afirmar que la participación de la mitocondria en estrés agudo se da por fases; basados en los hallazgos de este estudio se puede afirmar que la primera fase de participación es mediante la producción de ROS. Esta fase inicial pretende no solo defender a la célula sino especialmente desarrollar y generar redes de comunicación celular que activen otras líneas de defensa; en este punto, la autorregulación mitocondrial es motivo de profundización investigativa. La necesidad energética inicial es de metabolismo glucolítico y en este punto la mitocondria queda excluida; la cadena respiratoria se bloquea, principalmente por HIF-1 α , que a su vez ya puede estar previamente activado por la hipoxia local y la producción incrementada de mROS (evidenciada por los resultados de este trabajo), existe una tendencia en el aumento del mtVO₂, y este consumo aumentado de O₂ en condiciones de vasoconstricción local favorece un ambiente de hipoxia local, que también activa al HIF-1 α .

No obstante, esta vía también es limitada porque una vez el estímulo agresor se ha controlado, como lo insinúan estos resultados, la producción de mROS, disminuye de la mano con la disminución del mtVO₂, tabla 5, pacientes que sobrevivieron; la respuesta contra-reguladora depende completamente del metabolismo oxidativo mitocondrial, resaltando la necesidad de evaluar la función de activadores mitocondriales, específicamente Sirtuinas.

En este punto, se generan importantes interrogantes, es evidente que la respuesta pro inflamatoria no controlada genera falla orgánica y más muerte; de la misma forma, una respuesta contra-reguladora no controlada genera falla orgánica tardía y muerte, es entonces importante establecer si los mecanismos de regulación energética (AMPK) y de regulación mitocondrial (Sirtuinas) funcionan de forma adecuada en cada estado de la respuesta inflamatoria, dentro de los cuales la mitocondria continua siendo el efector local y su función, depende los anteriores.

Se puede advertir que una pérdida de la regulación mitocondrial en sepsis y SIRS es responsable de la falla energética celular y muerte.

Por último, es innegable que se deben explorar intervenciones sobre la función mitocondrial en el paciente crítico; ahora bien, la intervención debe ir más allá del bloqueo

mitocondrial para la formación de ROS o en la repleción de agentes antioxidantes. Esta iniciativa tendría toda la lógica si solo se considera a los mROS como agentes deletéreos, pero es evidente que su única función no es de defensa y que abolirlos bloquearía la activación de vías necesarias para una adecuada defensa celular. Un estrés oxidativo irreversible, denota un estado refractario de inflamación, que se asocia a una alta tasa de mortalidad (Tabla5). Es por esto, que la intervención apuntaría más a activar los factores promotores de la función mitocondrial buscando su regulación funcional, y serían los tres principales:

- a. AMPK, estudios en modelos de sepsis, muestran como la activación de AMPK modula la respuesta inflamatoria desencadenada por PAMPS (Lipopolisacaridasa) (Escobar DA et al, 2015),
- b. Sirtuinas, en donde en modelos de sepsis inducidas por PAMPS, la activación de Sirtuinas (Sirt1) (Resveratrol) reprime la transcripción de citoquinas inflamatorias (TNF- α) y atenúa la respuesta inflamatoria en sepsis (Chen GD et al, 2016).
- c. HIF-1 α , inhibición de este factor ha mostrado reducción en la activación de vías de inflamación como el NF κ B (Wilczynski J et al, 2011) en modelos de cáncer especialmente. No obstante, el ambiente metabólico del cáncer se asemeja en varios aspectos al del paciente crítico.

8. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.

Este estudio ha mostrado cómo en las primeras 24 horas de inflamación aguda en personas previamente sanas, bajo una noxa inflamatoria aguda (inflamatoria e infecciosa), la mitocondria eleva la producción de mROS y de lactato, denotando una respuesta inflamatoria sistémica mediada por la mitocondria como principal regulador celular quien recibe las señales

de peligro (aferencias) y traduce la señal y genera según el caso otras señales. Esta mediación mitocondrial en la primera fase de inflamación esta mediada por los mROS con correlación clínica con Lactato y SOFA scores altos.

Este es el primer estudio que mide, en tiempo real en células inflamatorias, la producción de mROS y la compara con sujetos sanos. Esta producción en las primeras 24 horas, en pacientes previamente sanos revela como las ROS son la forma más determinante por medio de la cual la mitocondria participa en la respuesta inflamatoria sistémica. Es así que, la activación mitocondrial por ROS es clave en la alteración de la función de este organelo y son probablemente los mROS los agentes que conectan al metabolismo con la respuesta inmunológica, constituyéndose en la primera línea de respuesta de la mitocondria ante una injuria aguda y los mecanismos que desencadenan imponen un aumento del consumo de oxígeno. Estas afirmaciones son corroboradas por el hallazgo de una asociación de severidad de la enfermedad directamente proporcional a la producción de mROS en el paciente crítico y a marcadores clínicos de inflamación como el lactato.

La intervención mitocondrial en la injuria aguda está dada por fases, en la fase inicial de respuesta la viabilidad de la mitocondria se mantiene intacta, esto a partir de un potencial de membrana conservado, siempre y cuando no exista de base un déficit de funcionalidad por patologías metabólicas. La sobrecarga mitocondrial aunado a una pérdida de su regulación son los responsables de la intervención mitocondrial no como promotor de señales sino como determinante de muerte celular a partir de la activación de vías de muerte celular, tanto intrínsecas como extrínsecas.

Es entonces la activación mitocondrial por ROS una de las claves de su participación en respuesta inflamatoria y son precisamente las mROS los agentes que conectan al metabolismo con la respuesta inmunológica.

A continuación, se propone un esquema que detalla la función mitocondrial en la respuesta inflamatoria sistémica, y se discuten todos los mecanismos de regulación mitocondrial que conectan a la Inflamación con el Metabolismo.

