

THIAGO DOMINGOS CORRÊA

Efeito da ressuscitação tardia na gravidade da sepse, na intensidade do tratamento e na função mitocondrial em um modelo experimental de peritonite fecal

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Anestesiologia

Orientador: Prof. Dr. Eliézer Silva

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Corrêa, Thiago Domingos

Efeito da ressuscitação tardia na gravidade da sepse, na intensidade do tratamento e na função mitocondrial em um modelo experimental de peritonite fecal / Thiago Domingos Corrêa. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Anestesiologia.

Orientador: Eliézer Silva.

Descritores: 1.Sepse 2.Choque séptico 3.Choque 4.Ressuscitação 5.Hidratação
6.Vasoconstritores 7.Norepinefrina 8.Citocinas 9.Mitocôndrias 10.Insuficiência de
múltiplos órgãos 11.Hemodinâmica 12.Peritonite 13.Suíños 14.Modelos animais

USP/FM/DBD-295/13

*A minha esposa, Natália Zúniga Chaves, fonte
infinita de amor, paz, harmonia e inspiração.*

*Ao meu filho, Arthur Chaves Corrêa, meu amigo
inseparável, pelo sentido que imprimiu a minha
vida.*

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, saúde, por ter me proporcionado força e perseverança para chegar até aqui.

Aos meus pais, João Paulo Domingos Corrêa e Aparecida Salette Pilon Corrêa, pelo amor, carinho, dedicação e, acima de tudo, pela oportunidade de estudar e crescer como pessoa e médico.

Ao meu irmão Diogo Domingos Corrêa, meu companheiro e amigo inseparável, sempre presente nos momentos marcantes da minha vida.

Aos meus avós João Domingos Corrêa (*in memoriam*), Abigail Carvalho Corrêa (*in memoriam*), Antônio Luiz Pilon (*in memoriam*) e Maria de Lourdes Tararan Pilon. Seus ensinamentos foram e continuam sendo um exemplo em minha vida.

Ao Prof. Dr. Eliézer Silva, orientador deste trabalho, pela oportunidade, confiança, pelos ensinamentos ao longo dos anos de convivência e, sobretudo, pela amizade.

Ao Prof. Dr. Jukka Takala, pela oportunidade ímpar de estudar e morar durante dois anos em outro país, pelos ensinamentos e confiança em meu trabalho enquanto trabalhei no Departamento de Medicina Intensiva do Hospital Universitário de Berna (*Inselspital*), Berna, Suíça.

Ao Prof. Dr. Stephan Mathias Jakob, por me receber e tratar como um filho em um país distante, pela infinita paciência, pelos ensinamentos enquanto estive trabalhando no seu laboratório no Departamento de Medicina Intensiva do Hospital Universitário de Berna (*Inselspital*), Berna, Suíça.

Ao meu grande amigo Michael Lensh, Coordenador dos Enfermeiros de Pesquisa do Departamento de Medicina Intensiva do Hospital Universitário de Berna (*Inselspital*), Berna, Suíça, que esteve ao meu lado durante a realização de todos os experimentos deste estudo.

Ao Dr. Madhusudanarao Vuda e ao Prof. Dr. Siamak Djafarzadeh do Departamento de Medicina Intensiva do Hospital Universitário de Berna (*Inselspital*), Berna, Suíça, que realizaram as análises da função mitocondrial deste estudo.

À Olgica Beslac, Daniel Mettler e Daniel Zalokar, profissionais do Laboratório de Cirurgia Experimental (*Experimental Chirurgische Station*) do departamento de Medicina Intensiva do Hospital Universitário de Berna (*Inselspital*), Berna, Suíça, pela inestimável assistência durante a realização dos experimentos deste projeto.

À Annika Reintam Blaser, Christian Schmittinger, Christian Torgensen, Colette Boillat, David Berger, Fritz Daudel, Lukas Brander, Martin Wolfgang Dünser, Matthias Hänggi, Natalie Araya Araya, Peter Zurbuchen, Sandra Nansoz, Sarah Wagner, Stepani Bendel, Stephan Bloechlinger, Tobias Merz e Torsten Konrad do Departamento de Medicina Intensiva do Hospital Universitário de Berna (*Inselspital*), Berna, Suíça, pela assistência durante a realização dos experimentos deste projeto.

À Jeannie Wurz, pela impagável ajuda durante meus primeiros dias em Berna, Suíça.

Ao Dr. Alexandre Biasi Cavalcanti, à Dra. Carmen Silvia Valente Barbas e à Profa. Dra. Maria José Carvalho Carmona, membros da banca de qualificação, pelas valiosas contribuições ao resultado final deste estudo.

Ao Prof. Dr. Luiz Francisco Poli-de-Figueiredo (*in memoriam*), pelos ensinamentos e confiança em meu trabalho.

À Sra. Alexandra de Carvalho Moraes, ao Sr. Arlen Clayton Cirino dos Santos e à Sra. Claudia Alexandria Pereira pela assistência indispensável neste período.

Aos queridos mestres do presente e do passado, pelos ensinamentos e, acima de tudo, exemplo e inspiração.

Agradecimentos adicionais

Ao Departamento de Medicina Intensiva do Hospital Universitário de Berna (*Inselspital*), Berna, Suíça, local onde este projeto foi realizado.

À Disciplina de Anestesiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade.

Ao Hospital Israelita Albert Einstein, pela oportunidade de realizar mais este sonho.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª edição. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas.....	xiii
Lista de abreviaturas, símbolos e siglas.....	xiv
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	4
3. MÉTODOS.....	5
3.1. Financiamento e aprovação do estudo.....	5
3.2. Preparo dos animais e anestesia.....	6
3.3. Instrumentação.....	8
3.4. Monitorização.....	11
3.5. Delineamento experimental.....	13
3.6. Ressuscitação protocolada.....	15
3.6.1. Suporte hemodinâmico	16
3.6.2. Suporte respiratório.....	18
3.6.2.1. Procedimento para aspiração traqueal.....	19
3.6.2.2. Manobra de recrutamento pulmonar.....	20
3.6.2.3. Ajuste da PEEP e da FiO ₂	20
3.6.3. Administração de antibióticos.....	20
3.6.4. Profilaxia de trombose venosa profunda.....	21
3.6.5. Controle glicêmico.....	21
3.6.6. Controle do potássio sérico.....	23
3.7. Exames laboratoriais.....	24
3.7.1. Padronização para coleta das amostras de sangue.....	24
3.7.2. Exames laboratoriais realizados.....	25
3.8. Estudo da respiração mitocondrial.....	26
3.8.1. Isolamento das mitocôndrias do músculo esquelético.....	26
3.8.2. Isolamento das mitocôndrias no fígado.....	27
3.8.3. Isolamento das mitocôndrias do coração.....	29
3.8.4. Isolamento das mitocôndrias do cérebro.....	29
3.8.5. Preparo das fibras permeabilizadas.....	30
3.8.6. Respirometria de alta resolução.....	30

3.9. Determinação do ATP no músculo esquelético.....	33
3.10. Critérios e método para interrupção do estudo.....	33
3.11. Determinação do tamanho da amostra.....	35
3.12. Análise estatística.....	35
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Mortalidade.....	37
4.2. Resposta inflamatória.....	37
4.3. Intensidade do tratamento.....	40
4.4. Parâmetros hemodinâmicos e lactato arterial.....	42
4.5. Parâmetros respiratórios, gasométricos e hemoglobina.....	43
4.6. Parâmetros renais e bioquímicos.....	44
4.7. Resultados da análise da função mitocondrial.....	49
4.8. Quantificação do ATP no músculo esquelético.....	55
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÃO.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
8. ANEXOS.....	74
<i>Anexo 1. Aprovação do estudo pelo Comitê de Estudos com Animais do Departamento de Agricultura e Natureza do Cantão de Berna e pelo Serviço Veterinário Secretaria de Estudos com Animais do Cantão de Berna, Suíça</i>	
<i>Anexo 2. Visão geral dos experimentos: “printscreens” dos prontuários digitalizados dos animais utilizados no estudo</i>	
<i>Anexo 3. Publicações e apresentações em congressos internacionais</i>	
<i>Anexo 4. Artigo original publicado</i>	

Lista de figuras

Figura 1 -	Preparo dos animais para o início dos experimentos.....	7
Figura 2 -	Modelo esquemático de um animal em posição supina demonstrando os procedimentos realizados durante a instrumentação.....	9
Figura 3 -	Monitorização do fluxo sanguíneo da artéria carótida comum esquerda.....	10
Figura 4 -	Inserção do dreno intra-abdominal e indução da peritonite fecal.....	10
Figura 5 -	Exemplo do registro de dados no prontuário digitalizado do estudo (<i>Centricity Clinisoft; GE Healthcare</i>).....	12
Figura 6 -	<i>Printscreen</i> obtido durante um experimento demonstrando o armazenamento contínuo de dados hemodinâmicos e respiratórios através do programa <i>Soleasy™</i>	13
Figura 7 -	Delineamento do estudo.....	14
Figura 8 -	Visão geral do laboratório de Cirurgia Experimental do Hospital Universitário de Berna.....	15
Figura 9 -	Algoritmo para suporte hemodinâmico utilizado durante a fase de ressuscitação protocolada do estudo.....	17
Figura 10 -	Protocolo para suporte ventilatório utilizado durante o período de ressuscitação.....	19
Figura 11 -	Protocolo para controle glicêmico utilizado durante todo o estudo.....	22
Figura 12 -	Protocolo para controle do potássio sérico utilizado durante a fase de ressuscitação protocolada.....	24
Figura 13 -	Preparo das amostras de tecido muscular para análise da função mitocondrial.....	28
Figura 14 -	Análise da respiração mitocondrial realizada com a respirometria de alta resolução.....	31
Figura 15 -	Diagrama representativo da respirometria de alta resolução em mitocôndrias isoladas do fígado.....	32

Figura 16 -	Fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória localizados na membrana mitocondrial interna.....	33
Figura 17 -	Curva de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevivência após o início das manobras de ressuscitação.....	37
Figura 18 -	Box plots dos níveis plasmáticos de interleucina-6 (IL-6) durante e ao término do estudo.....	38
Figura 19 -	Box plots dos níveis plasmáticos de fator de necrose tumoral - alfa (TNF- α) durante e ao término do estudo.....	39
Figura 20 -	Box plots dos níveis plasmáticos de proteína C reativa (PCR) durante e ao término do estudo.....	40
Figura 21 -	Fluídos administrados, perdas e balanço hídrico no final do estudo.....	42
Figura 22 -	Respiração mitocondrial dependente do Complexo I em mitocôndrias isoladas do músculo esquelético.....	50
Figura 23 -	Respiração mitocondrial isolada do cérebro nos animais sépticos e no grupo controle.....	52
Figura 24 -	Respiração mitocondrial isolada do fígado nos animais sépticos e no grupo controle.....	54
Figura 25 -	Respiração mitocondrial isolada do coração nos animais sépticos e no grupo controle.....	55
Figura 26 -	Concentração de ATP no músculo esquelético durante e ao término do estudo.....	56

Lista de tabelas

Tabela 1 -	Combinações de pressão expiratória final positiva (PEEP) e fração inspirada de oxigênio (FiO ₂) permitidas durante a fase de ressuscitação protocolada do estudo.....	18
Tabela 2 -	Complexos da cadeia respiratória e estados da função mitocondrial avaliados.....	34
Tabela 3 -	Tratamentos administrados e balanço hídrico durante o estudo.....	41
Tabela 4 -	Parâmetros hemodinâmicos sistêmicos.....	45
Tabela 5 -	Parâmetros hemodinâmicos regionais, lactato arterial, temperaturas central e periférica.....	46
Tabela 6 -	Parâmetros respiratórios	47
Tabela 7 -	Resultados das gasometrias arteriais e hemoglobina.....	48
Tabela 8 -	Creatinina sérica e parâmetros bioquímicos.....	49
Tabela 9 -	Respiração mitocondrial dependente do Complexo II em mitocôndrias isoladas do músculo esquelético.....	51
Tabela 10 -	Respiração mitocondrial dependente do Complexo IV em mitocôndrias isoladas do músculo esquelético.....	51
Tabela 11 -	Respiração mitocondrial máxima (estado 3) avaliada em fibras musculares permeabilizadas.....	53
Tabela 12 -	Respiração mitocondrial máxima (estado 3) avaliada em fibras cardíacas permeabilizadas.....	53

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

↑	Aumentar
↓	Reduzir
°C	Graus Celsius
ADP	Bifosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BE	Excesso de base
BL	Baseline
bpm	Batimentos por minuto
BSA	Albumina de soro bovino
CG	Grupo controle sadio, não séptico, não submetido à indução de peritonite fecal
Cit C	Citocromo C
cm H ₂ O	Centímetros de água
CO ₂	Dióxido de carbono
D	Direita
DC	Débito cardíaco
dL	Decilitro
DP	Desvio padrão
E	Esquerda
EDTA	Ácido etilenodinitrilotetraacético
EGDT	Terapia precoce guiada por metas
EOP	Final do período de observação
EtCO ₂	Pressão parcial de CO ₂ ao final da expiração
EV	Endovenoso
F	French
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
FR	Frequência respiratória
FSC	Fluxo sanguíneo carotídeo
FSF	Fluxo sanguíneo femoral
G	Gauge
g	Gramas
G50%	Solução de glicose a 50%
GA	Glicemia arterial

Grupo ΔT -12h	Grupo séptico ressuscitado 12 horas após indução da peritonite fecal
Grupo ΔT -24h	Grupo séptico ressuscitado 24 horas após indução da peritonite fecal
Grupo ΔT -6h	Grupo séptico ressuscitado 6 horas após indução da peritonite fecal
h	Hora
Hb	Hemoglobina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico
HES	Hidroxietilamido 6% (130/04)
IC	Índice cardíaco
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
IFSC	Índice de fluxo sanguíneo carotídeo
IFSF	Índice de fluxo sanguíneo femoral
IIQ	Intervalo interquartil
IL-6	Interleucina-6
IM	Intramuscular
ipm	Incursões por minuto
IRVS	Índice de resistência vascular sistêmica
IVS	Índice de volume sistólico
KCl	Cloreto de potássio
L	Litro
mcg	Micrograma
mg	Miligrama
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mm Hg	Milímetros de mercúrio
mm/L	Milimoles por litro
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
O ₂	Oxigênio
PaCO ₂	Pressão arterial parcial de CO ₂
PAM	Pressão arterial média
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PaO ₂ /FiO ₂	Relação entre pressão parcial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio
PCR	Proteína C reativa
PEEP	Pressão expiratória final positiva

PF	Peritonite fecal
pg/ml	Picograma por mililitro
Pi	Fosfato inorgânico
PMAP	Pressão média na artéria pulmonar
pmol	Picomol
POAP	Pressão de oclusão da artéria pulmonar
PP	Pressão de platô
PVC	Pressão venosa central
Q	Coenzima Q ou ubiquinona
RCR	Razão de controle respiratório
RL	Ringer Lactato
RM-ANOVA	ANOVA para medidas repetidas
RP	Período de ressuscitação
RR	Frequência respiratória
s	Segundo
SNG	Sonda nasogástrica
SpO ₂	Saturação periférica de oxigênio
SvcO ₂	Saturação venosa central de oxigênio
SviO ₂	Saturação de oxigênio na veia cava inferior
SvO ₂	Saturação venosa mista de oxigênio
TC	Temperatura central
TMPD	Tetrametilfenilenediamina
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TP	Temperatura periférica
UI	Unidade Internacional
UTI	Unidades de terapia intensiva
VC	Volume corrente
VM	Volume minuto
VS	Volume sistólico

Resumo

Corrêa, TD. Efeito da ressuscitação tardia na gravidade da sepse, na intensidade do tratamento e na função mitocondrial em um modelo experimental de peritonite fecal [Tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: É provável que o tratamento precoce da sepse grave e do choque séptico possa melhorar o desfecho dos pacientes. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar como o atraso no início da ressuscitação da sepse influencia a gravidade da doença, a intensidade das medidas de ressuscitação necessárias para atingir estabilidade hemodinâmica, o desenvolvimento da disfunção orgânica e a função mitocondrial. **Métodos:** Estudo experimental, prospectivo, randomizado e controlado, realizado em um laboratório experimental de um hospital universitário. Trinta e dois porcos submetidos à anestesia geral e ventilados mecanicamente foram randomizados (8 animais por grupo) em um grupo controle sadio ou para um de três grupos em que induziu-se peritonite fecal (instilação peritoneal de 2,0 g/kg de fezes autólogas) e, após 6 (ΔT -6h), 12 (ΔT -12h) ou 24 (ΔT -24h) horas, iniciou-se um período de 48 horas de ressuscitação protocolada. **Resultados:** O retardo no início da ressuscitação da sepse foi associada a sinais progressivos de hipovolemia e ao aumento dos níveis plasmáticos de interleucina-6 e do fator de necrose tumoral alfa. O atraso no início do tratamento da sepse resultou em balanço hídrico progressivamente positivo ($2,1 \pm 0,5$ mL/kg/h, $2,8 \pm 0,7$ mL/kg/h e $3,2 \pm 1,5$ mL/kg/h, respectivamente, para os grupos ΔT -6h, ΔT -12h, e ΔT -24h, $p < 0,01$), maior necessidade de administração de noradrenalina durante as 48 horas de ressuscitação ($0,02 \pm 0,04$ mcg/kg/min, $0,06 \pm 0,09$ mcg/kg/min e $0,13 \pm 0,15$ mcg/kg/min, $p = 0,059$), redução da capacidade máxima de respiração mitocondrial cerebral dependente do Complexo II ($p = 0,048$) e tendência a aumento da mortalidade ($p = 0,08$). Houve redução do trifosfato de adenosina (ATP) na musculatura esquelética em todos os grupos estudados ($p < 0,01$), com os valores mais baixos nos grupos ΔT -12h e ΔT -24h. **Conclusões:** O aumento do tempo entre o início da sepse e o início das manobras de ressuscitação resultou no aumento da gravidade da doença, na maior intensidade das manobras de ressuscitação e na disfunção mitocondrial cerebral associada à sepse. Nossos resultados suportam o conceito da existência de uma janela crítica de oportunidade para ressuscitação da sepse.