Figura 9. Activación mitocondrial por alarminas en la respuesta inflamatoria

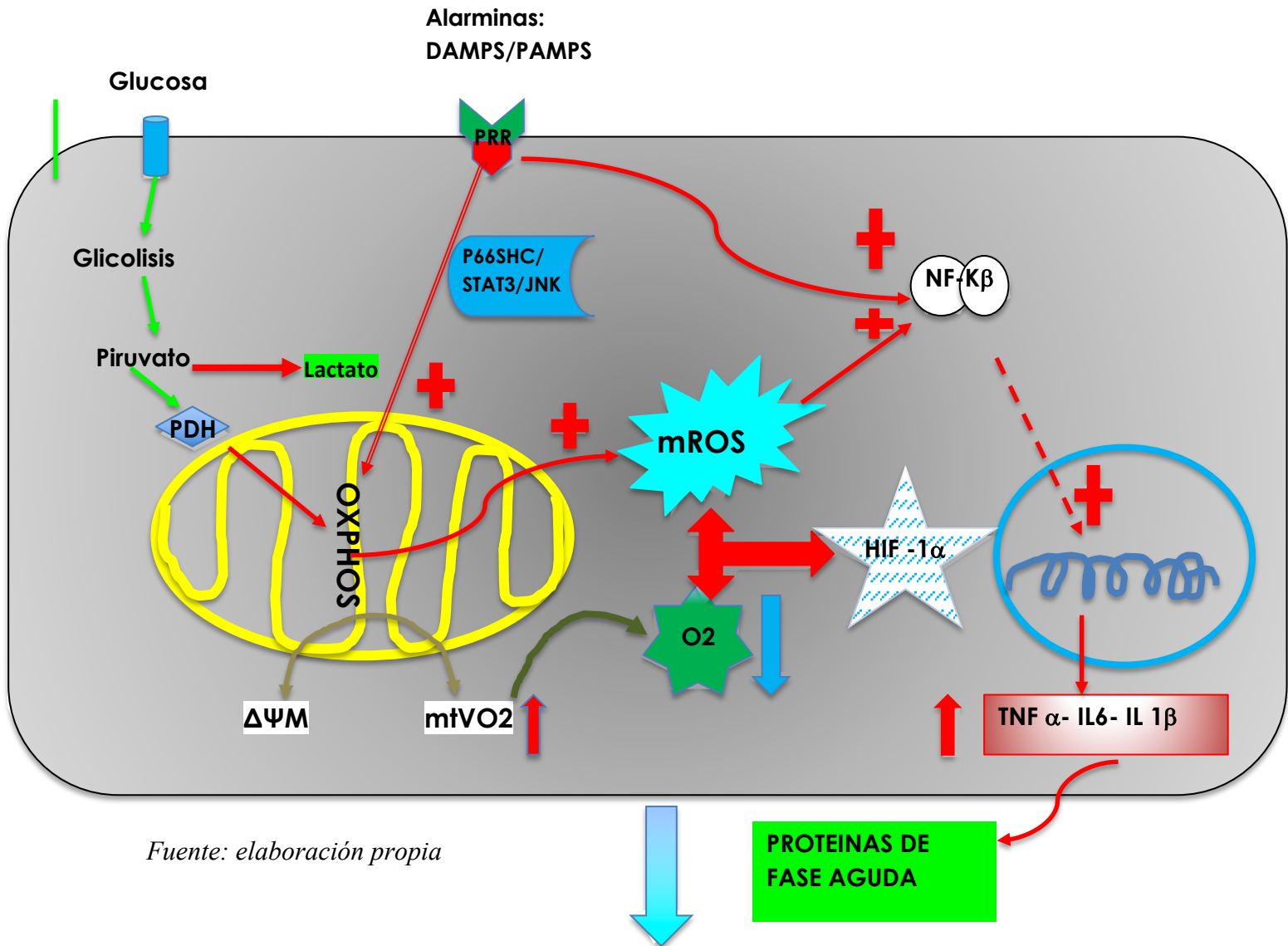
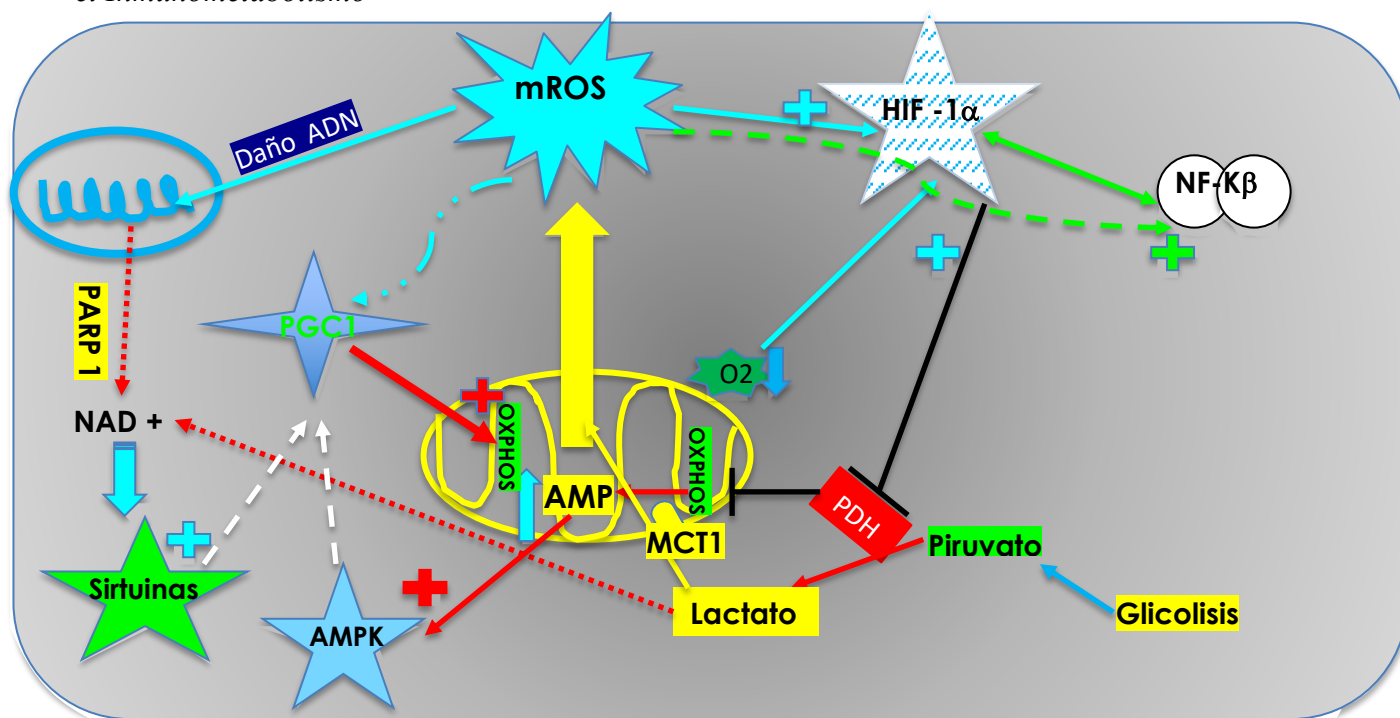


Figura 10. Papel de los mROS en la respuesta inflamatoria sistémica. Bases celulares para el Inmunometabolismo



Fuente: elaboración propia

Ambos esquemas representan la participación mitocondrial en las primeras 24 horas de estrés inflamatorio. En la Figura 9, se resume la activación mitocondrial por alarminas con la producción de mROS, asociado al aumento de mtVO₂ que favorece la activación de la HIF 1 α . La figura 10 enumera las vías de regulación mitocondrial en donde los mROS tiene un papel regulatorio. Ilustra las conexiones del Inmunometabolismo.

Hace más de treinta años se identificó la importancia del metabolismo en el funcionamiento de las células inmunes, destacando el uso de ciertos sustratos por parte de neutrófilos, células dendríticas y Linfocitos T, para su adecuado funcionamiento, centrándose en la producción y biosíntesis energética, especialmente durante su activación en donde las demandas energéticas están elevadas con una subsecuente falla energética que favorece muerte celular y amenaza la sobrevivencia del paciente (Hotchkiss et al, 1992). Esta relación estrecha entre la respuesta inmune y el metabolismo se denomina **INMUNOMETABOLISMO** (Oren et al, 1963), que define las alteraciones en metabolitos que ocurren durante la activación de las células del sistema inmune y muestra como los metabolitos están directamente relacionados con las funciones efectoras de estas células inmunes.

La mayoría de las principales vías metabólicas están directamente involucradas en la activación del sistema inmune posterior a exposición a los patrones de daño.

De éstas, es la glicólisis, la vía metabólica más activa durante la respuesta inflamatoria por su velocidad en producción de energía (ATP); por lo anterior, la mayoría de las células inmunes cambian a un metabolismo glucolítico una vez se activan (O'Neill et al, 2016). El metabolismo glucolítico permite a las células inmunes generar suficiente ATP e intermediarios biosintéticos para realizar sus funciones efectoras. Para los macrófagos esto incluye fagocitosis y producción de citoquinas inflamatorias, para las células Dendríticas esto incluye una adecuada presentación antigénica y para los linfocitos T esto incluye la producción de citoquinas efectoras (tales como IL-17 en el caso de células T_H17) (Shi LZ et al 2011). Consistente con el metabolismo de otras células no proliferativas, las células nativas T no activadas (no expuestas a antígeno) mantienen unas bajas tasas de glucólisis y de forma predominante oxidan glucosa originando Piruvato, el cual se dirige vía Fosforilación Oxidativa (OXPHOS) o de forma alterna se respaldan en la oxidación de ácidos grasos para la producción de ATP. Posterior a su activación, las células T se reprograman a un crecimiento anabólico y a una acumulación de biomasa para generar células hijas, quienes por definición exhiben demandas aumentadas de energía y de otras fuentes metabólicas. En este estado las células T son consideradas metabólicamente activadas.