Descritores: Sepse; Choque séptico; Choque; Ressuscitação; Hidratação; Vasoconstritores; Norepinefrina; Citocinas; Mitocôndrias; Insuficiência de múltiplos órgãos; Hemodinâmica; Peritonite; Suínos; Modelos animais

Abstract

Corrêa, TD. Effect of treatment delay on disease severity and need for resuscitation in porcine fecal peritonitis [Thesis]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introduction: Early treatment in sepsis may improve outcome. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the impact of delays in resuscitation on disease severity, need for resuscitation, and the development of sepsis-associated organ and mitochondrial dysfunction. **Methods:** Prospective, randomized, controlled experimental study performed at an experimental laboratory in a university hospital. Thirty-two anesthetized and mechanically ventilated pig were randomly assigned (n = 8 per group) to a nonseptic control group or one of three groups in which fecal peritonitis (peritoneal instillation of 2 g/kg autologous feces) was induced, and a 48 hour period of protocolized resuscitation started 6 (ΔT -6 hrs), 12 (ΔT -12 hrs), or 24 (ΔT -24 hrs) hours later. **Results:** Any delay in starting resuscitation was associated with progressive signs of hypovolemia and increased plasma levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α prior to resuscitation. Delaying resuscitation increased cumulative net fluid balances (2.1 ± 0.5 mL/kg/hr, 2.8 ± 0.7 mL/kg/hr, and 3.2 ± 1.5 mL/kg/hr, respectively, for groups ΔT -6 hrs, ΔT -12 hrs, and ΔT -24 hrs; $p < 0.01$) and norepinephrine requirements during the 48-hr resuscitation protocol (0.02 ± 0.04 mcg/kg/min, 0.06 ± 0.09 mcg/kg/min, and 0.13 ± 0.15 mcg/kg/min; $p = 0.059$), decreased maximal brain mitochondrial Complex II respiration ($p = 0.048$), and tended to increase mortality ($p = 0.08$). Muscle tissue adenosine triphosphate decreased in all groups ($p < 0.01$), with lowest values at the end in groups ΔT -12 hrs and ΔT -24 hrs. **Conclusions:** Increasing the delay between sepsis initiation and resuscitation increases disease severity, need for resuscitation, and sepsis-associated brain mitochondrial dysfunction. Our results support the concept of a critical window of opportunity in sepsis resuscitation.

Descriptors: Sepsis; Shock, septic; Shock; Resuscitation; Fluid therapy; Vasoconstrictor agents; Norepinephrine; Cytokines; Mitochondria; Multiple organ failure; Hemodynamics; Peritonitis; Swine; Models, animal.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o tratamento da sepse grave e do choque séptico representam um dos maiores desafios enfrentados na área da terapia intensiva^{1,2}. Embora muitos avanços tenham sido feitos no que se refere ao tratamento da sepse grave e do choque séptico, sua morbidade e mortalidade ainda permanecem muito elevadas^{3,4}.

Estima-se que a incidência anual da sepse grave nos Estados Unidos seja de três casos por 1000 pacientes, com aumento de 1,5% ao ano, taxa de mortalidade próxima de 30% e custo anual de 17 bilhões de dólares⁵. Estudos epidemiológicos realizados em diferentes países apontaram o choque séptico como principal causa de morte nas unidades de terapia intensiva (UTI)⁶. Um estudo de coorte prospectivo, multicêntrico, brasileiro envolvendo cinco unidades de terapia intensivas médico-cirúrgicas, com um total de 1383 pacientes adultos, demonstrou que a densidade de incidência da sepse grave e do choque séptico é, respectivamente, de 35,6 e 30,0 por 1000 pacientes-dia, com a taxa de mortalidade aproximada de 47% na sepse grave e de 52% no choque séptico⁷.

Estudos epidemiológicos demonstraram que aproximadamente metade dos casos de sepse grave e choque séptico possuem origem pulmonar, seguido das infecções intra-abdominais (20 a 25%), do trato urinário (10%) e da infecção da corrente sanguínea⁸⁻¹⁰. Entretanto, em 30 a 40% dos pacientes com sepse grave e choque séptico não é possível identificar o agente etiológico causador da infecção^{8,9}.

A maior parte dos óbitos em pacientes com sepse grave e choque séptico pode ser atribuída ou à falência cardiovascular ou a progressão da doença para disfunção e falência de múltiplos órgãos e sistemas^{11,12}. Os fatores determinantes da disfunção e falência de órgãos na sepse não estão completamente elucidados¹³. A perfusão tecidual inadequada^{14,15}, a disfunção mitocondrial¹⁶, inflamação sistêmica e alterações metabólicas ao nível celular são possíveis contribuintes^{11,17}.

Diversas medidas terapêuticas administradas aos pacientes graves como a ressuscitação com fluidos¹⁸⁻²², a utilização de vasopressores e agentes inotrópicos²³⁻²⁶ também têm sido implicadas como contribuintes e perpetuadores do desenvolvimento da disfunção orgânica e com o aumento da mortalidade. Tanto a composição como o volume dos fluídos administrados podem apresentar efeitos deletérios, principalmente para os rins^{20,21} e pulmões^{18,19}. Os vasopressores, frequentemente utilizados em pacientes sépticos para restaurar a pressão arterial sistêmica e, desta forma, a pressão de perfusão tecidual, podem contribuir para o desenvolvimento da disfunção mitocondrial^{23,25}, aumentar a morbidade e a mortalidade em pacientes sépticos^{26,27}.

A administração de fluidos e antibióticos possui extrema importância na fase inicial da ressuscitação de pacientes com sepse grave e choque séptico³. Rivers et al. demonstraram em pacientes sépticos com hipoperfusão tecidual caracterizada por hipotensão arterial sistêmica (pressão arterial média < 65 mm Hg) ou pela presença de lactato arterial superior a 4 mmol/L (36 mg/dL), após terem recebido 20 mL por kg de cristaloides ou equivalentes, que o emprego de uma terapia precoce guiada por metas (EGDT) reduziu a mortalidade hospitalar (46,5% vs. 30,5%, respectivamente para grupo controle e grupo EGDT; p = 0,009), a mortalidade em 28 e em 60 dias²⁸. Estes achados foram confirmados posteriormente em estudos mais recentes, que continuam demonstrando que a adoção precoce de metas no atendimento de pacientes com sepse grave e choque séptico tem o potencial de reduzir a mortalidade²⁹.

Em um estudo de coorte histórico envolvendo 14 unidades de terapia intensiva com um total de 2731 pacientes com choque séptico foi demonstrado que para cada hora de atraso na administração da primeira dose de antibiótico após o surgimento de hipotensão arterial sistêmica recorrente ou persistente, houve aumento de aproximadamente 12% no risco de morte hospitalar (*odds ratio* 1,119 [por hora de atraso], intervalo de confiança de 95%: 1,103 a 1,136, p<0,0001)³⁰. Neste mesmo estudo, apenas 50% dos pacientes receberam terapia antimicrobiana efetiva nas primeiras seis horas do início da hipotensão arterial³⁰.

Resultados semelhantes foram publicados posteriormente por Gaieski e et al. em um estudo de coorte histórico envolvendo 261 pacientes com choque séptico submetidos à terapia precoce guiada por metas³¹. Os autores demonstraram que o tempo transcorrido entre a triagem dos pacientes no departamento de emergência e a administração de antibióticos adequados inferior à uma hora associou-se a 70% de redução do risco de morte hospitalar (*odds ratio* 0,30, intervalo de confiança de 95%: 0,11 a 0,83, $p = 0.02$)³¹. Estes estudos sugerem, em conjunto, que o tempo decorrido entre o diagnóstico da sepse grave e do choque séptico e o início da ressuscitação possui importante impacto no desfecho dos pacientes, afetando tanto sua morbidade quanto mortalidade²⁸⁻³¹.

Todavia, os estudos clínicos prospectivos envolvendo pacientes com sepse grave e choque séptico que avaliaram o impacto da terapia precoce guiada por metas incluíram pacientes com diferentes tempos de evolução doença^{28,29}. Nestes estudos o ponto de início da sepse foi considerado como sendo a chegada do paciente ao hospital e o início do tratamento deflagrado a partir da inclusão do paciente nos respectivos estudos^{28,29}. Desta forma, o impacto do tempo decorrido entre o início da sepse e o início do tratamento na gravidade da doença, na intensidade da resposta inflamatória, na intensidade das manobras necessárias para ressuscitação e estabilização hemodinâmica, no desenvolvimento da disfunção de órgãos e na função mitocondrial ainda não foi estudado até o presente momento.

Nossa hipótese é que o atraso no início da ressuscitação da sepse influencia a intensidade da resposta inflamatória, a gravidade da doença, o desenvolvimento das disfunções orgânica e mitocondrial e aumenta a necessidade de fluídos e vasopressores para o restabelecimento da estabilidade hemodinâmica.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do tempo decorrido entre o início da sepse e o início da ressuscitação na gravidade da doença, na intensidade da resposta inflamatória, na intensidade das manobras de ressuscitação para o restabelecimento da estabilidade hemodinâmica, no desenvolvimento de disfunção de órgãos e na função mitocondrial em um modelo experimental de sepse abdominal.

3. MÉTODOS

3.1. FINANCIAMENTO E APROVAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental (*Experimental Chirurgische Station*) do departamento de Medicina Intensiva do Hospital Universitário de Berna (*Inselspital*), Berna, Suíça e fez parte do projeto “*Time to resuscitation, hemodynamic targets and angiotensin: effects on mitochondrial function and outcome in experimental sepsis*” que, devido a sua extensão e complexidade, foi desenvolvido em três fases consecutivas:

Fase I: “*Efeito da ressuscitação tardia na gravidade da sepse, intensidade do tratamento e função mitocondrial em modelo experimental de peritonite fecal*”³². Os experimentos foram realizados entre setembro de 2009 a junho de 2010. Os resultados deste estudo são apresentados nesta tese com objetivo de obtenção do título de Doutor em Ciências.

Fase II: “*Impacto dos alvos de pressão arterial média na sepse, na disfunção de órgãos e na respiração mitocondrial em um modelo experimental de peritonite fecal*”³³. Os experimentos foram realizados entre agosto de 2010 a março de 2011.

Fase III: “*Angiotensina-II no choque séptico: efeitos na perfusão tecidual, função de orgânica e na respiração mitocondrial em um modelo porcino de peritonite fecal*” Os experimentos foram realizados entre abril de 2011 a julho de 2011. Manuscrito em análise (*Critical Care Medicine*).

Este estudo foi coordenado na sua totalidade pelo Prof. Dr. Jukka Takala e pelo Prof. Dr. Stephan Mathias Jakob e desenvolvido no período de agosto de 2009 a agosto de 2011, no qual atuei como *Research Fellow* do Departamento de Medicina Intensiva do Hospital Universitário de Berna (*Inselspital*), Berna, Suíça.

O financiamento do estudo foi proveniente da *Swiss National Science Foundation* (Projeto nº 127619) obtido pelos Prof. Dr. Jukka Takala e Prof. Dr. Stephan Mathias Jakob. O valor total do financiamento foi de 468.000,00 Francos Suíços. Detalhes referentes a este financiamento podem ser obtidos no *website* <http://www.projectdb.snf.ch/WebForms/Frameset.aspx>.

O protocolo de pesquisa foi previamente submetido e aprovado sem restrições pelo Comitê de Estudos com Animais do Departamento de Agricultura e Natureza do Cantão de Berna, Suíça e pelo Serviço Veterinário Secretaria de Estudos com Animais do Cantão de Berna, Suíça (Anexo 1).

3.2. PREPARO DOS ANIMAIS E ANESTESIA

Trinta e dois porcos com peso médio (\pm DP) de $40,3 \pm 3,7$ Kg, de ambos os sexos, provenientes de uma fazenda de produção comercial de alto padrão sanitário foram utilizados. Os animais foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas com livre acesso a água antes do início dos experimentos.

Após realização da pré-medicação com cetamina (20,0 mg/kg), xilazina (2,0 mg/kg) e atropina (0,05 mg/kg), administrados por via intramuscular, um cateter intravenoso periférico com calibre de 20G foi inserido em uma veia periférica da orelha dos animais para administração inicial de fluidos e medicações. Então, foi realizada tricotomia das regiões torácica e caudal para posicionamento e fixação dos eletrodos cutâneos para monitorização multiparamétrica (Figura 1 A-C).

Após indução da anestesia com midazolam (0,5 mg/kg) e atropina (0,02 mg/kg) administrados por via endovenosa, os animais foram submetidos, respectivamente, a intubação orotraqueal (cânula com balão; diâmetro 6,5 – 7,5) e a passagem de uma sonda gástrica de grosso calibre para decompressão gástrica e mensuração do débito gástrico durante todo estudo (Figura 1 D-E). A seguir, após degermação da pele com clorexidine degermante e clorexidine alcoólico, campos estéreis foram fixados sobre o animal, delimitando-se as regiões cervical e inguinal bilateralmente (Figura 1 F).

A manutenção da anestesia foi realizada através da infusão endovenosa contínua, em bomba de infusão, de propofol (4,0 mg/kg/h) e fentanil (5,0 mcg/kg/h durante o período de instrumentação e 2,0 mcg/kg/h após o término da cirurgia). As doses máximas permitidas de propofol e de fentanil durante o estudo foram, respectivamente, 8,0 mg/kg/h e 10,0 mcg/kg/h. Quando necessário, doses complementares de fentanil (50 a 100 mcg) e/ou de

midazolam (5,0 mg) foram administradas por via endovenosa. Os níveis de sedação e analgesia foram avaliados a cada hora, através da compressão manual do nariz dos animais.

Os animais foram ventilados (*Servo-i; Maquet Critical Care, Solna, Sweden*) em modo volume-controlado, com fração inspirada de oxigênio (FiO_2) de 30%, pressão expiratória final positiva (PEEP) de 5 cm H₂O, volume corrente de 8,0 mL/kg, frequência respiratória de 20 respirações por minuto e com volume minuto ajustado para manter a pressão arterial de CO₂ ($PaCO_2$) entre 35 e 45 mm Hg.