La señalización vía receptor de células T (TCR: en inglés: T cell receptor) gobierna la reprogramación metabólica de las células T nativas. La activación vía TCR supra-regula los transportadores de Glucosa y Aminoácidos (Frauwirth KA et al. 2002, Carr EL et al 2010), facilitando la captación de nutrientes y las blastogénesis de células T. En este contexto el fenotipo metabólico de las células T activadas está dado por una dependencia energética a partir de glicólisis aeróbica (Maclver NJ et al, 2013), y las vías catabólicas de generación de ATP tales como la beta-oxidación de ácidos grasos se suprimen de forma activa (Wang et al, 2011). Células $CD4^+$ y $CD8^+T_{EFF}$ despliegan más glucólisis, caracterizada por la conversión de glucosa derivando Piruvato a Lactato desestimando la disponibilidad de O_2 para su completa oxidación. La dependencia energética no es del 100% de glicólisis; tasas de OXPHOS se mantienen en las células T, sin embargo, la producción de Lactato a partir de Piruvato es la vía predominante en el metabolismo glucolítico en las células T, especialmente en células T_{EFF} (Wang et al, 2011).

Esta “preferencia” celular al metabolismo glucolítico, el cual en términos energéticos es el menos eficiente, en comparación con el oxidativo, dado que por molécula de glucosa provee 2 ATP comparado con OXPHOS que da una ganancia neta de 36 ATP, actualmente se establece que esta mediado por la interacción y activación de HIF-1 α , de AMPK y la participación de Sirtuinas.

HIF-1 α es un factor de transcripción que actúa como regulador clave en la homeostasis del oxígeno celular. Cientos de genes están regulados por el HIF-1 α (Semenza GL 2007). Este factor es un heterodimero que consiste en dos unidades (α y β): ambas subunidades se expresan constitutivamente, pero la subunidad α es constantemente degradada en presencia de oxígeno. En condiciones de normoxia, HIF-1 α es continuamente sintetizado y degradado por hidroxilación de 2 residuos de prolina mediante las enzimas *prolyl hydroxylases 1-3*. Estas enzimas utilizan oxígeno, Fe y α -ketoglutarato (del ciclo de Krebs) como sustratos. Luego de que el HIF-1 α se hidroxila, las proteínas de von Hippel Lindau lo reconocen y es marcado para degradación (Ivan M et al 2001). Durante periodos de hipoxia, la baja concentración de oxígeno impide esta reacción y el HIF-1 α no se degrada y se acumula rápidamente.

Este factor no solo participa en la homeostasis del oxígeno también participa en la regulación del metabolismo energético (Schumaker PT, 2005). Activa la transcripción de genes que codifican para transportadores de membrana de glucosa y virtualmente todas las enzimas de la vía glucolítica de oxidación de la glucosa; una manera de compensar la pérdida de eficiencia en la producción de ATP. Bajo condiciones de hipoxia tisular existe un aumento mediado por HIF-1 α en los niveles de ARN mensajero (ARNm) que codifican para enzimas glucolíticas, pero también un descenso coordinado en los niveles de ARNm de la cadena de OXPHOS que prioriza la síntesis de ATP anaeróbica sobre la aeróbica. Durante periodos de hipoxia, el HIF-1 α induce la expresión de quinasas, que regulan negativamente la unidad catalítica de la PDH mediante activación de la PDHK (Piruvato deshidrogenasa quinasa). De esta manera, el Piruvato es derivado fuera de la mitocondria debido a la inhibición de la PDH, lo que disminuye la respiración mitocondrial, mientras que la enzima LDH es inducida y la producción de lactato se encuentra aumentada (Semenza GL 2007).

La inhibición de la PDH por parte de HIF-1 α no solo se observa en condiciones de hipoxia, también se observa en estados de inflamación (Albina JE et al, 2001). Estudios observacionales han demostrado cómo sus concentraciones se encuentran aumentadas en macrófagos y monocitos estimulados con PAMPs (Lipopolisacaridasa) bajo condiciones de normoxia (Blouin CC et al 2004), a partir de la activación de los receptores TLR 4 (Toll Like Receptors) con la participación del factor nuclear Kappa Beta (NF κ B). La expresión de HIF-1 α en respuesta a PAMPs media la inducción de TNF - α (Kim HY et al 2007) y el aumento en los niveles de IL-1, IL-6 e IL-12 (Peyssonnaud C et al. 2007), lo que implica que no solo participa activamente en la regulación del metabolismo energético, sino también participa como

potenciador de la respuesta inflamatoria en sepsis. La interacción mitocondria y HIF-1 α es estrecha, este último no solo inhibe su función (a partir del bloqueo de la OXPHOS por inhibición de la PDH) sino que adicionalmente puede ser activado en condiciones de normoxia por mROS (Agani et al. 2000).

En este contexto, la mitocondria se convierte en un regulador maestro de señalización de peligro. Bajo esta perspectiva se considera como un sistema complejo de sensores que detectan perturbaciones de la homeostasis intracelular, incluido estrés oxidativo, la disminución o desabastecimiento de factores de crecimiento e/o infecciones (especialmente virales). Desde esta posición central la mitocondria responde al estrés leve o moderado orquestando respuestas adaptativas dirigidas a restablecer la homeostasis, pero si el daño es irreparable, transforma estas señales de peligro en ejecución de muerte celular (Galluzzi L et al. 2012). Adicionalmente no solo procesa señales externas de peligro sino también genera señales internas que alertan a la célula sobre situaciones de peligro o estrés celular. Las principales señales mitocondriales internas de peligro son el ADN mitocondrial (mtDNA) y mROS, considerados actualmente como DAMPS (Krisiko DV et al. 2011). Mecánicamente, en condiciones de estrés oxidativo e hipoxia, las mitocondrias se agrupan alrededor del núcleo para inducir modificaciones oxidativas al promotor del Factor de Crecimiento Vascular-Endotelial (VEGF en inglés); esta condición activa al HIF-1 α (Al-Mehdi A B et al 2012). Un estrés exagerado y continuo conlleva a la disfunción mitocondrial con la subsecuente acumulación de AMP; dadas las condiciones subóptimas de respiración, se favorece la activación de AMPK (Egan DF et al. 2010) y los procesos de mitofagia, ya descritos.

Lo anterior resalta el papel protagónico de la mitocondria en estrés inflamatorio advirtiendo sobre, cómo su adecuada función permite una óptima respuesta inflamatoria. Es por lo tanto, la regulación del metabolismo energético el factor determinante que provee a las células T y a otras células del sistema inmune, la capacidad de alternar de forma reversible entre estados quiescentes y estados de alta proliferación orquestando una respuesta inflamatoria de calidad, capaz de contener la noxa sin exagerar su expresión.

Otra de las principales reguladoras energéticas celulares es AMPK (Adenosine monophosphate-activated protein kinase) (Hardie DG et al. 2011). AMPK es una proteinquinasa altamente conservada que existe en todas las células eucarióticas en la forma de complejos heterotriméricos que comprende unas subunidades catalíticas α y unas subunidades reguladoras β y γ , cuyo rol es dual. Primero, es un sensor muy fino de las alteraciones de la

homeostasis energética a partir de la monitorización de la proporción de monofosfato de adenosina (AMP) y de ATP. Niveles de AMP elevados, especialmente en sepsis (Whelan SP et al, 2014) sugieren un incremento en el recambio de ATP y predicen una depleción energética celular. Segundo, su activación por la relación AMP-ATP modula la actividad y la expresión de enzimas reguladoras claves en el control del consumo de energía y en las vías de generación de la misma (Hardie DG et al, 1998). Esta quinasa en esencia regula la utilización energética y promueve la homeostasis energética celular; restaura la homeostasis energética a partir de la activación de vías catabólicas que generan ATP de forma eficiente, mientras desactiva procesos consumidores de energía tales como biosíntesis y progresión del ciclo celular (Jones RG et al, 2005). Los procesos catabólicos activados por AMPK incluyen la expresión de genes involucrados en el metabolismo oxidativo mitocondrial, así como en la biogénesis de la misma, efecto mediado por modificación covalente de PGC-1 α , quien está íntimamente relacionada con PGC-1 β (Lin J et al. 2005). AMPK desencadena tanto fosforilación como de-acetilación de PGC-1 α , catalizada por SIRT 1 (Sirtuina 1); estos efectos de AMPK sobre Sirt1 están posiblemente mediados por un aumento de NAD⁺, proporcionado por el metabolismo glucolítico. De igual forma AMPK inactiva casi todas las vías anabólicas, incluyendo la síntesis de lípidos, polisacáridos, ARN ribosomal y proteínas.

Las Sirtuinas son una familia de proteínas altamente conservadas, pertenecientes a la familia de enzimas Clase III deacetilasas de histona NAD⁺ (dinucleotido de adenina y nicotinamida) dependientes. Actualmente se reconocen 7 Sirtuinas con estructuras proteicas diferentes y propiedades funcionales únicas. Dada su necesidad de NAD⁺ como cosustrato para su actividad deacetilasa (mediada por el gen SIR2: gen silente regulador de la información (Klar AJS et al, 1979), las Sirtuinas se han desarrollado como sensores celulares del estado energético y del estado de óxidoreducción (REDOX) (Michan S et al, 2007). NAD⁺ es regulador clave de múltiples procesos metabólicos y las Sirtuinas actúan como sensores de los niveles de NAD⁺, cuyos niveles disminuyen con la edad; estudios en murinos muestran como la repleción con NAD⁺ restaura la homeostasis mitocondrial mediado por Sirtuina 1 (Gomes A.P et al 2013). Murinos deficientes de Sirtuina 6 exhiben signos de envejecimiento acelerado con tasas de muerte más temprana por hipoglicemias refractarias (Mostoslavsky R et al 2006). En inflamación aguda la Sirtuina 1, funciona como un regulador metabólico que epigenéticamente reprograma la inflamación a través de la alteración de histonas y de factores de transcripción tales como NF κ B y AP1 (proteína activadora 1) (Xie J et al, 2013). La inflamación liga a las redes bioenergéticas mitocondriales, al sistema inmune y al metabolismo, siendo las Sirtuinas

las moderadoras esenciales de este trinomio.

El paso de niveles altos de agentes reductores (NADH y NADPH) a NAD^+ refleja la acción reparadora de la célula, que se caracteriza por un estado catabólico bajo en producción de ATP. Células del sub tipo anti inflamatorias como los macrófagos M2, basan su suministro energético de la oxidación de ácidos grasos (McGettrick A. F. et al, 2013), mediado por la expresión de PGC-1 α y PG1- β , en presencia del efecto regulador de Sirtuinas 1 y 6 (Fernández P, J. et al, 2011), durante la fase de adaptación de la respuesta inflamatoria.

En esencia las respuestas efectoras inmunes dependen de glucolisis y las respuestas represoras de la oxidación de ácidos grasos, y este concepto emerge como el determinante crítico de la repuesta inflamatoria aguda y el restablecimiento de la homeostasis siendo la base del expuesto de cómo el metabolismo y la inmunidad se integran en la base de los requerimientos bioenergéticos.

El cambio a disponibilidad de NAD^+ y disminución de disponibilidad de ATP durante la transición de la fase proinflamatoria a la fase adaptativa de la respuesta inflamatoria es la clave para el entendimiento del papel de las Sirtuinas en sepsis.

El aumento del NAD^+ nuclear activa Sirtuina 1 quien induce la activación de Sirtuinas 6 y 3 y las funciones combinadas de esta triada favorece el cambio de metabolismo glucolítico a la oxidación de ácidos grasos (Liu TF et al.2012) a partir de incrementar el flujo mitocondrial de ácidos grasos, de incrementar la lipolisis y la Beta oxidación en la misma a partir de la de-acetilación y desactivación de FOXO (Fork head box subgroup O en inglés) y por ende la respuesta inmune de efectora a represora.

Por todo lo anterior, la asociación entre AMPK – HIF-1 α y Sirtuinas tienen como denominador común a la mitocondria en condiciones de enfermedad crítica y son las mROS las conectoras de estos factores, razón por la cual su función de señalización es mucho más relevante en la etapa de inflamación que su función de defensa. Se ha mencionado que metabólicamente la mitocondria en enfermedad critica está bloqueada por HIF-1 α en cuanto a su producción de energía, sin embargo, y resumiendo, la producción de mROS potencia la activación de este factor y la necesidad metabólica es una reprogramación epigenética que active a AMPK quien a su vez activa a las Sirtuinas para restablecer la función energética de la mitocondria y de esta forma favorecer una respuesta inflamatoria coordinada y homogénea que permita mejores desenlaces

Claramente la respuesta inflamatoria depende del metabolismo celular, y según la demanda energética y la viabilidad de oxígeno, la célula “decide” que metabolismo puede abastecer mejor esas demandas, el oxidativo o el glucolítico. Esta decisión está dada por la mitocondria, quien determina la mejor ruta metabólica de abastecimiento energético y más importante aún, establece la intensidad y calidad de la respuesta.

La fortaleza más grande de este estudio es la confirmación del comportamiento real de la mitocondria en la respuesta inflamatoria sistémica. Es evidente que las mROS, son la primera línea de respuesta de la mitocondria ante una injuria aguda y esta función impone un aumento del consumo de oxígeno. En concordancia, en esta investigación, se encontró una asociación de severidad de enfermedad directamente proporcional a la producción de mROS en el paciente crítico en relación con marcadores clínicos de inflamación como el lactato.

La intervención mitocondrial en la injuria aguda está dada por fases, en la fase inicial de respuesta la viabilidad de la mitocondria se mantiene intacta, esto a partir de un potencial de membrana conservado, siempre y cuando no exista de base un déficit de funcionalidad por patologías metabólicas. La sobrecarga mitocondrial aunado a una pérdida de su regulación son los responsables de la intervención mitocondrial no como promotor de señales sino como determinante de muerte celular a partir de la activación de vías de muerte celular, tanto intrínsecas como extrínsecas.

Este trabajo proporciona una herramienta confirmatoria de la función mitocondrial en injuria aguda en células inmunes. A partir de los resultados obtenidos, los esfuerzos investigativos futuros deben concentrarse en evaluar en tiempo real y en vivo, cómo se encuentran los factores de regulación mitocondrial en el paciente crítico. Es promisorio evaluar la actividad de Sirtuinas y AMPK en estos pacientes y de esta forma complementar el cuadro de actividad mitocondrial in vivo en pacientes críticos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- **Aderem A, Ulevitch, R.J. (2000).** Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406(6797):782-787.