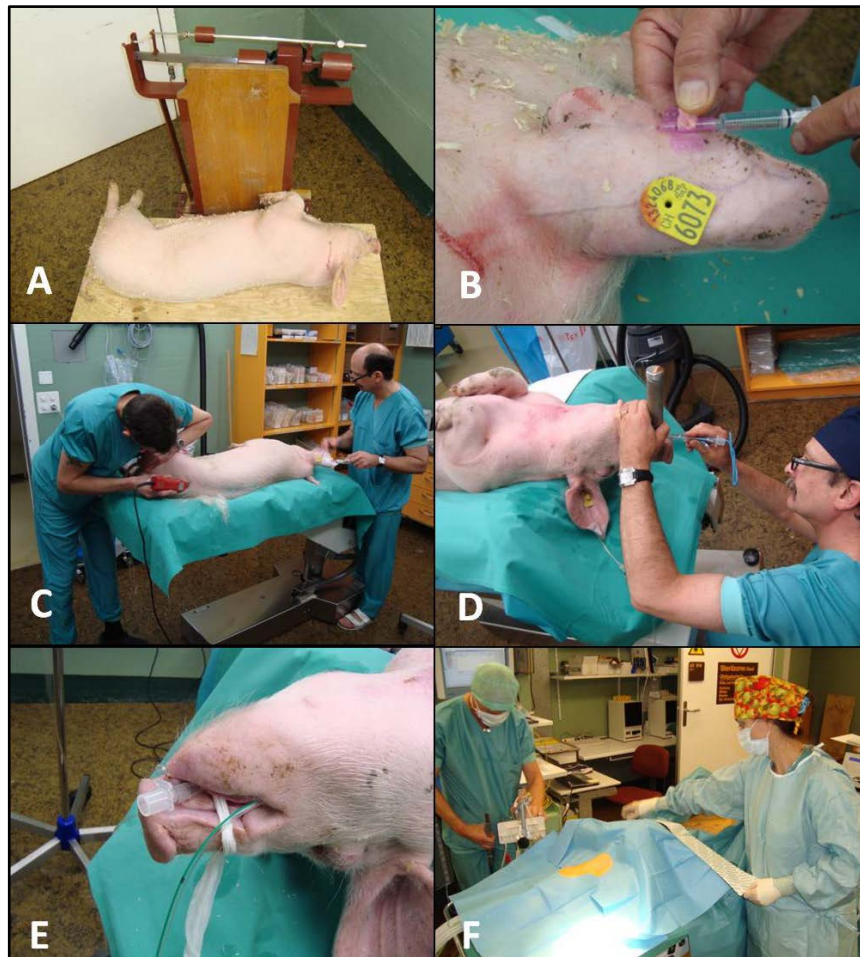


Figura 1. Preparo dos animais para o início dos experimentos; A = pesagem do animal após realização da pré-medicação, B = cateterização de veia periférica na orelha esquerda, C = tricotomia para fixação de eletrodos e indução da anestesia, D = intubação orotraqueal, E = cânula orotraqueal e sonda orogástrica posicionadas, F = animal em posição supina para fixação de campos estéreis após degermação da pele com clorexidine degermante e clorexidine alcoólico

3.3. INSTRUMENTAÇÃO

Com o animal em posição supina, os seguintes procedimentos foram realizados (Figura 2): dissecação da veia jugular interna direita para inserção de um cateter de artéria pulmonar com extremidade distal localizada na artéria pulmonar, dissecação da veia jugular interna esquerda para inserção de um cateter de artéria pulmonar com extremidade distal localizada na veia cava superior, dissecação da artéria carótida comum direita para inserção de um cateter arterial para aferição da pressão arterial sistêmica e coleta de amostras sangue para análise laboratorial, dissecação da artéria carótida comum esquerda para inserção, em torno da artéria, de um probe de ultrassom doppler de 4 mm para aferição do fluxo sanguíneo carotídeo (*Transonic® System Inc., Ithaca, NY, USA*) (Figura 3), dissecação da veia femoral direita para inserção de um cateter de artéria pulmonar com extremidade distal localizada na veia cava inferior, dissecação da veia femoral esquerda para inserção de um cateter venoso central de duplo lúmen, e por fim, dissecação da artéria femoral esquerda para inserção, em torno da artéria femoral, de um probe de ultrassom doppler de 4 mm para aferição do fluxo sanguíneo femoral (*Transonic® System Inc., Ithaca, NY, USA*).

Através de uma laparotomia mediana de aproximadamente 8,0 cm, foi realizada uma cistostomia para aferição contínua do débito urinário ao longo do estudo e inserido um dreno intra-peritoneal de grosso calibre (Figura 4 A). Este dreno, posteriormente, foi utilizado para indução da peritonite fecal (Figura 4 B). Após estes procedimentos, a parede abdominal foi suturada por planos e mantida fechada durante todo experimento. Nos primeiros oito animais, ao término do período de instrumentação e ao término do estudo, foram realizados controles radiográficos, por fluoroscopia, para assegurar o correto posicionamento de cada cateter inserido.

Durante todo o estudo, os animais receberam infusão basal endovenosa contínua composta por Ringer Lactato e glicose 50%. A soma das duas soluções (Ringer Lactato e glicose 50%) foi mantida em 3,0 mL/kg/h. As infusões foram iniciadas com 2,5 mL/kg/h de Ringer Lactato e 0,5 mL/kg/h de glicose 50%, sendo que a proporção de Ringer Lactato e glicose 50% foi ajustada durante

todo experimento para manter a glicemia arterial entre 3,5 e 8,3 mmol/L (63 - 150 mg/dL). Com objetivo de repor a perda de fluidos durante a cirurgia, todos os animais receberam, ao término do período de instrumentação, 500 mL de Ringer Lactato administrados em 20 minutos por via endovenosa.

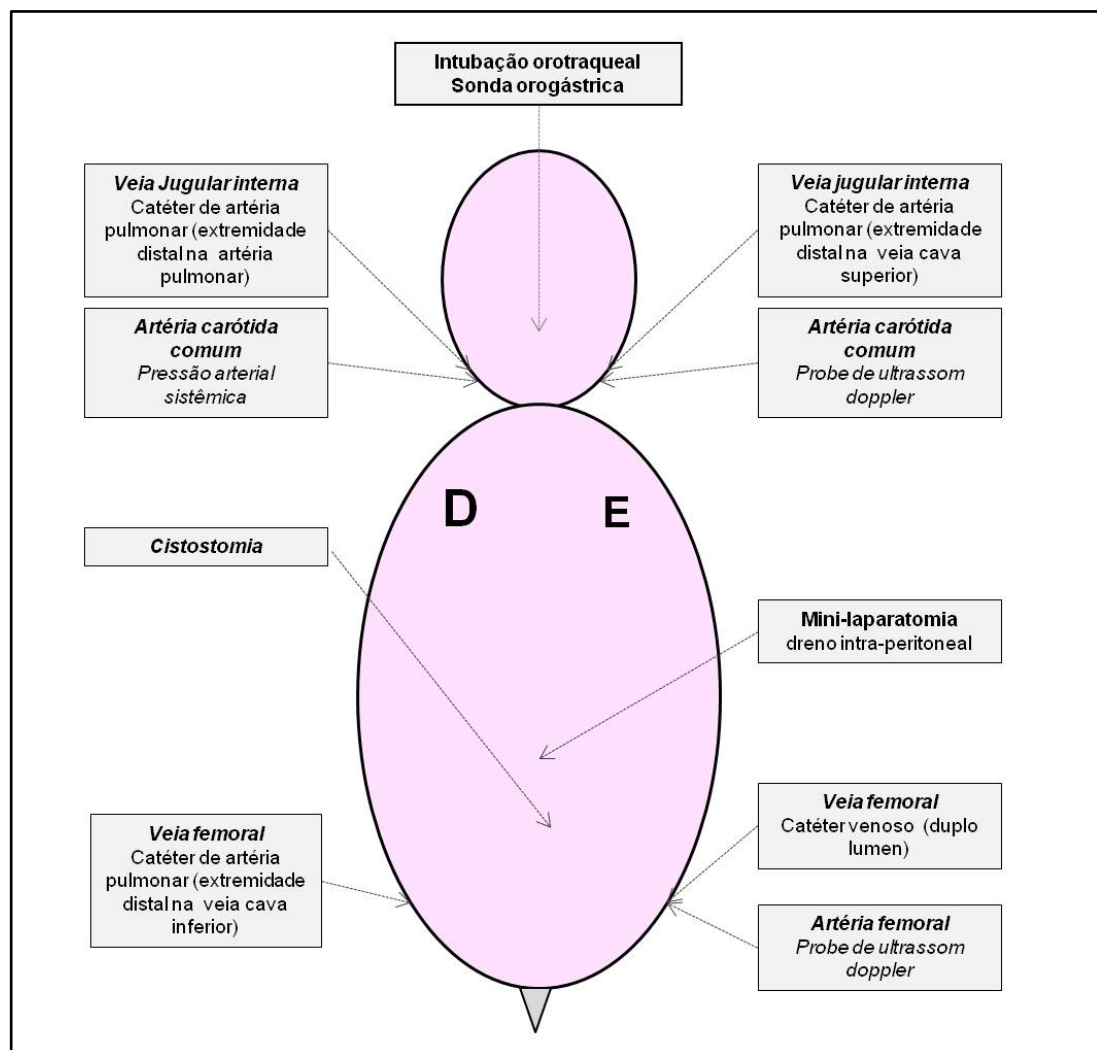


Figura 2. Modelo esquemático de um animal em posição supina demonstrando os procedimentos realizados durante a instrumentação

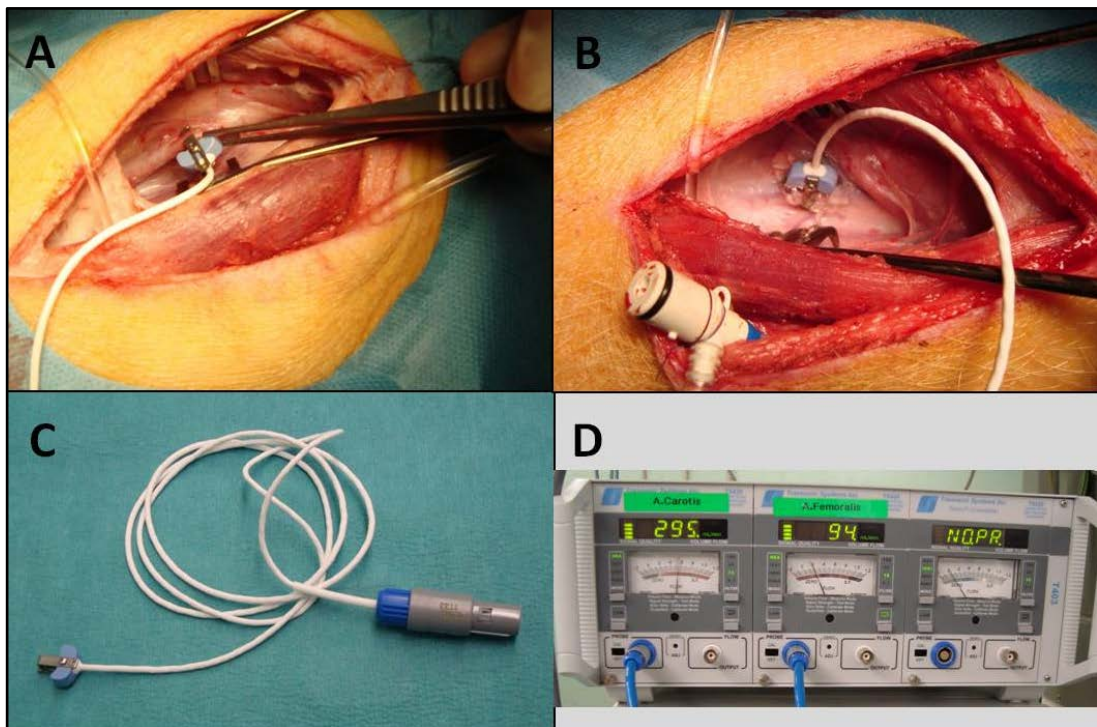


Figura 3. Monitorização do fluxo sanguíneo da artéria carótida comum esquerda; A = posicionamento do probe de ultrassom doppler em torno da artéria carótida comum esquerda, B = probe de ultrassom doppler na posição adequada para mensuração do fluxo sanguíneo carotídeo, C = detalhe do probe de ultrassom doppler de 4 mm (*Transonic® System Inc., Ithaca, NY, USA*), D = fluxômetro TS 420 (*Transonic® System Inc., Ithaca, NY, USA*)

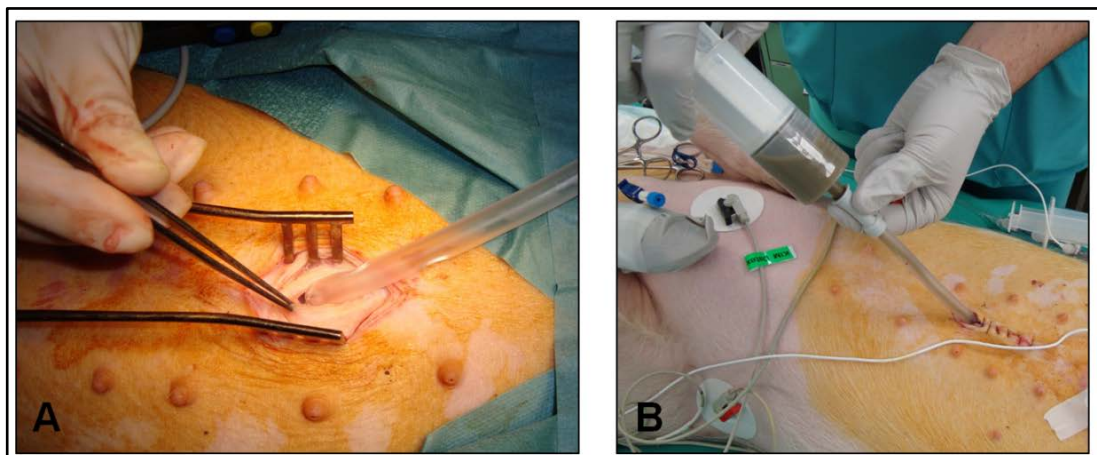


Figura 4. Inserção do dreno intra-abdominal e indução da peritonite fecal; A = inserção do dreno intra-abdominal e B = indução da peritonite fecal

3.4. MONITORIZAÇÃO

Variáveis hemodinâmicas e respiratórias foram monitorizadas durante o estudo através de um monitor multi-modular (*S/5 Critical Care Monitor; Datex-Ohmeda, GE Healthcare, Helsinki, Finland*) e gravadas com o auxílio de um prontuário médico digitalizado customizado para o estudo (*Centricity Clinisoft; GE Healthcare*) (Figura 5 A). Todos os fluidos, drogas vasoativas, sedativos e analgésicos administradas durante o estudo foram registrados eletronicamente (*Centricity Clinisoft; GE Healthcare*) (Figura 5 B). O débito urinário foi mensurado de 1/1 hora e o débito pela sonda nasogástrica mensurado no término do estudo.

As seguintes variáveis hemodinâmicas e respiratórias foram monitorizadas, coletadas e gravadas: pressão arterial sistêmica (sistólica, diastólica e média), pressão na artéria pulmonar (sistólica, diastólica e média), frequência cardíaca, débito cardíaco, saturação venosa mista de oxigênio, saturação venosa central de oxigênio, saturação venosa de oxigênio na veia cava inferior, pressão venosa central, pressão de oclusão da artéria pulmonar, fluxo sanguíneo na artéria carótida comum, fluxo sanguíneo na artéria femoral, temperatura central, temperatura periférica, volume minuto expirado, volume corrente, frequência respiratória, pressão de platô, pressão de pico, pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, fração inspirada de oxigênio e pressão expiratória final positiva.

A pressão arterial média, pressão média na artéria pulmonar, o débito cardíaco, o fluxo sanguíneo carotídeo, o fluxo sanguíneo femoral, a saturação venosa mista de oxigênio, a saturação venosa central de oxigênio, a saturação de oxigênio na veia cava inferior e a pressão parcial de CO₂ ao final da expiração foram gravadas e armazenadas continuamente utilizando o programa Soleasy™ (*Soleasy; National Instruments Corp, Austin, TX*) (Figura 6).

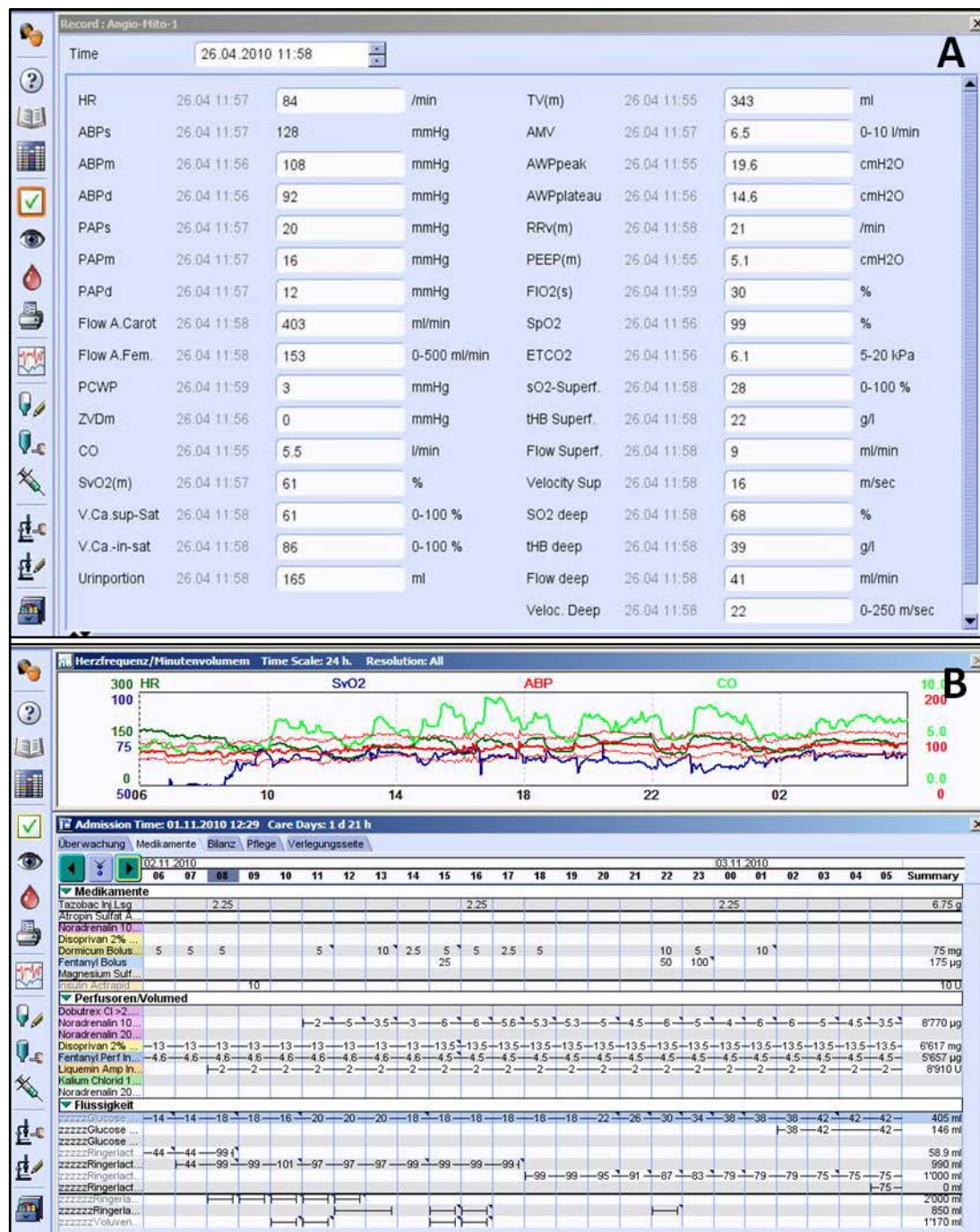


Figura 5. Exemplo do registro de dados no prontuário digitalizado do estudo (*Centricity Clinisoft; GE Healthcare*); A = registro de dados hemodinâmicos e respiratórios, B = registro de fluidos e drogas administradas durante o estudo

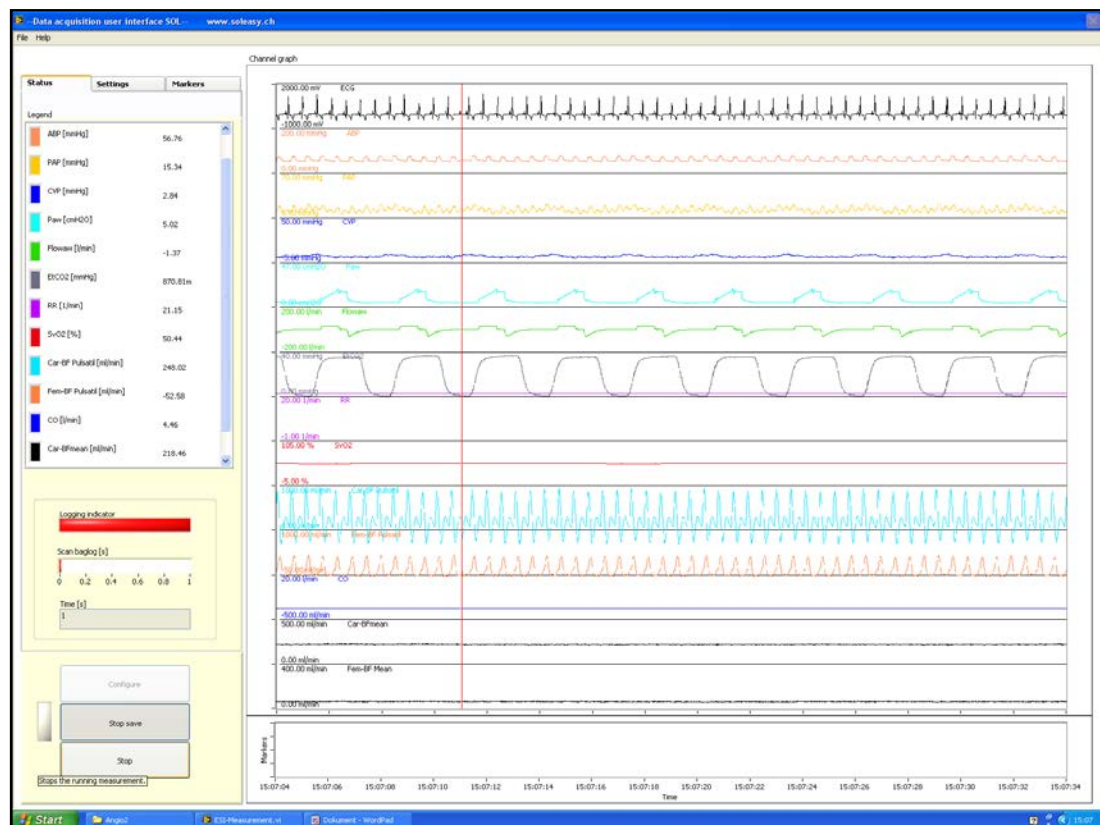


Figura 6. “Printscreen” obtido durante um experimento demonstrando o armazenamento contínuo de dados hemodinâmicos e respiratórios através do programa *Soleasy™*; (*Soleasy; National Instruments Corp, Austin, TX*)

3.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após o preparo cirúrgico, os animais foram submetidos a 30 minutos de repouso absoluto para estabilização. Ao término deste período, foram realizadas, respectivamente, as medidas iniciais (*Baseline*), a randomização dos animais (envelopes opacos e selados) e a indução da peritonite fecal.

A peritonite fecal foi induzida através da infusão pelo dreno peritoneal de 2,0 gramas por kg de peso de fezes autólogas, dissolvidas em 250 mL de soro glicosado 5% (Figura 4 B).

Os animais foram randomizados em quarto grupos, contendo oito animais cada (Figura 7):

Grupo ΔT -6h: As manobras de ressuscitação foram iniciadas 6 horas após a indução da peritonite fecal e mantidas por 48 horas;

Grupo ΔT -12h: As manobras de ressuscitação foram iniciadas 12 horas após a indução da peritonite fecal e mantidas por 48 horas;

Grupo ΔT -24h: As manobras de ressuscitação foram iniciadas 24 horas após a indução da peritonite fecal e mantidas por 48 horas;

Grupo controle (CG): Grupo controle sadio, não submetido à indução da peritonite fecal. As manobras de ressuscitação foram iniciadas 24 horas após o término da cirurgia e mantidas por 48 horas.

Na figura 7 apresentamos esquematicamente o delineamento experimental e na figura 8 uma visão geral do laboratório de Cirurgia Experimental (*Experimental Chirurgische Station*) do Hospital Universitário de Berna com dois animais de experimentação no período de observação.

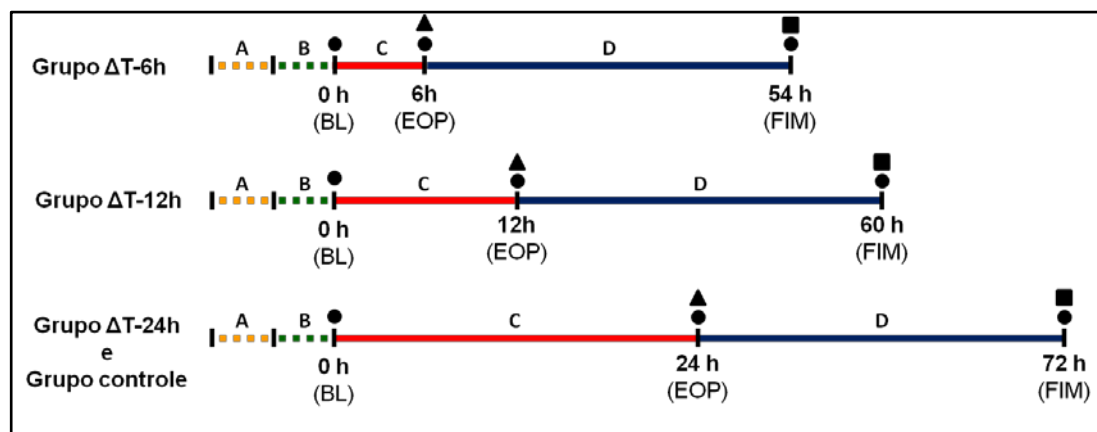


Figura 7. Delineamento do estudo; A = preparo cirúrgico com duração de 1 a 2 horas, B = período de 30 minutos para estabilização, coleta dos dados (*Baseline*), randomização e indução da peritonite fecal (nos grupos sépticos apenas), C = período de observação, D = período de ressuscitação, BL = baseline; EOP = final do período de observação, círculos pretos = obtenção de amostra de músculo quadríceps direito para análise da função mitocondrial e quantificação do conteúdo de ATP, triângulos pretos = primeira dose de antibiótico endovenoso (piperacilina/tazobactam, 2,25 g, 8/8h) e início da administração de profilaxia de trombose venosa profunda (Liquemine®, 10.000 UI, EV, a cada 24 horas); quadrados pretos = obtenção de amostra de tecido do cérebro, fígado e coração (ventrículo esquerdo) para análise da função mitocondrial no fim do experimento (54, 60, ou 72 horas respectivamente para os grupos ΔT -6h, ΔT -12h, ΔT -24 h e grupo controle ou imediatamente antes da morte, caso precoce)



Figura 8. Visão geral do laboratório de Cirurgia Experimental do Hospital Universitário de Berna

3.6. RESSUSCITAÇÃO PROTOCOLADA

O período de ressuscitação protocolada foi iniciado após 6, 12 ou 24 horas de sepse sem tratamento, respectivamente, nos grupos ΔT -6h, ΔT -12h, ΔT -24 h e grupo controle, e teve duração de 48 horas em todos os grupos (Figura 7).

As manobras de ressuscitação foram realizadas por médicos intensivistas treinados, com auxílio de enfermeiros de pesquisa e de acadêmicos de medicina do departamento de Medicina Intensiva do Hospital Universitário de Berna (*Inselspital*).

Todos os profissionais envolvidos neste projeto receberam treinamento sobre o protocolo de pesquisa antes do início do estudo. Durante os experimentos, uma equipe composta por um médico intensivista, um

enfermeiro de pesquisa, um acadêmico de medicina e um biólogo com treinamento para realização da análise da função mitocondrial encontrava-se no laboratório. As equipes se alternavam em jornadas de 12 horas. Durante o período diurno, estavam ainda presentes no laboratório um médico veterinário e dois técnicos de laboratório.

A fase de ressuscitação protocolada, com duração de 48 horas, consistiu na administração de fluídos, vasopressores e inotrópicos de acordo com um algoritmo para suporte hemodinâmico (Figura 9), suporte ventilatório constituído por aspiração traqueal, manobras de recrutamento pulmonar e ajustes da PEEP e FiO_2 (Figura 10), administração de antibióticos de amplo espectro, controle glicêmico restrito (Figura 11), administração de profilaxia para trombose venosa profunda e controle dos níveis séricos de potássio (Figura 12). A seguir, descrevemos detalhadamente estas intervenções.

3.6.1. Suporte hemodinâmico

Durante o período de ressuscitação, a volemia dos animais foi avaliada com a periodicidade mínima de 1/1 hora de acordo com o algoritmo para ressuscitação volêmica apresentado na Figura 9.

Quando sinais de hipovolemia tornavam-se evidentes, foram administrados bolus de volume contendo 150 mL de Ringer Lactato ou hidroxietilamido (HES) 130/04 (Voluven®). Bolus de HES e de Ringer Lactato foram administrados alternadamente até que o volume máximo de HES (30 mL/Kg) fosse atingido. Após este limite, apenas bolus de Ringer Lactato foram administrados quando necessário. Considerou-se resposta positiva a administração de volume o aumento de 10% ou mais do volume sistólico (VS) em relação ao seu valor prévio antes da administração do fluído.

Após otimização da pré-carga, se a saturação venosa mista de oxigênio se mantivesse inferior a 50% e não houvesse mais incremento com a administração de fluidos, era iniciada dobutamina na dose de 5,0 mg por hora. Esta dose era aumentada a cada 30 minutos em 5,0 mg por hora até que a saturação venosa mista de oxigênio se mantivesse superior a 50% ou até que a

dose máxima de 20 mg por hora de dobutamina fosse atingida. Quando necessário, iniciava-se a administração de noradrenalina com objetivo de manter a pressão arterial média acima de 60 mm Hg durante o período de ressuscitação (Figura 9).

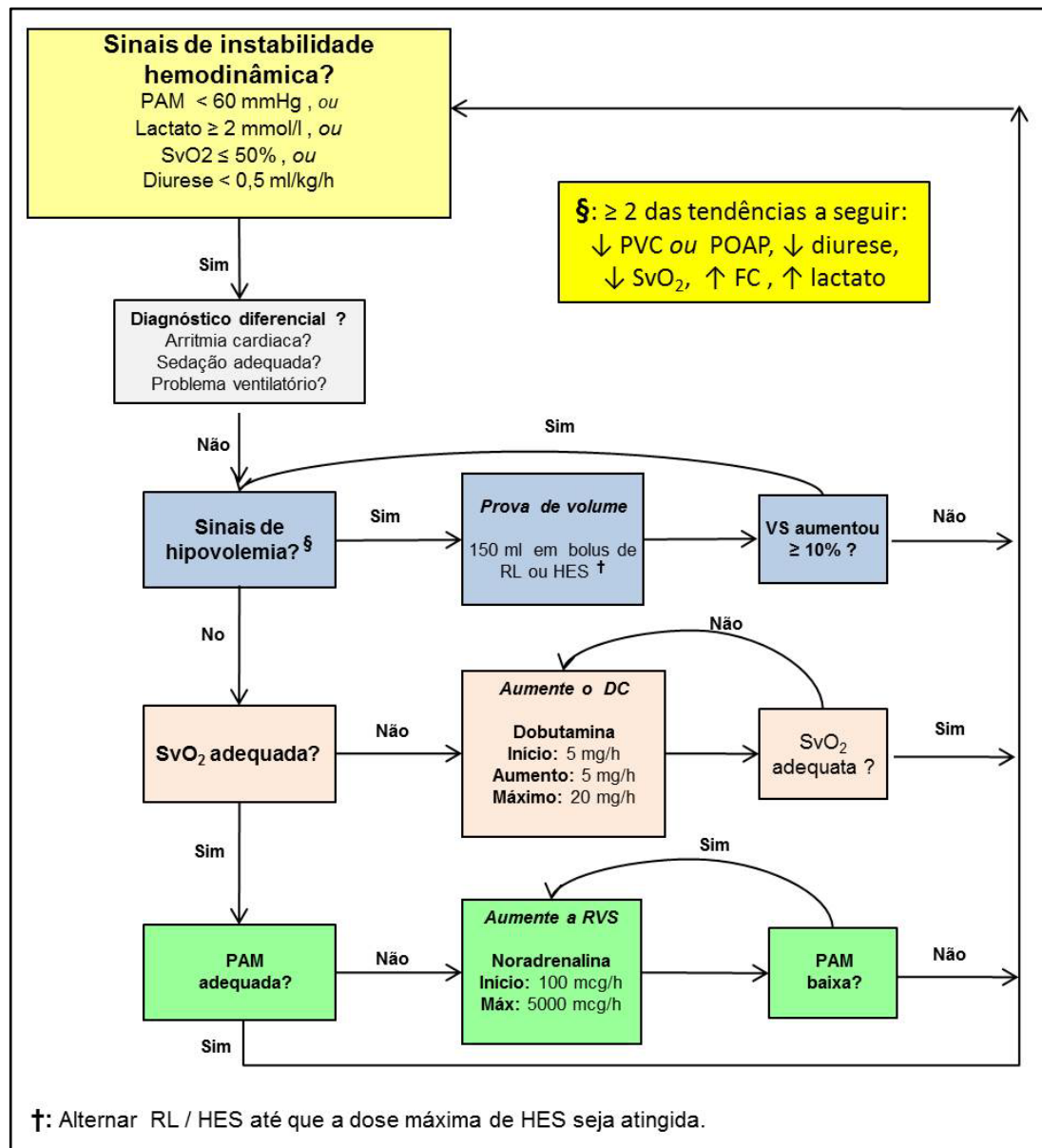


Figura 9. Algoritmo para suporte hemodinâmico utilizado durante a fase de ressuscitação protocolada do estudo; PAM = pressão arterial média, FC = frequência cardíaca, PVC = pressão venosa central, POAP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, RVS = resistência vascular sistêmica, DC = débito cardíaco, VS = volume sistólico, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, RL = Ringer Lactato e HES = hidroxietilamido 130/04 (Voluven®)

3.6.2. Suporte respiratório

Durante os períodos de instrumentação e observação, os animais foram ventilados em modo volume-controlado, com fração inspirada de oxigênio de 30%, pressão expiratória final positiva de 5,0 cm H₂O e volume corrente de 8,0 mL/kg (*Servo-i; Maquet Critical Care, Solna, Sweden*). Nestas duas fases do estudo, permitiu-se apenas ajustar o volume minuto para manter a PaCO₂ entre 35 a 45 mm Hg por meio do ajuste da frequência respiratória.