- **Adrie C, Bachelet M, Vayssier-Taussat M et al.(2001).**Mitochondrial membrane potential and apoptosis peripheral blood monocytes in severe human sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 Aug 1;164(3):389-95.
- **Agani F.H, Pichiule P. et al (2000).** The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia. *J. Biol. Chem.* 275, 35863–35867.
- **Ahuja P, Zhao P. et al (2010).** Myc controls transcriptional regulation of cardiac metabolism and mitochondrial biogenesis in response to pathological stress in mice. *J Clin Invest* 2010, 120:1494-1505.
- **Akira S. Y, Takeda K. (2004).** Toll-like receptor signaling. *Nature Review of Immunology.* 2004;4:499-511.
- **Albina J.E, Mastrofrancesco B., Vessella, J.A.et al. (2001).** HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1alpha induction in primary inflammatory cells by TNF-alpha. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281, C1971–C1977.
- **Aller M.A, Arias J.L. et al. (2004).** Post-traumatic inflammation is a complex response based on the pathological expression of the nervous, immune and endocrine functional systems. *Experimental Biology and Medicine (Maywood).* 2004;229:170–181.
- **Alvear S, Canteros J. et al. (2013).** Costos reales de tratamientos intensivos por paciente y día cama. *Rev Med Chile* 2013;141:202-208.
- **Andrades M.E, Ritter C, Dal-Pizzol F. (2009).** The role of free radicals in sepsis development. *Front Biosci* 2009; 1:277–87
- **Andresen M, Regueira T, Leighton F. (2006)** Estrés Oxidativo en el paciente crítico. *Rev Med Chile* 2006;134:649-656.
- **Arulkumaran N, Deutschman CS, Pinsky MR et al. (2016).** MITOCHONDRIAL FUNCTION IN SEPSIS. *Shock* 2016 Mar;45(3):271-8.
- **Bae Y. S, Oh H et al, (2011).** “Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling,” *Molecules and Cells*, vol. 32, no. 6, pp. 491–509, 2011.
- **Basanez G, Zhang J. et al. (2001).** Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL form cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes. *J Biol Chem* 2001, 276:31083-31091.
- **Basak S, Hoffman A.(2008).** Crosstalk via the NF-κB signaling system. *Cytokine and growth factor Reviews.* Vol 19 , No3-4. Pp187 -197. 2008.
- **Bauer J, Naminemi F, Reisenger J at al. (2012).** “Lymphotoxin, NF-κB and cancer: the dark side of cytokines.” *Digestive Diseases*, vol 30,No 5, pp 453-468. 2012.
- **Bianchi, M.E. (2007).** DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte Biology.* 2007;811: 1-5.
- **Blouin CC, Page EL, Soucy GM et al (2004).** Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: Implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood.* 2004; 103:1124–30.
- **Bonawitz N. D, Clayton D. A, Shadel G. S. (2006).** Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol. Cell* 24, 813–825 (2006).
- **Bonizzi G and Karin M, (2004).** “The two NF-κB activation pathways and their role

in innate and adaptive immunity” *Trends in Immunology*. Vol 25 no 6; pp 280-288, 2004.

- **Boujrad H, Gubkina O. et al. (2007).** AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. *Cell Cycle* 2007, 6:2612-2619.
- **Brealey D. et al. (2002).** Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 360:219–223; 2002.
- **Bulguer M, Maier R. (2001).** Antioxidants in critical illness. *Archives of Surgery*. 2001:1201-07.
- **Bulua A.C, Simon A. et al. (2011).** Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med* 2011, 208:519-533.
- **Cadenas S, Aragonés J. et al. (2010).** Mitochondrial reprogramming through cardiac oxygen sensors in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 2010, 88:219-228.
- **Canto C. and Y Auwerx J. (2010).** AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci* 2010, 67:3407-3423.
- **Carr E. L. et al. (2010),** Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *J. Immunol.* 185, 1037–1044 (2010).
- **Carre J.E, Orban J.C. et al (2010).** Survival in critical illness is associated with early activation of mitochondrial biogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010, 182:745-751.
- **Cerra F.B. (1990).** The systemic septic response: concepts of pathogenesis. *J Trauma* 1990; 30: S169-74.
- **Chen GD, Yu WD and Chen XP. (2016).** SirT1 activator represses the transcription of TNF- α and THP -1 cells of a sepsis model via deacetylation of H4K16. *Mol Rep Med* 2016 Dec;14(6):5444-5550.
- **Cin-Perez R, Salazar E, Kamenetsky M. et al (2009).** Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 2009, 9:265-276
- **Clark L.C. (1958).** Monitor and Control of Blood and Tissue Oxygen Tensions. *ASAIO J.* 1958; 2: 41–8.
- **Dada L.A and Y Sznajder J.I. (2011).** Mitochondrial Ca²⁺ and ROS take center stage to orchestrate TNF- α -mediated inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* 121, 1683–1685.
- **Davidson S.M and Y Duchon M.R. (2007).** Endothelial mitochondria –Contributing to vascular function and disease. *Circ. Res.*, 100, 1128-1141
- **Dawson V.L and Y Dawson T.M. (2004).** Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J Bioenerg Biomembr* 2004, 36:287-294.
- **Decker R.S. and Y Wildenthal K. (1980).** Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. I. Ultrastructural and cytochemical changes. *Am J Pathol* 1980, 98:425-444.
- **Dikalov SI, Li W, Doughan AK, et al (2012),** Mitochondrial reactive oxygen species and calcium uptake regulate activation of phagocytic NADPH oxidase, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 302 (2012) R1134–R1142.
- **Droge W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002, 82:47-95.

- **Edbrooke D, Minelli C, Mills G. et al. (2011).** Implications of ICU triage decisions on patient mortality: a cost-effectiveness analysis. *Critical Care* 2011;15(1):R 56.
- **Egan D. F. et al.(2010).** Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456–461 (2010).
- **Escames G, López L.C, García J.A. et al (2011).** Mitochondrial DNA and inflammatory diseases. *Hum. Genet.* 131, 161–173.
- **Escobar DA, Botero-Quintero AM, Kautza BC, et al. (2015).** Adenosine monophosphate-activated protein kinase activation protects against sepsis-induced organ injury and inflammation. *J Surg Res.* 2015.Mar 194(1):262-272.
- **Exline M, Crouiser E. (2011).** Mitochondrial Dysfunction During Sepsis: Still More Questions Than Answers *Crit Care Med.* 2011 May 1; 39(5): 1216–1217.
- **Ferreira Fl, Bota DP, Bross A et al (2001).** Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA (2001) Oct 10;286(14):1754-8*
- **Fernandez-Marcos P. J and Auwerx J. (2011).** “Regulation of PGC- 1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis,” *e American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 93, no. 4, pp. 884S– 890S, 2011. ^{[[L]]}_{SEP}
- **Fink, M. (1997).** Cytopathic hypoxia in sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997;110:87–95. *Suppl.*
- **Fink M.P. (2001).** Cytopathic hypoxia: mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. *Crit Care Clin* 2001; 17:219–37.
- **Finkel T. (2011).** “Signal transduction by reactive oxygen species,” *Journal of Cell Biology*, vol. 194, no. 1, pp. 7–15, 2011. ^{[[L]]}_{SEP}
- **Franchimont D, Galon J, Gadina M., et al. (2000).** Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12- induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. *Journal of Immunology.* 2000; 164:1768-1774.
- **Frauwirth K.A et al. (2002).** The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* 16, 769–777 (2002).^{[[L]]}_{SEP}
- **Fry D.E, Pearlstein L, Fulton R.L. et al. (1980).** Multiple system organ failure. The Role of uncontrolled infection. *Archives of Surgery.* 1980;115(2): 136-140.
- **Galkin A, Higgs A, Moncada S. (2007).** Nitric oxide and hypoxia. *Essays Biochem* 2007, 43:29-42.
- **Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen, C. & Kroemer G. (2012).** Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ. Res.* 111, 1198–1207 (2012). ^{[[L]]}_{SEP}
- **Gardam S and Brink R, (2004),”** Non-canonical NFκB signaling initiated by BAFF influences B Cell Biology at multiple junctures” *Frontiers in Immunology*, vol. 4, article 509, 2014.
- **Garrabou G, Morén C. et al. (2012).** The effects of sepsis on mitochondria. *J. Infect. Dis.* 205, 392–400.
- **Gattinoni L, Brazzi L. et al. (1995).** A trial of goal-oriented hemodynamic therapy in critically ill patients. SvO2 Collaborative Group. *N Engl J Med* 1995; 333: 1025-32.
- **Giorgio M, Migliaccio E. et al. (2005).** Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 2005, 122:221-233.

- **Gladden L.B. (2004).** Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J Physiol* 2004; 558: 5-30.
- **Grivennikova V. G. and Vinogradov A. D. (2013).** “Mitochondrial production of reactive oxygen species,” *Biochemistry*, vol. 78, no. 13, pp. 1490–1511, 2013. [SEP]
- **Goglia F, Silvestri E and Lanni A. (2002).** Thyroid Hormones and mitochondria. *Biosci Rep* 2002, Feb 22(1):17-32.
- **Gomes A. P., Price N, Ling AJY et al. (2013),** “Declining NAD⁺ induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear- mitochondrial communication during aging,” *Cell*, vol. 155, no. 7, pp. 1624–1638, 2013.
- **Goode HF, Cowley HC, Walker Be et al. (1995).** Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med.* 1995;23(4):646–51.
- **Grundler K, Angstwurm M, Hilge R et al. (2014).** Platelet mitochondrial membrane potential depolarization reflects disease severity in patients with sepsis and correlates with clinical outcome. *Crit Care* 2014 Feb12;18(1):R31
- **Gutierrez G.; Palizas, F., et al. (1992).** Gastric intramucosal pH as a therapeutic index of tissue oxygenation in critically ill patients. *Lancet* 1992; 339: 195-9.

- **Haden D.W.; Suliman, H.B., et al (2007).** Mitochondrial biogenesis restores oxidative metabolism during Staphylococcus aureus sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 176:768-777.
- **Hardie DG. (2011).** AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev* 2011; 25:1895.
- **Hardie DG, Carling D, Carlson M. (1998).** The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 1998;67:821. [SEP]
- **Hashimoto TA and Brooks GA. (2008)** Mitochondrial Lactate oxidation complex and an adaptive role for lactate production. *Med Sci Sports Exerc.* 2008 Mar; 40(3):486-494.
- **Hauser B, Bracht H. et al. (2005).** Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies. *Anesth Analg* 2005, 101:488-498.
- **Hotchkiss R.S, Y Karl I.E. (1992).** Reevaluation of the role of cellular hypoxia and bioenergetic failure in sepsis. *JAMA* 1992; 267:1503–9.
- **Hsieh Y.C, Athar M. et al. (2009).** When apoptosis meets autophagy: deciding cell fate after trauma and sepsis. *Trends Mol Med* 2009, 15:129-138.
- **Huttemann M, Lee I. et al. (2007).** Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochim Biophys Acta* 2007, 1773:1701-1720.
- **Ince C, Y Sinaasappel M. (1999).** Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Crit Care Med* 1999; 27:1369–77.
- **Ivan M, Kondo K, Yang H et al. (2001)** HIF alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O₂ sensing. *Science.* 2001;292: 464–8. [SEP]
- **Jiang Q, Wong J. et al. (2004).** Gamma-tocopherol or combinations of vitamin E forms

induce cell death in human prostate cancer cells by interrupting sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:17825-17830.

- **Jones A.E, Trzeciak S, Kline J.A. (2009).** The Sequential Organ Failure Assessment score for predicting outcome in patients with severe sepsis and evidence of hypoperfusion at the time of emergency department presentation. *Crit Care Med.* 2009 May;37(5):1649-54.
- **Jones R. G. et al. (2005)** AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 18, 283–293 (2005).
- **Junttila M. R, Li S, and Westermarck J. (2008)** “Phosphatase- mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival,” *e FASEB Journal*, vol. 22, no. 4, pp. 954–965, 2008. ^{[[1]]}_{SEP}
- **Kaminski M.M, Sauer S.W, Kaminski M, et al, (2012)** T cell activation is driven by an ADP-Dependent glucokinase linking enhanced glycolysis with mitochondrial reactive oxygen species generation, *Cell Rep.* 2 (2012) 1300–1315 ^{[[1]]}_{SEP}
- **Karbowski M, Y Youle R.J. (2003).** Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 2003, 10:870-880.
- **Kerrigan A. M. & Brown G. D. (2010).** Syk-coupled C-type lectin receptors that mediate cellular activation via single tyrosine based activation motifs. *Immunol. Rev.* 234, 335–352 (2010)
- **Kim HY, Kim YH, Nam BH et al. (2007)** HIF- 1alpha expression in response to lipopolysaccharide mediates induction of hepatic inflammatory cytokine TNF alpha. *Exp Cell Res.* 2007; 313:1866–76.
- **Kizaka-Kondoh, S.H. Y Konse-Nagasawa, H. (2009).** Significance of nitroimidazole compounds and hypoxia-inducible factor-1 for imaging tumor hypoxia *Cancer Sci | August 2009 | vol. 100 | no. 8 | 1366–1373.*
- **Klar AJS, S. Fogel, and K.Macleod (1979),**“Mar1—a regulator of the HMa and HMa α loci in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Genetics*, vol. 93, no. 1, pp. 37–50, 1979.
- **Knaus WA, Draper EA, Wagner DP et al, (1985).** APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; Oct 13(10):818-29.
- **Kozlov A.V, Staniek K. et al (2006).** Different effects of endotoxic shock on the respiratory function of liver and heart mitochondria in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006, 290: G543-G549.
- **Kraut JA and Madias NE. (2014).** Lactic Acidosis. *N Engl J Med* 2014;371(24):2309-2319.
- **Kreymann G, Grosser S. et al. (1993).** Oxygen consumption and resting metabolic rate in sepsis, sepsis syndrome, and septic shock. *Crit Care Med* 1993; 21:1012–9.
- **Krysko D. V. et al. (2011)** Emerging role of damage- associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol.* 32, 157–164 (2011).
- **Kung C.T, Hsiao S.Y. et al. (2012).** Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels as predictors of outcome in severe sepsis patients in the emergency room. *J. Transl. Med.* 2012. 10, 130.
- **Kuznetsov A.V, Kehrer I. et al (2011).** Mitochondrial ROS production under cellular stress: comparison of different detection methods. *Anal Bioanal Chem* 2011, 400:2383-

239.