Durante o período de 48 horas de ressuscitação protocolada, a fração inspirada de oxigênio, a PEEP e o volume corrente foram ajustados de acordo com um protocolo para manter a pressão parcial arterial de oxigênio (PaO₂) entre 100 - 150 mmHg, a saturação de oxigênio (SpO₂) > 90% e a pressão de platô ≤ 30 cm H₂O. Curtos períodos com duração inferior a 10 minutos de SpO₂ ≤ 90% foram tolerados sem que houvesse necessidade de ajustes na PEEP ou na FiO₂.

Todos os animais foram submetidos à aspiração traqueal a cada 12 horas. Na presença de queda sustentada na saturação (duração superior a 10 minutos) ou queda na oxigenação (PaO₂ < 100 mm Hg), os seguintes procedimentos sequenciais foram realizados (Tabela 1 e Figura 10):

- Verificação do correto posicionamento e limpeza do oxímetro de pulso;
- Realização de aspiração traqueal;
- Realização de manobra de recrutamento pulmonar
- Ajuste da PEEP e da FiO₂.

TABELA 1 - Combinações de pressão expiratória final positiva (PEEP) e fração inspirada de oxigênio (FiO₂) permitidas durante a fase de ressuscitação protocolada do estudo

FiO ₂ (%)	40	50	60	70	80	90	100
PEEP	6	8	10	12	14	16	18-24

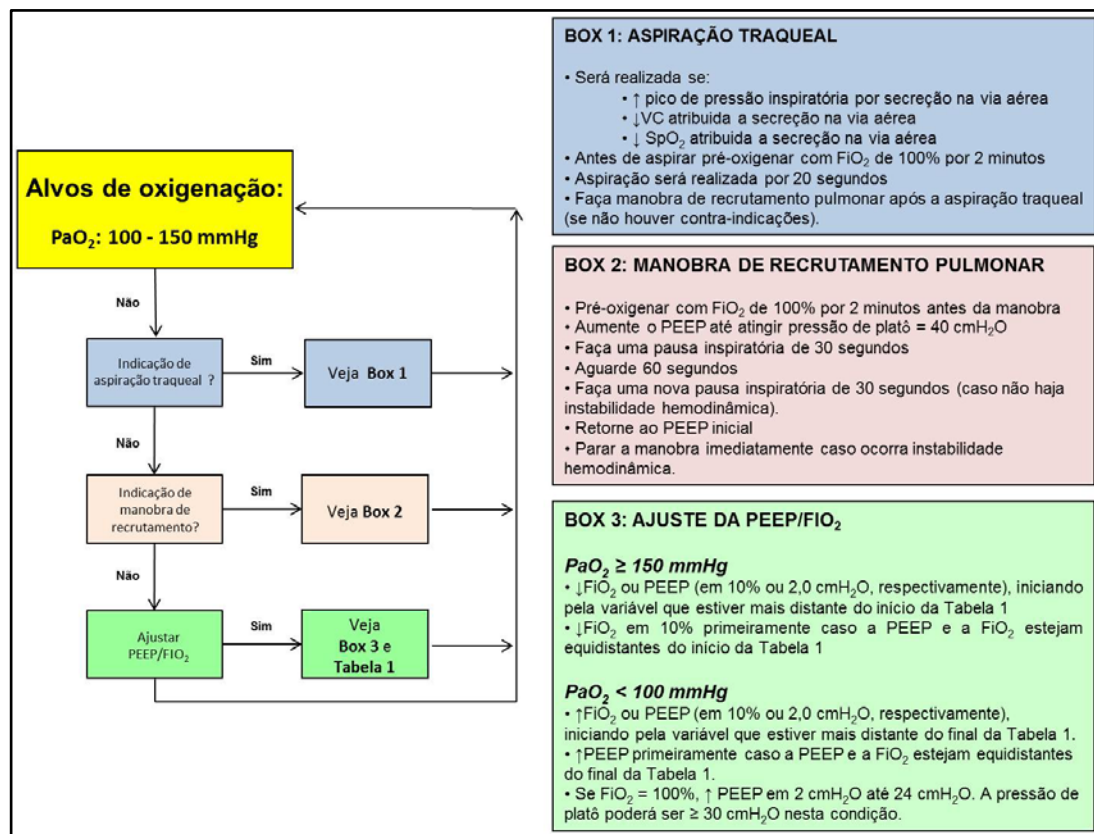


Figura 10. Protocolo para suporte ventilatório utilizado durante o período de ressuscitação

3.6.2.1. Procedimento para aspiração traqueal

A aspiração traqueal foi realizada a cada 12 horas durante o período de ressuscitação em todos os animais e sempre que alguma das seguintes situações ocorressem: aumento do pico de pressão inspiratória, redução do volume corrente atribuída a secreção em via aérea ou redução da SpO₂ atribuída a presença de secreção nas vias aéreas.

Antes de realizar o procedimento de aspiração traqueal, os animais foram pré-oxigenados com FiO₂ de 100% por 2 minutos. As aspirações foram realizadas utilizando-se um circuito fechado de aspiração, com pressão negativa contínua por 20 segundos. Após o término de cada procedimento de aspiração traqueal, realizava-se manobra de recrutamento pulmonar, caso não houvesse contra indicação para realização deste procedimento (Figura 10).

3.6.2.2. Manobra de recrutamento pulmonar

Durante o período de ressuscitação, as manobras de recrutamento pulmonar foram realizadas a cada doze horas e após cada manobra de aspiração traqueal, conforme descrito a seguir (Figura 10).

Antes de realizar a manobra de recrutamento pulmonar, os animais foram pré-oxigenados com FiO_2 de 100% por 2 minutos. A seguir, aumentava-se a PEEP até que a pressão de platô atingisse 40 cm H_2O . Com este nível de pressão, realizava-se pausa inspiratória de 30 segundos e reduzia-se a PEEP lentamente, durante 30 segundos, até que o seu valor pré-recrutamento fosse atingido. Caso não ocorresse nenhum sinal de instabilidade hemodinâmica durante esta manobra, repetia-se todo o procedimento, após intervalo de 60 segundos. Caso ocorresse algum sinal de instabilidade hemodinâmica, a manobra de recrutamento era imediatamente suspensa. No máximo quatro manobras de recrutamento pulmonar foram realizadas em um intervalo de 24 horas.

3.6.2.3. Ajuste da PEEP e da FiO_2

Caso os parâmetros de oxigenação PaO_2 e/ou SpO_2 não estivessem na faixa alvo após os dois procedimentos descritos anteriormente, ajustava-se a FiO_2 ou a PEEP de acordo com a escala apresentada na Tabela 1.

Quando a PaO_2 estava acima de 150 mm Hg, a FiO_2 ou a PEEP eram reduzidas em 10% ou 2,0 cm H_2O , respectivamente, a começar pela FiO_2 . Quando a PaO_2 estava abaixo de 100 mm Hg ou a $SpO_2 \leq 90\%$, a FiO_2 ou PEEP eram aumentadas em 10% ou 2,0 cm H_2O , respectivamente, sendo que a PEEP era aumentada primeiramente. Quando a FiO_2 estava em 100%, a PEEP era aumentada em 2 cm H_2O até o máximo de 24 cm H_2O . Nesta circunstância, a pressão de platô poderia exceder 30 cm H_2O .

3.6.3. Administração de antibióticos

O antibiótico piperacilina-tazobactam (Tazobac®), na dose de 2,25 gramas, foi administrado a cada 8 horas em todos os grupos estudados, por via endovenosa, durante todo período de ressuscitação. A primeira dose do antibiótico foi administrada imediatamente ao término do período de observação (Figura 7).

3.6.4. Profilaxia de trombose venosa profunda

A profilaxia de trombose venosa profunda foi realizada através da administração de heparina não fracionada (Liquemine®), na dose de 10.000 UI, por via endovenosa, em infusão contínua, a cada 24 horas, em todos os grupos estudados. Esta profilaxia foi administrada durante todo período de ressuscitação com início imediatamente ao término do período de observação (Figura 7).

3.6.5. Controle glicêmico

O objetivo do protocolo de controle glicêmico foi manter a glicemia arterial entre 3,5 e 8,3 mmol/l (63 a 150 mg/dl) durante todo experimento (Figura 11). O glicosímetro ACCU-CHEK® (*Roche Diagnostics, Mannheim, Germany*) foi utilizado para mensuração da glicemia.

As amostras de sangue para análise da glicemia foram obtidas através do cateter inserido na artéria carótida direita. A glicemia arterial foi medida de hora em hora ou a cada duas horas de acordo com o protocolo descrito a seguir.

Antes de obtenção da amostra de sangue para análise, 10 mL de sangue da linha arterial eram removidos previamente para evitar hemodiluição da amostra a ser estudada. A seguir, retirava-se 0,5 mL de sangue para análise de glicemia. Com o intuito de minimizar o desenvolvimento de anemia nos animais ao longo do estudo, reinfundia-se, no mesmo animal, os 10 mL de sangue removidos no início da coleta.

Manuseio da glicemia $\leq 3,5$ mmol/l (≤ 63 mg/dL): para todos os animais, a solução de glicose 50% foi iniciada na dose de 0,5 mL/kg/h durante o preparo

cirúrgico dos animais. Durante o estudo, se glicemia caísse abaixo de 3,5 mmol/l, a infusão de glicose 50% era aumentada em 5,0 mL/h, de hora em hora, até que a glicemia estivesse entre 3,5 e 8,3 mmol/l. Caso a glicemia estivesse entre 3,5 e 8,3 mmol/l, mantinha-se a mesma velocidade de infusão da glicose 50%. A glicemia era então medida novamente em 1 hora. Após cada ajuste na velocidade de infusão, a glicemia era mensurada após 1 hora. Após duas medidas consecutivas com a glicemia estável na faixa alvo, a glicemia era aferida a cada 2 horas (Figura 11).

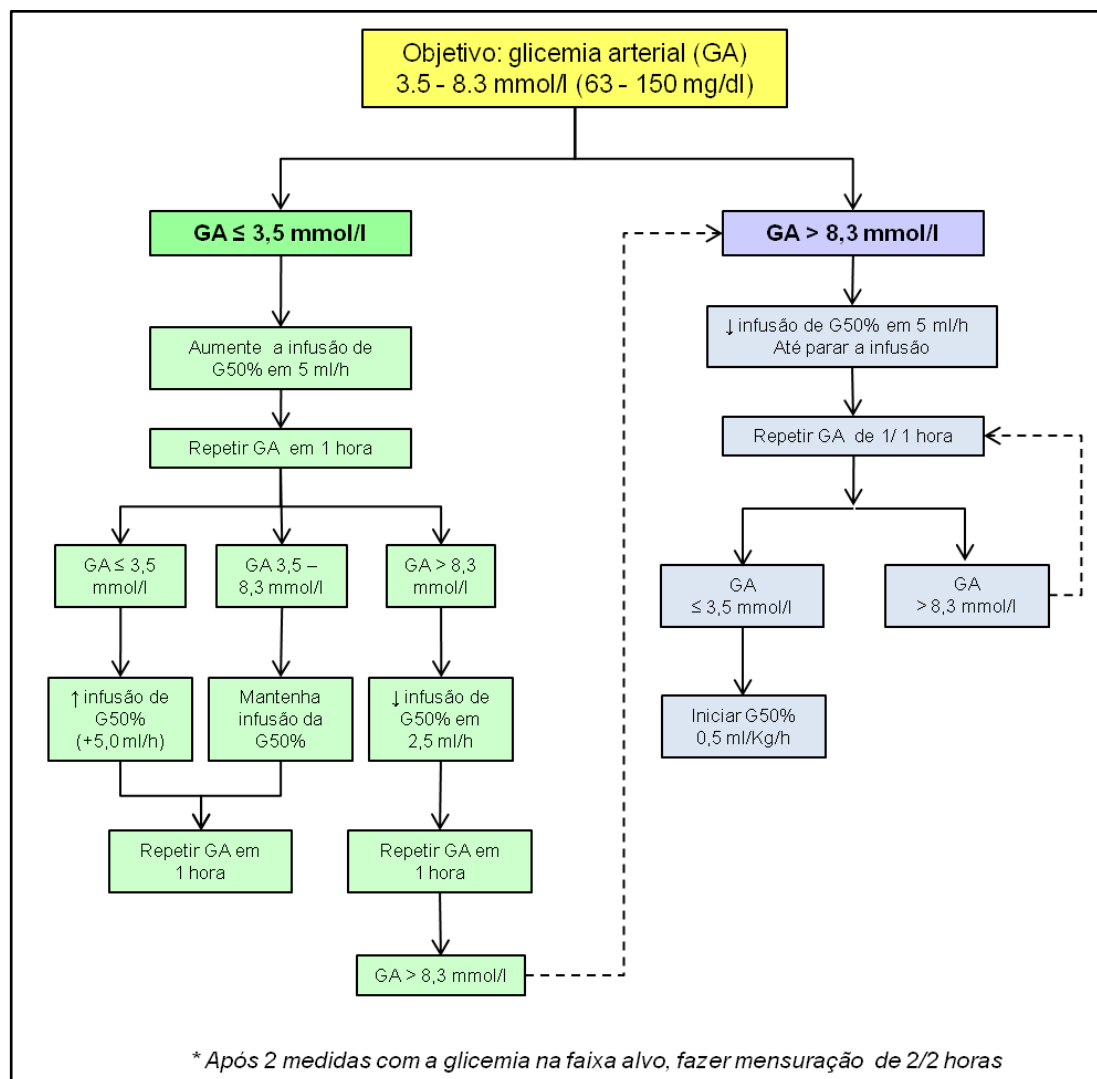


Figura 11. Protocolo para controle glicêmico utilizado durante todo o estudo; GA = glicemia arterial, G50% = solução de glicose 50%, ↓ = reduzir e ↑ = aumentar

Manuseio da glicemia ≥ 8.3 mmol/l (≥ 150 mg/dL): A infusão de glicose 50% era reduzida em 5,0 mL/h, de hora em hora, até que a infusão de glicose fosse interrompida por completo. A glicemia era então medida de 1/1 hora. Quando a glicemia estivesse ≤ 3.5 mmol/l, reiniciava-se a infusão de glicose na dose de 0.5 mL/kg/h. Se a glicemia estivesse entre 3,5 e 8,3 mmol/l, mantinha-se a mesma velocidade de infusão, com mensuração da glicemia em 1 hora (Figura 11).

3.6.6. Controle do potássio sérico

O objetivo deste protocolo foi manter o potássio sérico entre 3,5 e 5,5 mmol/l durante todo o experimento (Figura 12). Se o potássio estivesse entre 2,5 e 3,5 mmol/l, 20 mmol de cloreto de potássio (KCl) eram adicionados na solução de Ringer Lactato de manutenção (20 mmol KCl em 1,0 litro de Ringer Lactato) e mantinha-se a mesma velocidade de infusão atual do Ringer Lactato. Se o potássio estivesse $\leq 2,5$ mmol/l, era realizada uma reposição endovenosa de KCl [Concentração da reposição: 20 mmol de KCl (10mL) em 100 mL de salina 0,9%] em bomba de infusão contínua, durante 60 minutos. O potássio sérico era então mensurado novamente ao término da reposição.

O tratamento da hiperpotassemia (potássio $> 5,5$ mmol/L) foi realizado conforme descrito a seguir: administração de 10 UI de insulina regular diluídas em 100 mL de glicose 50%, com administração endovenosa, em 30 minutos. Esta dose poderia ser repetida caso o potássio sérico permanecesse superior a 5,5 mmol/l. Na presença de alterações eletrocardiográficas, era iniciado tratamento imediato com administração de 20 mL de gluconato de cálcio 10%. Esta dose poderia ser repetida caso as alterações no eletrocardiograma persistissem. O potássio sérico era então mensurado em 1 hora.