- **Lawrence KL, White PH, Morris GP et al. (2010).** CD4+ lymphocyte adenosine triphosphate determination in sepsis: a cohort ^[L]_[SEP]study, *Crit. Care* 14 (2010) R110^[L]_[SEP]
- **Lelubre C, Anselin S, Zouaoui Boudjeltia K et al. (2013).** Interpretation of C-reactive protein in critically ill patients. *Biomed Res Int* 2013,2013:124021.
- **Lenz A, Franklin G, Cheadle W. (2007).** Systemic inflammation after trauma. *Injury*. 2007;38(12): 1336-45.
- **Lenaz G, Fato R, Genova M.I, et al (2006)** Mitochondrial complex I: structural and functional aspects. *Biochim. Biophys. Acta*, 1757, 1406-1420. ^[L]_[SEP]
- **Levine B, Mizushima N, Virgin H.W. (2011).** Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011, 469:323-335
- **Li Q, Liu X, Yin Y et al. (2014).** Insulin regulates glucose consumption and lactate production through reactive oxygen species and pyruvate kinase M2. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014:504953
- **Lin J., Handschin, C.&Spiegelman,B.M.(2005)** Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 1, 361–370 (2005).
- **Liu T. F, Vachharajani V. T, Yoza B. K. et al, (2012).** “NAD⁺-dependent sirtuin 1 and 6 proteins coordinate a switch from glucose to fatty acid oxidation during the acute inflammatory response,” *e Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 31, pp. 25758–25769, 2012.
- **Loiacono, L. Y Shapiro, D. (2010).** Detection of Hypoxia at the cellular level. *Crit Care Clin* 26 (2010) 409–421.
- **López-Armada M, Caramés B. et al. (2006).** Mitochondrial activity is modulated by TNFalpha and IL-1beta in normal human chondrocyte cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14, 1011–1022.
- **Maclver N.J, Michalek R.D.et al. (2013).** Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annual review of Immunology*. 2013; 31:259-83.
- **Maneiro E, Martín M. et al. (2003).** Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2003. 48, 700–708.
- **McGettrick A. F, O’Neill L. A. J, (2013).** “How metabolism generates signals during innate immunity and in ammation,” *e Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 32, pp. 22893– 22898, 2013. ^[L]_[SEP]
- **Matzinger P. (1994).** Tolerance, danger and the extended family. *Annual Review of Immunology*. 1994;(12):991-1045.
- **McBride, H.M. Y Wasiak, S. (2006).** Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current Biology*. 2006;R551-60.
- **Meléndez H, Naranjo F. et al. (2011).** Mortalidad atribuible a cuidado intensivo: estudio de cohorte. *Acta Colombiana de Cuidado Intensivo*. 2011;11(2):91-99.
- **Michan S. and Sinclair D (2007),** “Sirtuins in mammals: insights into their biological function,” *e Biochemical Journal*, vol. 404, no. 1, pp. 1–13, 2007.
- **Miller A. F, (2012).** “Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights,” *FEBS Letters*, vol. 586, no. 5, pp. 585–595, 2012.

- **Mikkelsen M, Andrea N, Miltiades BA et al. (2009).** Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock. *Crit Care Med* 2009 37(5): 1670-1677.
- **Molnar MJ, Kovacs GG. (2017).** Mitochondrial diseases. *Handb Clin Neurol.* 2017; 145:147-155
- **Moore, M.N. (2008).** Autophagy as a second level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress. *Autophagy* 2008, 4:254-256.
- **Montini L, De Sole P, Pennisi MA et al. (2016).** Prognostic value of the reactive oxygen species in severe sepsis and shock septic patients: a pilot study. *Minerva Anesthesiol* 2016 Dec;82(10):1306-1313.
- **Moreno-Sánchez, R.; Marín-Hernández, A. et al. (2007).** Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS Journal.* 2007:1393-418.
- **Mostoslavsky R, Chua K, F, Lombard DF et al. (2006),** “Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6,” *Cell*, vol. 124, no. 2, pp. 315–329, 2006.
- **O’Brien J.M. Jr.; Kumar, A. et al. (2013).** Does Value-based purchasing enhance quality of care and patient outcomes in the ICU? *Crit Care Clin* 2013 Jun;29(1):91-112.
- **O’Neill LA, Kishton RJ et al. (2016).** A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*, 2016 Sept;16(9):553-6.
- **Orrenius S, Gogvadze A. et al. (2007).** Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007, 47:143-183.
- **Oren R, Farnham A. E. et al.** Metabolic patterns in three types of phagocytizing cells. *J. Cell Biol.* 17, 487–501 (1963). [L1] [SEP]
- **Pagliarini D.J, Dixon J.E. (2006).** Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? *Trends Biochem Sci* 2006, 31:26-34.
- **Pellegrini M, Baldari C.T. (2009).** Apoptosis and oxidative stress-related diseases: the p66Shc connection. *Curr Mol Med* 2009, 9:392-398.
- **Peyssonaux C, Cejudo-Martin P, Doedens A, et al. (2007).** Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide- induced sepsis. *J Immunol.* 2007; 178:7516–19.
- **Piantadosi C.A. (2008).** Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2008, 45:562-569.
- **Piantadosi C.A, Carraway M.S. et al. (2007).** Protecting the permeability pore and mitochondrial biogenesis. *Novartis Found Symp* 2007, 280:266-276.
- **Piantadosi C.A, Withers C.M. et al. (2011).** Heme oxygenase-1 couples activation of mitochondrial biogenesis to anti-inflammatory cytokine expression. *J Biol Chem* 2011, 286:16374-16385.
- **Pinton P, Rimessi A. et al. (2007).** Protein kinase C beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc. *Science* 2007, 315:659-663.
- **Priault M, Bessoule J.J. et al. (2002).** Bax- induced cell death in yeast depends on mitochondrial lipid oxidation. *Eur J Biochem* 2002, 269:5440-5450.

- **Rasbach K.A, Y Schnellmann R.G. (2007).** Signaling of mitochondrial biogenesis following oxidant injury. *J Biol Chem* 2007, 282:2355-2362.
- **Regueira T. Y, Andresen M. (2010).** Manipulación del transporte y consumo de oxígeno en la sepsis. *Rev Med Chile* 2010; 138: 233-242.
- **Reynolds C.M, Suliman H.B. et al. (2009).** Nitric oxide synthase-2 induction optimizes cardiac mitochondrial biogenesis after endotoxemia. *Free Radic Biol Med* 2009, 46:564-572.
- **Rivers E, Nguyen B. et al. (2001).** Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001; 345: 1368-77.
- **Rosser D.M, Stidwill R.P. et al. (1995).** Oxygen tension in the bladder epithelium rises in both high and low cardiac output endotoxemic sepsis. *J Appl Physiol* 1995; 79:1878–82.
- **Saitoh T. and Y Akira, S. (2010).** Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *J. Cell Biol.* 2010. 189, 925–935.
- **Schoonbroodt S, Ferreira V, Best-Belpomme M, et al. (2000)**” Crucial rol of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl terminal PEST domain of I κ B α in NF- κ B activation by an oxidative stress,” *Journal of Immunology*, vol. 164, no. 8, pp. 4292–4300, 2000. ^{[[L]]}_{[[SEP]]}
- **Schumacker PT. (2005).** Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Crit Care Med.* 2005;33: S423–5. ^{[[L]]}_{[[SEP]]}
- **Semenza GL (2007).** Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J.* 2007;405: 1–9. ^{[[L]]}_{[[SEP]]}
- **Sheu S.S, Nauduri D. et al. (2006).** Targeting anti-oxidants to mitochondria: A new therapeutic direction. *Biochim. Biophys. Acta*, 20061762, 256-265.
- **Shi L. Z. et al. (2011)** HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of T_H17 and T_{reg} cells. *J. Exp. Med.* **208**, 1367–1376 (2011).
- **Singer M. and Brealey D. (1999).** Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Biochem. Soc. Symp.*, 66, 149-166.
- **Singer M. (2014)** The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence* 2014; Jan1(5): 66-72
- **Singer M, Deutschman CS, Seymour CW et al. (2014).** The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016 Feb;315(8):801-810.
- **Skrupky L.P, Kerby P.W. et al. (2011).** Advances in the management of sepsis and the understanding of key immunologic defects. *Anesthesiology* 2011;115(6):1349–62.
- **Soubannier V. Y, McBride H. M. (2009).** Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 154–170 (2009).
- **Strowig T, Henao-Mejia J. et al. (2012).** Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481, 278–286.
- **Suliman H.B, Welty-Wolf K.E. Et al. (2004).** Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis. *Cardiovasc Res* 2004, 64:279-288.

- **Suliman H.B, Welty-Wolf K.E. Et al. (2005).** Toll-like receptor 4 mediates mitochondrial DNA damage and biogenic responses after heat-inactivated E. coli. *FASEB J* 2005, 19:1531-1533.
- **Trivedi V, Bavishi C, Jean R. (2015).** Impact of obesity on sepsis mortality: A Systematic review. *Journal of Critical Care.* 2015 Jun;30(3):518-24
- **Trunkey D.D, Illner H. et al. (1973).** The effect of hemorrhagic shock on intracellular muscle action potentials in the primate. *Surgery* 1973, 74:241-250.
- **Van Wijk S.J. Y Hageman G.J. (2005).** Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2005, 39:81-90.
- **Victor V.M, Espulgues, J.V. et al. (2009).** Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants. *Infect Disord Drug Targets* 2009, 9:376-389.
- **Victor VM, Rocha M, Esplugues JV et al. (2005)** Role of free radicals in sepsis: antioxidant therapy. *Curr Pharm Des.* 2005;11(24):3141–58.^[SEP]
- **Vincent J.L, Sakr Y. et al. (2006).** Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators: Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006; 34:344–353
- **Visser, J.; Labadarios, D. et al.(2011).** Micronutrient supplementation for critically ill adults: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition.* 2011;27(7-8):745-58.
- **Wang R. et al. (2011),** The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity* 35, 871–882 (2011).
- **Warner A, Bencosme A, Healy D et al. (1995)** Prognostic role of antioxidant enzymes in sepsis: preliminary assessment. *Clinical Chemistry*41(61):867-881.
- **Wattiaux R. Y, Wattiaux-DeConinck, S. (1984).** Effect of ischemia on lysosomes. *Int Rev Exp Pathol* 1984, 26:85-106.
- **Weidenbusch M. Y, Anders H.J. (2012).** Tissue microenvironments define and get reinforced by macrophage phenotypes in homeostasis or during inflammation, repair and fibrosis. *Journal of Innate Immunity.* 2012; 4:463–477.
- **Wendel M, Heller A.R. (2010).** Mitochondrial function and dysfunction in sepsis. *Wien Med Wochenschr* 2010, 160:118-123.
- **Whelan SP, Carchman EH, Kautza B, et al.(2014).** Polymicrobial sepsis is associated with decreased hepatic oxidative phosphorylation and an altered metabolic profile. *J Surg Res* 2014;186:297.
- **Wilczynski J, Deuchler M and Czyz M.(2011)** Targeting NF-κB and HIF-1 pathways for the treatment of cancer: part II. *Arch Immunol Ther Exp* 2011 Aug;59(4):301-307
- **Winterbourn CC, Buss IH, Chan TP,et al (2000).** Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit Care Med* 2000; 28: 143-9.^[SEP]
- **Wyatt E.; Wu, R. et al. (2010).** Regulation and cytoprotective role of hexokinase III. *PLoS One* 2010, 5:e13823.
- **Xie J, Zhang X, and Zhang L. (2013)** “Negative regulation of inflammation by SIRT1,” *Pharmacological Research*, vol. 67, no. 1, pp. 60–67, 2013.

- **Yamakawa K, Ogura H, Koh Tet al. (2013).** Platelet mitochondrial membrane potential correlates with severity in patients with systemic inflammatory response syndrome. *J Trauma Acute Care Surg* 2013 Feb;74(2):411-417.
- **Yu X.X, Barger J.L. et al. (2000).** Impact of endotoxin on UCP homolog mRNA abundance, thermoregulation, and mitochondrial proton leak kinetics. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000, 279:E433-E446.
- **Zapelini P.H, Rezin G.T. et al. (2008).** Antioxidant treatment reverses mitochondrial dysfunction in a sepsis animal model. *Mitochondrion* 2008, 8:211-218.
- **Zhang A.Q, Zeng L. et al. (2011).** Clinical relevance of single nucleotide polymorphisms within the entire NLRP3 gene in patients with major blunt trauma. *Crit. Care* 2011; 15, R280
- **Zorv DB, Juhaszova M and Sollot SJ. (2014).** Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS induced –ROS release. *Physiol Rev* 2014 Jul;94(3):909-50

10. ANEXOS

10.1. DROGAS CON TOXICIDAD MITOCONDRIAL

Pharmacologic Category	Toxin	Action	Symptoms
1. Anticonvulsants	Valproate (Depakote)	Sequesters carnitine; decreases fatty acid oxidation, Krebs, ETC activity and oxidative-phosphorylation; complex IV inhibition	Hepatopathy
2. Psychotropic			
a. Antidepressants	Amitriptyline (Elavil) Amoxapine Fluoxetine (Prozac) Citalopram (Cipramil)	Causes autonomic dysfunction	
b. Antipsychotics	Chlorpromazine (Thorazine) Fluphenazine (Prolixin) Haloperidol (Haldol) Risperidone (Risperdol)		
c. Barbituates	Phenobarbital Secobarbital (Seconal) Butalbital (Fiorinal) Amobarbital (Amytal) Pentobarbital (Nembutal)	Reduces mito protein synthesis; dec # and size of mitochondria Inhibits NADH dehydrogenase (complex I)	
d. Anxiety meds	Alprazolam (Xanax) Diazepam (Valium, Diastat)		
4. Cholesterol meds	Statins Bile acids-cholestyramine Ciprofibrate	Reduce endogenous coenzyme Q10 Inhibits ETC Inhibits complex I	Myopathy

	Fenofibrate		
5. Analgesic/anti-inflammatory	ASA (Aspirin) Acetaminophen (Tylenol) Indomethacin (Indocin) Naproxen (Aleve) Diclofenac	Inhibits ETC and uncouples oxidative-phosphorylation Increases oxidative stress	Reye syndrome (hepatic failure) Hepatopathy
6. Antibiotics	Tetracycline, minocycline Chloramphenical Aminoglycosides Linezolid (Zyvox)	Inhibit beta-oxidation; inhibit mito protein synthesis Inhibits mito protein synthesis Impair mtDNA translation	Hearing loss; cardiac toxicity; renal toxicity Lactic acidosis, optic and peripheral neuropathy
7. Anti-arrhythmic	Amiodarone	Inhibits beta-oxidation	
8. Steroids		Reduce transmembrane mito potential	Reports of deterioration in Kearns-Sayre syndrome
9. Anti-viral	Interferon	Impairs mtDNA transcription	
10. Anti-retroviral	Zidovudine	Impairs mtDNA replication which causes mtDNA depletion; decreases complex I and IV activity	Carnitine deficiency; lactic acidosis; lipodystrophy; neuropathy; myopathy; hepatic dysfunction
11. Cancer meds	Doxorubicine (Adriamycin) Cis-platinum Tamoxifen		Hearing loss; cardiac toxicity; renal toxicity

Actividad mitocondrial en pacientes críticamente enfermos. 87

12. Diabetes meds	Metformin	Inhibits oxidative-phosphorylation; enhanced glycolysis	Lactic acidosis
13. Beta-blockers		Causes oxidative stress	Decreased exercise tolerance
14. Immunizations		No scientific data on oxidative- phosphorylation adverse effects	