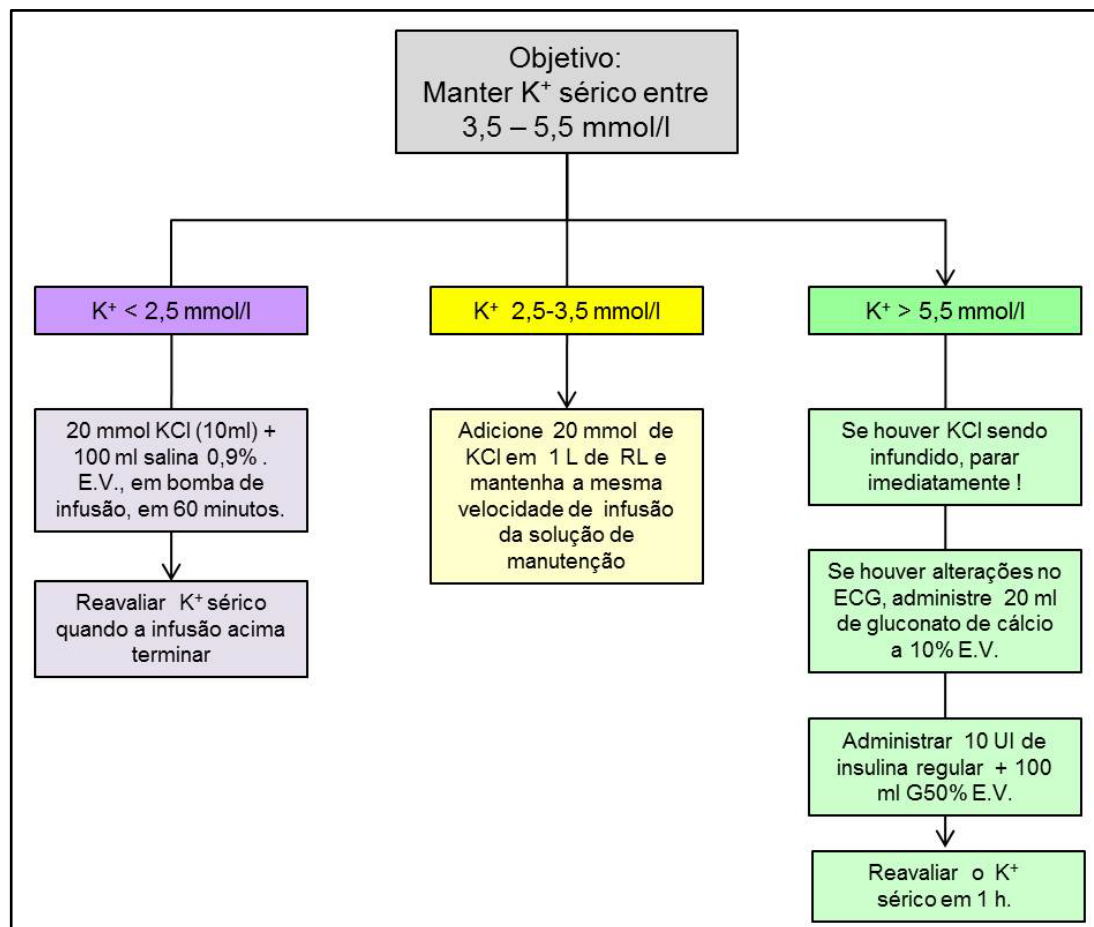


Figura 12. Protocolo para controle do potássio sérico utilizado durante a fase de ressuscitação protocolada; K^+ = potássio sérico, KCl = cloreto de potássio, RL = Ringer Lactato, ECG = eletrocardiograma, G50% = solução de glicose 50%, E.V. = endovenoso

3.7. EXAMES LABORATORIAIS

3.7.1. Padronização para coleta de amostras de sangue

Antes da obtenção de qualquer amostra de sangue para análise laboratorial, removia-se 10 mL de sangue pela linha arterial ou venosa (a depender do exame) para que não ocorresse hemodiluição das amostras a serem estudadas. A seguir, com uma nova seringa, retirava-se nova amostra de sangue para a análise laboratorial propriamente dita. Para que o desenvolvimento de anemia durante o estudo fosse minimizado, injetava-se

novamente no mesmo animal os 10 mL de sangue que haviam sido removidos previamente.

3.7.2. Exames laboratoriais realizados

Amostras contendo 1,0 mL de sangue arterial foram obtidas através do cateter na inserido na artéria carótida comum direita ao término do período de estabilização (*Baseline*) e, posteriormente, a cada 6 horas. Estas amostras foram imediatamente analisadas em um gasômetro (*GEM Premier 3000 analyzer; Bedford, MA, USA*) para obtenção do pH, PaO₂, PaCO₂ (ajustado para temperatura corpórea central), lactato (mmol/L), base excess, sódio e potássio. A saturação arterial de oxigênio e a mensuração da hemoglobina arterial foram avaliadas ao término do período de estabilização (*Baseline*) e, posteriormente, a cada 6 horas utilizando um gasômetro especializado para análise de sangue porcino (*OSM 3; Radiometer, Copenhagen, Denmark, porcine mode*).

Amostras contendo 0,5 mL sangue foram obtidas da artéria pulmonar (cateter de artéria pulmonar com extremidade distal na artéria pulmonar), da veia cava superior (cateter de artéria pulmonar com extremidade distal na veia cava superior) e da veia cava inferior (cateter de artéria pulmonar com extremidade distal na veia cava inferior) ao término do período de estabilização (*Baseline*) e, posteriormente, a cada 12 horas para mensuração da saturação de oxigênio e hemoglobina (*OSM 3; Radiometer, Copenhagen, Denmark, porcine mode*).

Amostras contendo 4,0 mL sangue foram obtidas através do cateter na inserido na artéria carótida comum direita ao término do período de estabilização (*Baseline*) e, posteriormente, a cada 24 horas para contagem de plaquetas e leucócitos (*ADVIA® 120 analyzer; Siemens, Zürich, Switzerland*).

Amostras contendo 4,0 mL de sangue foram obtidas através do cateter na inserido na artéria carótida comum direita ao término do período de estabilização (*Baseline*), ao término do período de observação, após 24 horas de ressuscitação e ao término do experimento (após 48 horas de ressuscitação ou, nos animais que não sobreviveram até o final do estudo, imediatamente antes

de morrer) para mensuração da creatinina sérica (*ADVIA® 120 analyzer; Siemens, Zürich, Switzerland*).

Amostras contendo 4,0 mL de sangue foram obtidas através do cateter na inserido na artéria carótida comum direita ao término do período de estabilização (*Baseline*), ao término do período de observação, após 24 horas de ressuscitação e ao término do experimento (após 48 horas de ressuscitação ou, nos animais que não sobreviveram até o final do estudo, imediatamente antes de morrer) para análise dos níveis plasmáticos de interleucina-6 (IL-6) (*Porcine immunoassay kit - R&D Systems Europe Ltd; Abingdon, Oxon, UK*), fator de necrose tumoral - alfa (TNF- α) (*Porcine immunoassay kit - R&D Systems Europe Ltd; Abingdon, Oxon, UK*) e proteína C reativa (PCR) (*Porcine ELISA Test Kit - Life Diagnostics; West Chester, PA, USA*).

3.8. ESTUDO DA RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL

O estudo da função mitocondrial foi realizado em músculo estriado esquelético (músculo quadríceps direito) no início da cirurgia (*Baseline*), ao término do período de observação (EOP) e após 48 horas após o início da ressuscitação (ou imediatamente antes da morte, caso esta ocorresse precocemente) (Figura 7).

No final do experimento, foram realizadas biópsias adicionais do cérebro, do coração (ventrículo esquerdo) e fígado (lobo esquerdo) para realização de análise da função mitocondrial (Figura 7).

3.8.1. Isolamento das mitocôndrias do músculo esquelético

O isolamento das mitocôndrias no músculo esquelético foi realizado de acordo com a técnica descrita por Hoppel et al.³⁴. Após dissecação e obtenção cuidadosa do tecido muscular, as amostras de músculo esquelético foram imediatamente imersas em solução tampão para isolamento gelada (KCl 100 mmol/L, MgSO₄ 10 mmol/L, ácido morfolinopropanosulfônico 50 mmol/L, ácido

etilenodinitrilotetraacético (EDTA) 1,0 mmol/L, ATP 1,1 mmol/L, pH 7,4) e pesadas (Figura 13).

Após múltiplas lavagens com a solução tampão para isolamento, a amostra de músculo esquelético foi cortada em pequenos fragmentos com auxílio de uma tesoura e suspensa em 10 volumes (10 mL por grama de massa seca) do mesmo meio e tratada com uma protease 5,0 mg/g de tecido (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA*) durante 10 minutos a 4°C sob agitação constante. A suspensão resultante foi então diluída com igual volume, suplementada com albumina de soro bovino 0,2% (BSA) e homogeneizada com o auxílio de um homogeneizador acoplado a um pistão de Teflon inserido em um Potter de vidro (*Potter-Elvehjem*).

O sobrenadante foi separado por centrifugação (10000g por 10 minutos) e o sedimento resultante (*pellet*) foi novamente suspenso em solução tampão de isolamento suplementado com albumina (10 mL/grama de tecido). A suspensão foi centrifugada novamente durante 10 minutos a 350g e o sobrenadante filtrado através de duas camadas de gaze e centrifugado novamente a 7700g durante 10 minutos. O *pellet* resultante, composto por mitocôndrias sedimentadas, foi submetido a duas lavagens adicionais de solução tampão para isolamento suplementado com BSA (5,0 mL/grama de tecido) e com 2,5 mL (tampão / grama de tecido) de KCl 100 mmol/L, ácido morfolinopropanosulfônico 50 mmol/L, EGTA 0,5 mmol/L, pH 7,4. Finalmente, as mitocôndrias foram suspensas em aproximadamente 1,0 mL da mesma solução (KCl 100 mmol/L, ácido morfolinopropanosulfônico 50 mmol/L, EGTA 0,5 mmol/L e pH 7,4).

3.8.2. Isolamento das mitocôndrias no fígado

O isolamento das mitocôndrias do fígado foi realizado imediatamente após a coleta do tecido utilizando o procedimento padrão com base na centrifugação diferencial a 4°C³⁵. As amostras de fígado contendo entre 14 e 15 g obtidas no final do experimento foram rapidamente imersas em solução tampão gelada para isolamento do fígado (manitol 220 mmol/L, sacarose 70

mmol/L, ácido morfolinopropanosulfônico 5 mmol/L, pH 7,4), fragmentas com auxílio de uma tesoura e homogeneizadas com um adicional de 10 mL/g de meio de homogeneização (tampão de isolamento de fígado e EDTA 2 mmol/L) com o auxílio de um homogeneizador acoplado a um pistão de Teflon inserido em um poter de vidro (*Potter-Elvehjem*).

O homogeneizado foi então centrifugado por 10 minutos a 700g. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado novamente durante 10 minutos a 7000g. O sobrenadante foi então descartado e o sedimento (*pellet*) suspenso novamente em tampão de isolamento e centrifugado duas vezes, durante 10 minutos a 7000g, para a purificação adicional das mitocôndrias. Os sedimentos foram então suspensos em solução tampão com concentração final de 50 a 100 mg de proteína mitocondrial por mililitro.

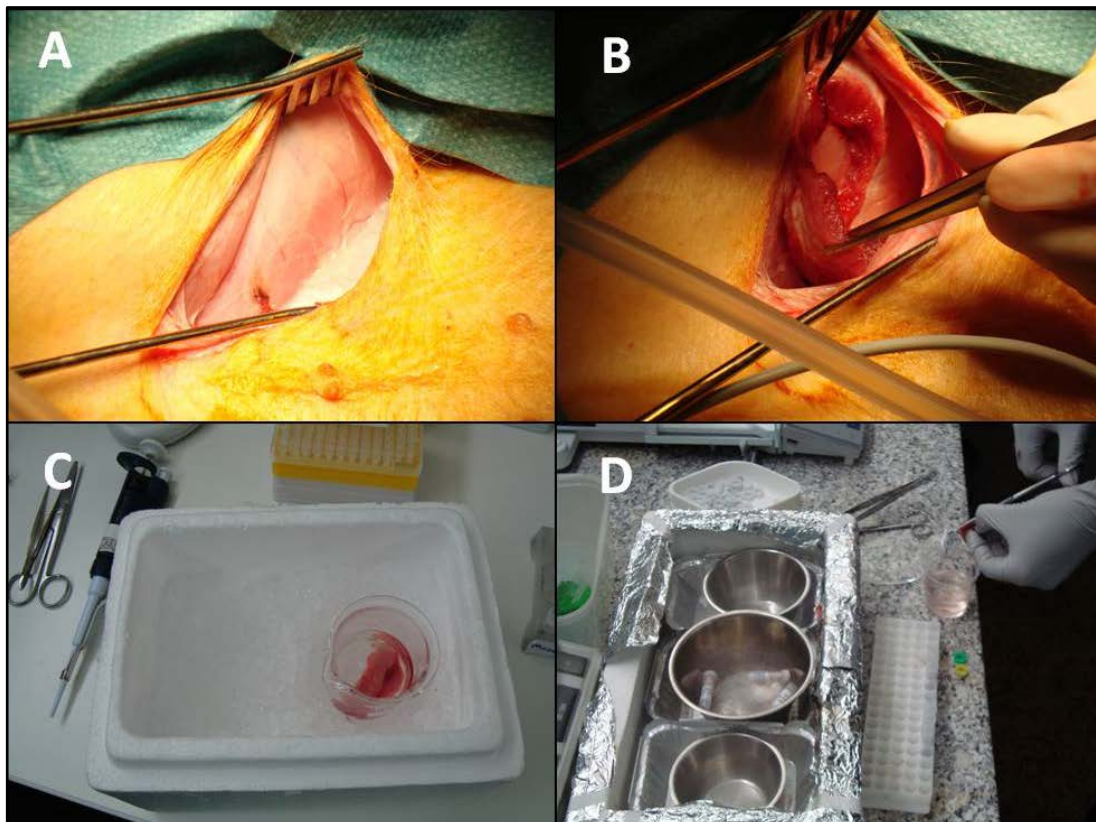


Figura 13. Preparo das amostras de tecido muscular para análise da função mitocondrial ao término do período de observação; A = exposição do músculo quadríceps direito, B = dissecção do músculo quadríceps direito, C = amostra de músculo esquelético em imerso na solução tampão de isolamento e D = preparo do tecido muscular para análise da função mitocondrial

3.8.3. Isolamento das mitocôndrias do coração

As mitocôndrias foram isoladas a partir do miocárdio do ventrículo esquerdo utilizando-se o procedimento de digestão com tripsina^{36,37}. A amostra contendo de 4,0 a 5,0 de tecido (ventrículo esquerdo) foi triturada, lavada e suspensa em 30 mL de meio de isolamento (sacarose 0,3 mmol/L, HEPES sal sódico 10 mM, EDTA 0,2 mM, pH 7,2). A seguir, o tecido foi submetido à digestão leve com tripsina (1,25 mg) durante 15 minutos a 4°C e, posteriormente, diluído com 10 mL de meio de isolamento (pH 7,4) contendo 1 mg/mL de BSA e 6,5 mg de inibidor de tripsina. A suspensão foi agitada e o sobrenadante descartado. O tecido parcialmente digerido foi novamente suspenso em 10 mL de meio de isolamento contendo 1,0 mg/mL de BSA e brevemente homogeneizado com um homogeneizador de teflon-vidro. O homogenato foi centrifugado durante 10 minutos a 600g (4°C). O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 15 minutos a 8000g (4°C). O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* suspenso novamente por duas vezes em 10 mL de meio de isolamento contendo 1,0 mg/mL de BAS e centrifugado, a cada vez, durante 15 minutos a 8000g (4°C). O sedimento final lavado foi suspenso em 1,0 mL de meio de isolamento, sem albumina.

3.8.4. Isolamento das mitocôndrias do cérebro

Mitocôndrias do cérebro foram isoladas como descrito por Vilela et al.³⁸ com pequenas modificações. Amostras contendo de 3 a 5 gramas de tecido do córtex cerebral (lobos frontal e parietal) foram removidas, cortadas em pequenos fragmentos com auxílio de uma tesoura, lavadas e suspensas em 20 mL de meio de isolamento (manitol 225 mM, sacarose 75 mmol/L, HEPES 5 mM, EGTA 1 mM, pH 7,4). O tecido foi submetido a uma protease bacteriana (5,0 mg) e, em seguida, diluído com 30 mL de meio de isolamento contendo 1 mg/mL de BSA e homogeneizado brevemente com um homogeneizador de teflon-vidro. O homogenato foi centrifugado durante 5 minutos a 2000g (4°C). O sobrenadante foi passado através de uma gaze e centrifugado a 12000g durante 10 minutos. O

sobrenadante foi então descartado e o sedimento suspenso em conjunto com a camada sinaptosômica em 10 mL de solução de isolamento contendo BSA e digitonina a 0,02%, centrifugados a 12000g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento mitocondrial com coloração marrom foi suspenso novamente em 10 mL de meio de isolamento contendo 1,0 mg/mL de BAS e foi centrifugado durante 10 minutos a 12000g (4°C). O sedimento final lavado e suspenso em 1,0 mL de meio de isolamento, sem albumina.

3.8.5. Preparo das fibras permeabilizadas

Amostras de músculo esquelético (músculo quadríceps direito) e cardíaco (ventrículo esquerdo) foram obtidas por dissecação do tecido muscular em solução de repouso (em mM: 2,77 CaK₂EGTA, 7,23 K₂EGTA [concentração de Ca²⁺ livre 0,1 µM], 20 imidazol, 20 taurina, 6,56 MgCl₂, 5,77 ATP, 15 fosfocreatina, 0,5 ditiotreitol e 50 K-MES, pH 7,1) em gelo e permeabilizadas, por agitação suave durante 30 minutos, na solução relaxante suplementada com 50 µg/mL de saponina³⁹.

As fibras foram lavadas com meio gelado de respiração (sacarose 110 mM, K-lactobionato 60 mM, EGTA 0,5 mM, 1,0 g/L de albumina de soro bovino isento de ácidos graxos essenciais, MgCl₂ 3 mM, taurina 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20 mM, pH 7,1)⁴⁰, sob agitação, durante 20 minutos e mantidas neste meio até a realização da análise respirométrica.

3.8.6. Respirometria de alta resolução

A função mitocondrial foi quantificada a partir da mensuração do consumo de oxigênio, expresso em pmol O₂/segundo/mg de proteína mitocondrial, em uma câmara de vidro selada, com temperatura interna de 37°C e com concentração de 0,4 mg de proteína mitocondrial por mL de solução tampão^{23,35}. O consumo total de oxigênio foi medido utilizando-se a técnica de respirometria de alta resolução (*Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria*) (Figura 14). Este método permite a mensuração da capacidade máxima

da respiração oxidativa após a adição de concentrações saturantes de ADP (estado 3, respiração ativa) e a respiração de repouso após a depleção do ADP (estado 4) (Figura 15).

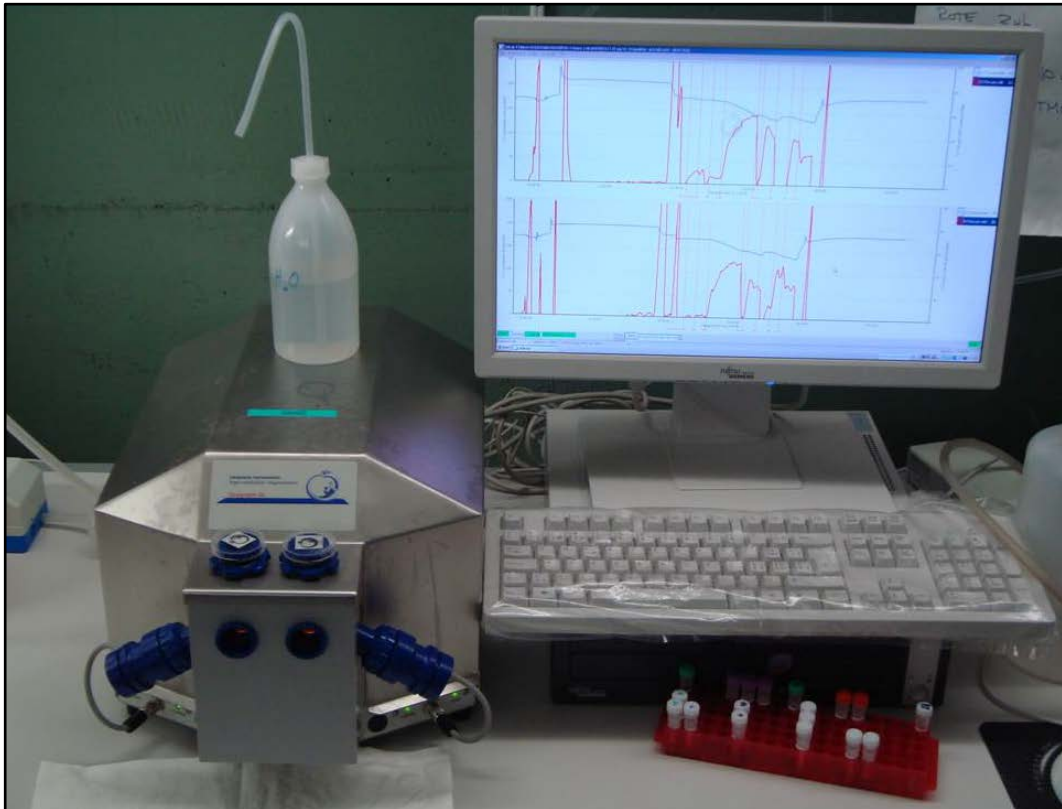


Figura 14. Análise da respiração mitocondrial realizada com respirometria de alta resolução (*Oxygraph-2k*, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria)

A razão de controle respiratório (RCR) é calculada dividindo-se a taxa de respiração do estado 3 pela taxa de respiração do estado 4 ($RCR = \text{estado 3} / \text{estado 4}$). Uma vez que o estado 3 representa a capacidade respiratória máxima e o estado 4 a utilização de oxigênio não atrelada a produção de ATP, o RCR é um índice que representa a integridade dos complexos mitocondriais, da membrana mitocondrial interna e o acoplamento entre respiração e fosforilação oxidativa (Figura 16).

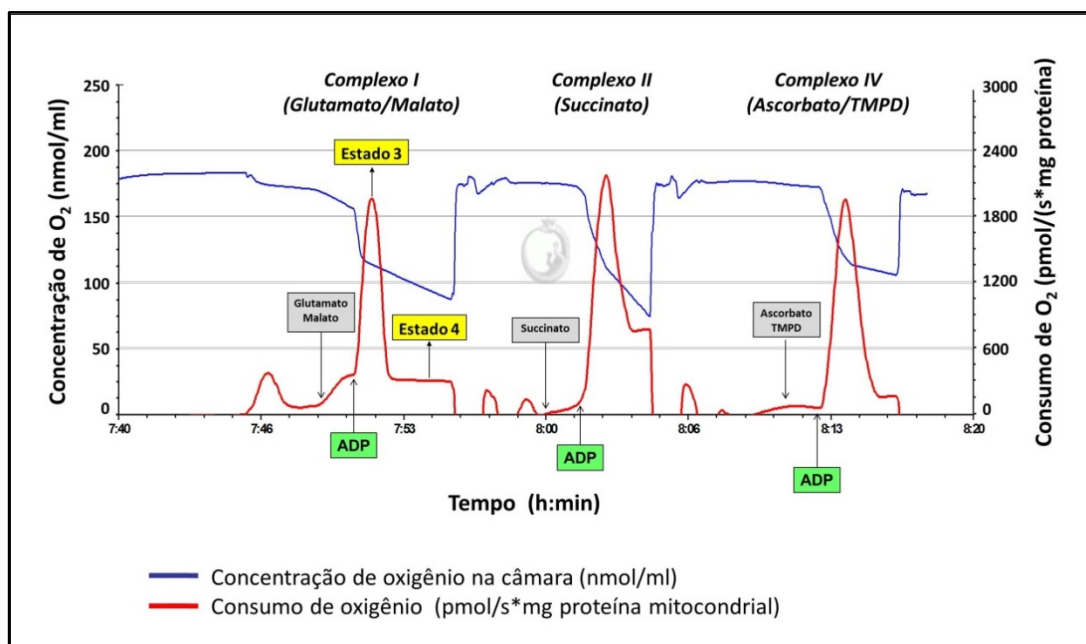


Figura 15. Diagrama representativo da respirometria de alta resolução em mitocôndrias isoladas do fígado; A função mitocondrial foi quantificada a partir da mensuração do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias, expresso em pmol O₂/segundo/mg de proteína mitocondrial (linha vermelha). A concentração do oxigênio dentro da câmara de vidro selada diminui à medida que o oxigênio disponível é consumido pelas mitocôndrias (linha azul)

Para avaliação da respiração mitocondrial dependente do Complexo I utilizamos os substratos glutamato (10 mmol/l) e malato (5 mmol/l), que fornecem nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) para ativação do Complexo I da cadeia respiratória (Figura 15 e Figura 16).

Para mensuração da respiração dependente do Complexo II, inibiu-se inicialmente o Complexo I com rotenona (0,5 mmol/l) e adicionou-se succinato (10 mmol/l), que fornece flavina adenina dinucleotídeo (FADH) para ativação do Complexo II da cadeia respiratória (Figura 15 e Figura 16).

A respiração mitocondrial dependente do Complexo IV foi realizada a partir da adição do ascorbato (4,0 mM) e TMPD (0,5 mM) (Figura 15 e Figura 16)^{23,35}. Na tabela 2 apresentamos os complexos da cadeia respiratória e os estados os avaliados neste estudo.

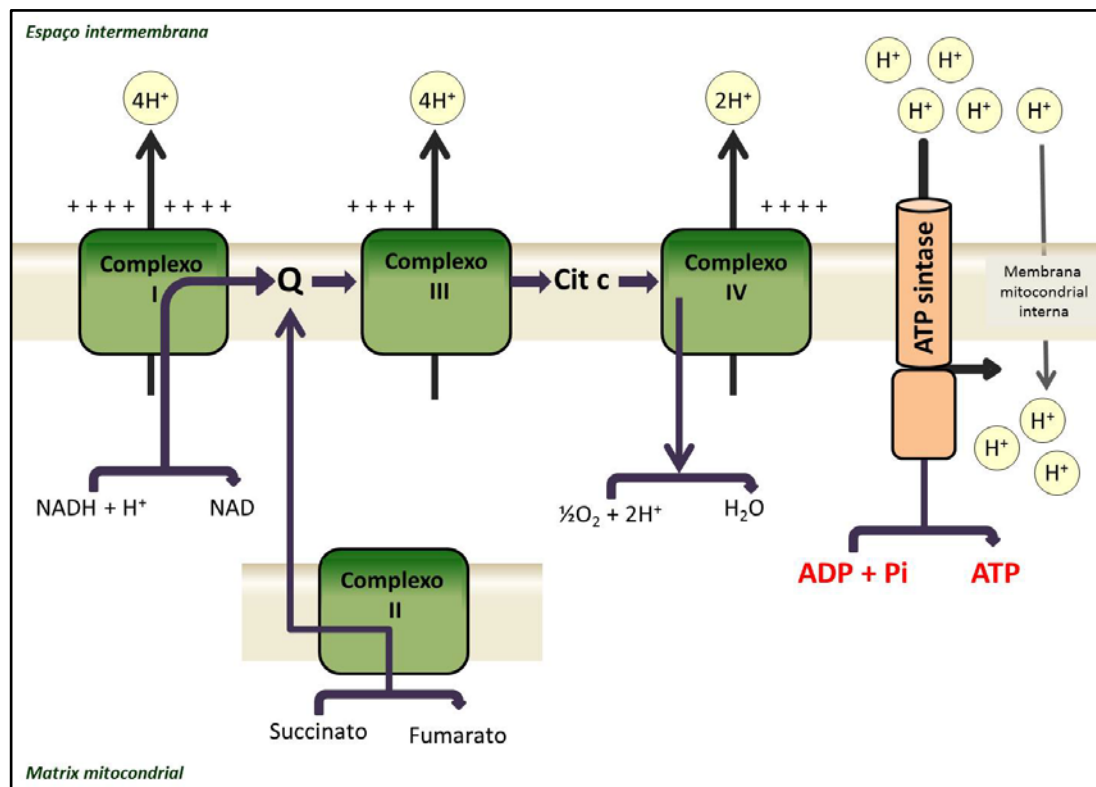


Figura 16. Fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória localizados na membrana mitocondrial interna; Q = coenzima Q ou ubiquinona, Cit C = citocromo C, NAD = nicotinamida adenina dinucleotídeo, FAD = flavina adenina dinucleotídeo, ADP = trifosfato de adenosina, ADP = bifosfato de adenosina, Pi = fosfato inorgânico, ATP sintase = enzima ATP sintase que sintetiza ATP a partir de ADP e Pi

3.9. DETERMINAÇÃO DO ATP NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

O conteúdo de ATP do músculo esquelético foi quantificado no *Baseline*, no final do período de observação (EOP) e no final do experimento (48 horas após o início da ressuscitação ou imediatamente antes da morte, nos animais que morreram antes da conclusão do estudo) (Figura 7). Para tanto, utilizou-se o kit de determinação ATP baseado no sistema luciferina-luciferase (*Molecular Probes; Eugene, OR, EUA*), seguindo-se as instruções fornecidas pelo fabricante.

3.10. CRITÉRIOS E MÉTODO PARA INTERRUPTÃO DO ESTUDO

Dois critérios foram utilizados para interrupção ou término do estudo:

- 1) Após completar 48 horas de ressuscitação protocolada;
- 2) Na presença de um animal gravemente doente, com incapacidade de sustentar a pressão arterial média acima de 30 mm Hg , em vigência da administração da dose máxima de noradrenalina permitida no estudo (1000 mcg/h). Nestas circunstâncias, com o animal ainda vivo, realizavam-se as coletas das amostras finais de sangue e tecidos para execução das análises descritas anteriormente.

Após a realização das medidas hemodinâmicas, respiratórias, coleta das amostras de sangue e tecidos (músculo quadríceps direito, cérebro, lobo esquerdo do fígado e coração), os animais foram eutanaziados, sob anestesia geral profunda, através da administração endovenosa de 40 mL de cloreto de potássio a 19,1%.

Tabela 2 - Complexos da cadeia respiratória e estados da função mitocondrial avaliados

Órgãos / Tecidos	Complexo I	Complexo II	Complexo IV
Cérebro	Estado 3	Estado 3	Estado 3
	Estado 4	Estado 4	
	RCR	RCR	
Fígado	Estado 3	Estado 3	Estado 3
	Estado 4	Estado 4	
	RCR	RCR	
Coração	Estado 3	Estado 3	Estado 3
	Mitocôndrias isoladas	Estado 4	
	RCR	RCR	
Fibras permeabilizadas	Estado 3	Estado 3	Estado 3
Músculo esquelético	Estado 3	Estado 3	Estado 3
	Mitocôndrias isoladas	Estado 4	
	RCR	RCR	
Fibras permeabilizadas	Estado 3	Estado 3	Estado 3

Estado 3 = capacidade máxima de respiração oxidativa após a adição de concentrações saturantes de ADP, Estado 4 = respiração de repouso após a depleção do ADP, RCR = razão de controle respiratório (estado 3 / estado 4)

3.11. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA

A determinação do tamanho da amostra foi baseada na hipótese principal de que a necessidade de fluidos, vasopressores e inotrópicos necessários para estabilização hemodinâmica dos animais é diretamente proporcional ao tempo decorrido entre a indução da peritonite fecal e o início das manobras de ressuscitação.

Estudos realizados previamente no Laboratório de Cirurgia Experimental do departamento de Medicina Intensiva do Hospital Universitário de Berna onde este projeto foi realizado⁴¹⁻⁴³ e em outros centros de pesquisa⁴⁴ foram capazes de demonstrar diferenças significativas entre grupos de animais em relação à mortalidade, resposta inflamatória, parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais, quantidade de fluídos administrados, balanço hídrico e função mitocondrial utilizando apenas oito animais por grupo de experimentação. Baseando-se no princípio dos três “R”⁴⁵ e nos resultados obtidos e apresentados anteriormente, optamos por realizar o presente estudo com o número oito de animais por grupo, totalizando 32 animais.

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Variáveis categóricas foram apresentadas de forma descritiva como frequências absoluta e relativa. Variáveis numéricas contínuas foram apresentadas como média e desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil (IIQ) em caso de distribuição anormal. Foi utilizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para avaliar o padrão de distribuição das variáveis numéricas contínuas. Comparações de proporções foram efetuadas utilizando-se o Teste Exato de Fisher. A análise de sobrevivência entre os grupos foi realizada com o teste *Log-Rank*. Comparações entre as médias dos quatro grupos foram realizadas com o teste análise de variância com um fator (*one-way ANOVA*) seguido pelo teste *Tukey* ou pelo teste-t independente. Em caso de variáveis com distribuição anormal, os testes de *Kruskal-Wallis* ou de *Mann-Whitney* foram aplicados.

O impacto do tempo, dos grupos e da interação entre tempo-grupo foi avaliado com teste ANOVA para medidas repetidas (*ANOVA for repeated measurements*) com os fatores grupo (*between-subject factor*) e tempo (*within-subject factor*). Quando detectada interação entre tempo-grupo, testes de análise de variância com um fator (*one-way ANOVA*) no final do período observacional (EOP) e ao final do experimento (END) foram realizados. Quando detectado apenas um efeito significativo do tempo, as diferenças foram localizadas através do teste-t pareado ou pelo teste *Wilcoxon signed rank test* em caso de distribuição anormal.

Os valores de p apresentados foram bicaudais. Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa SPSS "*Statistical Package for Social Sciences (SPSS) (SPSS Inc.®; Chicago, IL, USA)*", versão 20,0. Os gráficos foram preparados com o programa SigmaPlot® versão 12,0 (*Systat Software, San Jose, CA*) e com o programa GraphPad Prism versão 6,0 (*GraphPad Software, La Jolla, California, USA*).

4. RESULTADOS

4.1. MORTALIDADE

Todos os animais do grupo controle e do grupo ΔT -6h sobreviveram até o final dos experimentos. Dois animais (25%) do grupo ΔT -12h e três animais (37,5%) do grupo ΔT -24h morreram durante o período de ressuscitação ($p=0,08$). O tempo médio de sobrevivência após o início das manobras de ressuscitação foi, respectivamente, 48,0 ($\pm 0,0$), 42,8 ($\pm 10,1$) e 36,3 ($\pm 16,5$) horas para os grupos ΔT -6h, ΔT -12h e ΔT -24h (Figura 17). O tempo médio de sobrevivência após a indução da peritonite fecal foi, respectivamente, 54,0 ($\pm 0,0$), 54,8 ($\pm 10,1$) e 60,3 ($\pm 16,5$) horas para os grupos ΔT -6h, ΔT -12h e ΔT -24h.

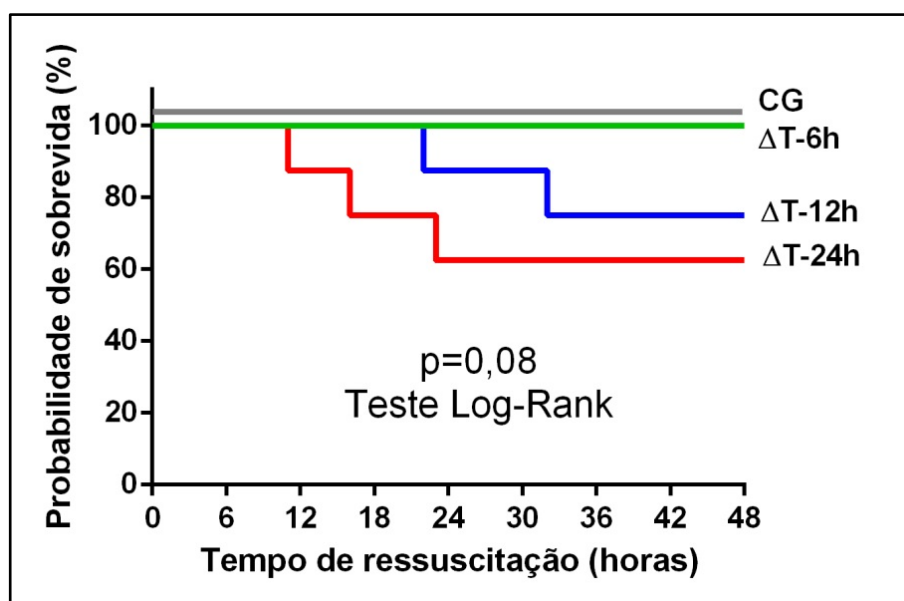


Figura 17. Curva de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevivência dos animais após o início das manobras de ressuscitação

4.2. RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Os níveis plasmáticos de IL-6 aumentaram do baseline (BL) ao fim do período de observação (EOP) nos três grupos de animais sépticos e decresceram durante o período de ressuscitação (Figura 18). Os níveis de TNF-alfa aumentaram ao término do período de observação apenas nos grupos ΔT -12h e ΔT -24h e decresceram durante o período de ressuscitação (Figura 19). Não houve diferenças entre os quatro grupos estudados em relação aos níveis plasmáticos de proteína C reativa (Figura 20).

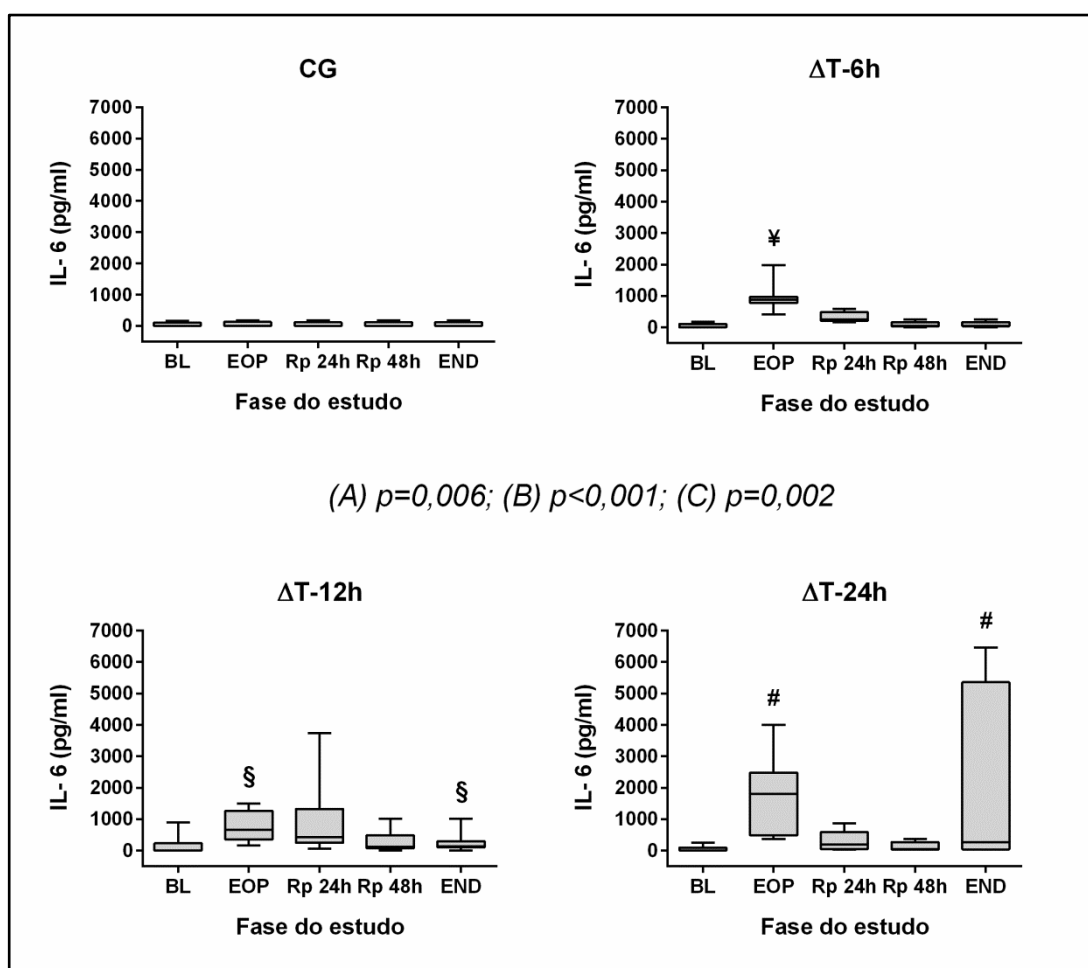


Figura 18. Box plots dos níveis plasmáticos de interleucina-6 (IL-6) durante e ao término do estudo; CG = grupo controle, BL = *baseline*, EOP = fim do período de observação, RP = período de ressuscitação, END = após 48 horas de ressuscitação ou imediatamente antes da morte, caso tenha morrido precocemente. Valores de p: A = interação entre tempo-grupo (ANOVA para medidas repetidas) incluindo os tempos BL, EOP, RP 24hr e RP 48hr, B = análise de variância com um fator no final do período observacional (EOP), C = análise de variância com um fator no ao final do experimento (END). Teste Tukey após ANOVA: comparações com nível de significância inferior a 0,05: ¥ = ΔT -6h vs. CG, § = ΔT -12h vs. CG, # = ΔT -24h vs. CG

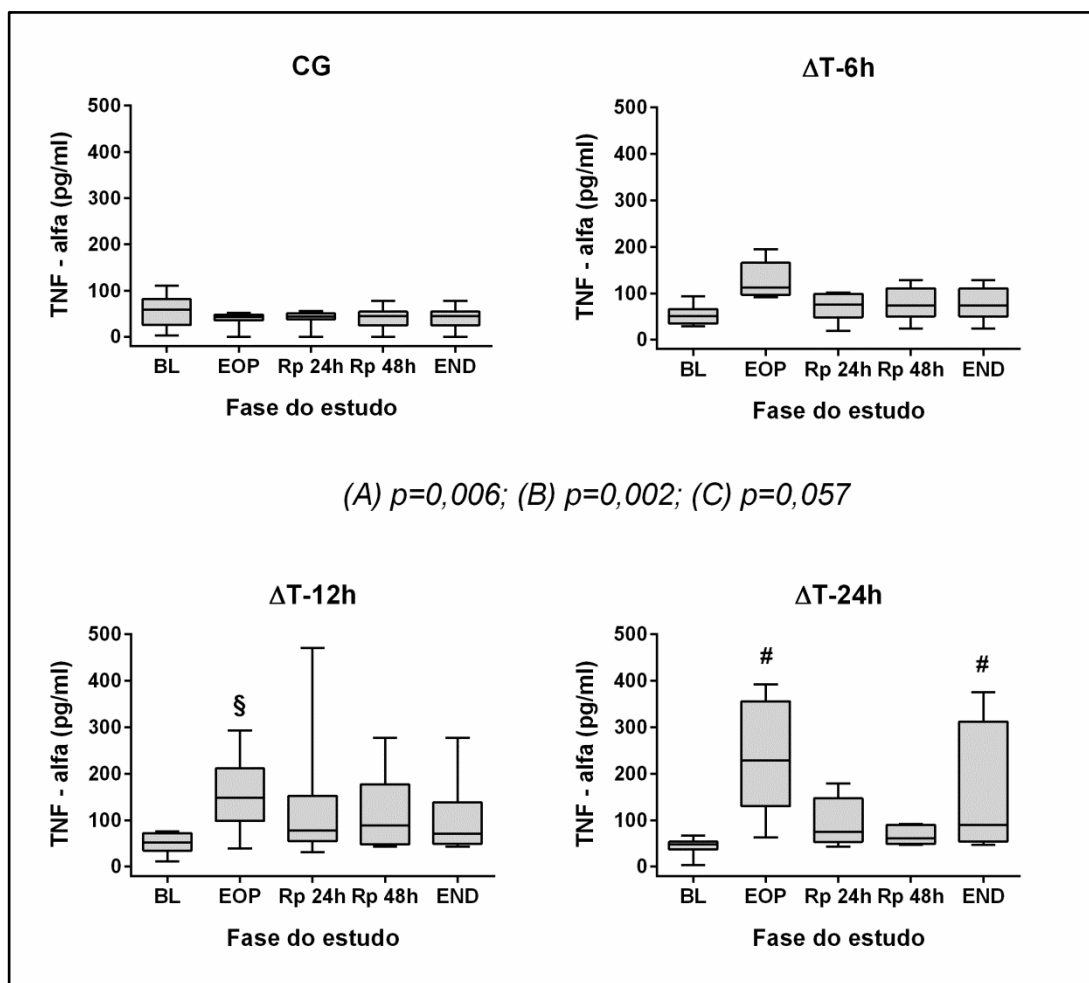


Figura 19. Box plots dos níveis plasmáticos de fator de necrose tumoral - alfa (TNF- α) durante e ao término do estudo; CG = grupo controle, BL = *baseline*, EOP = fim do período de observação, RP = período de ressuscitação, END = após 48 horas de ressuscitação ou imediatamente antes da morte, caso tenha morrido precocemente. Valores de p: A = interação entre tempo-grupo (ANOVA para medidas repetidas) incluindo os tempos BL, EOP, RP 24hr e RP 48hr, B = análise de variância com um fator no final do período observacional (EOP), C = análise de variância com um fator no ao final do experimento (END). Teste Tukey após ANOVA: comparações com nível de significância inferior a 0,05: § = ΔT -12h vs. CG e # = ΔT -24h vs. CG

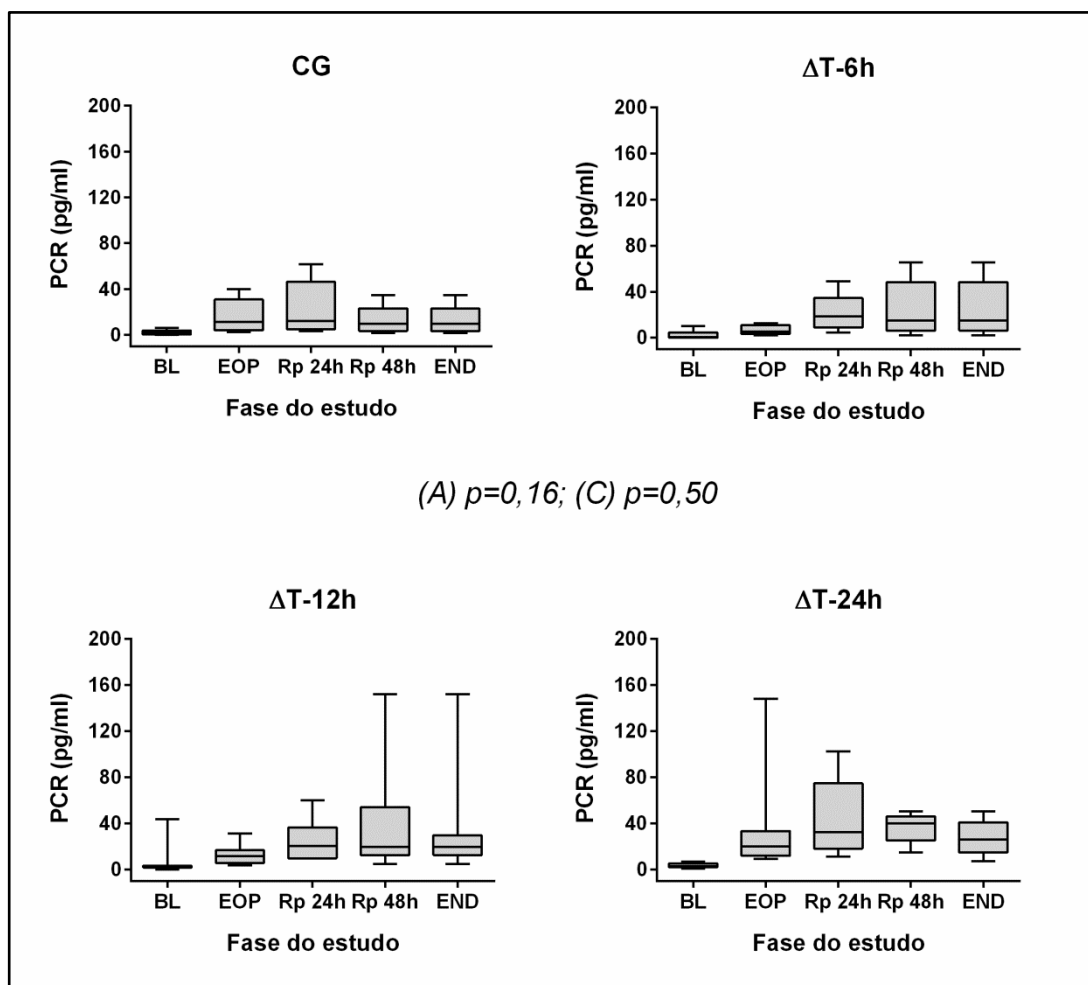


Figura 20. Box plots dos níveis plasmáticos de proteína C reativa (PCR) durante e ao término do estudo; CG = grupo controle, BL = *baseline*, EOP = fim do período de observação, RP = período de ressuscitação, END = após 48 horas de ressuscitação ou imediatamente antes da morte, caso tenha morrido precocemente. Valores de p: A = interação entre tempo-grupo (ANOVA para medidas repetidas) incluindo os tempos BL, EOP, RP 24hr e RP 48hr e C = análise de variância com um fator no ao final do experimento (END)

4.3. INTENSIDADE DO TRATAMENTO

Animais alocados ao grupo ΔT -24h receberam significativamente mais bolus de fluídos para ressuscitação do que os animais no grupo ΔT -6h ($p=0,03$). O balanço hídrico no final do estudo foi maior nos grupos ΔT -12h e ΔT -24h ($P<0,01$) (Tabela 3 e Figura 21). Durante o período de ressuscitação, noradrenalina foi administrada em dois animais (25%) do grupo controle,

quatro (50%) no grupo ΔT -6h, cinco (62,5%) no grupo ΔT -12h e seis animais (75%) no grupo ΔT -24h ($p=0,04$). As doses administradas de noradrenalina e dobutamina estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Tratamentos administrados e balanço hídrico durante o estudo

Variáveis / Grupos	CG	ΔT -6h	ΔT -12h	ΔT -24h	Valor de P
Propofol (mg/kg/h)	6,7 \pm 0,3	6,0 \pm 1,4	6,0 \pm 0,9	5,3 \pm 0,8	0,06 ^a
Midazolam (mg/kg/h)	0,09 \pm 0,04	0,05 \pm 0,03	0,07 \pm 0,03	0,05 \pm 0,01	0,07 ^a
Fentanil (mcg/kg/h) [†]	2,9 \pm 1,0	5,2 \pm 1,6 [¥]	6,0 \pm 1,3 [§]	6,0 \pm 1,8 [#]	<0,01 ^a
RL infusão basal (mL/kg/h)	2,7 \pm 0,2	2,3 \pm 0,3 [¥]	2,3 \pm 0,3 [§]	2,4 \pm 0,2	0,01 ^a
G50% infusão basal (mL/kg/h)	0,3 \pm 0,2	0,7 \pm 0,2 [¥]	0,7 \pm 0,3 [§]	0,6 \pm 0,2 [#]	<0,01 ^a
Bolus de fluido (mL/kg/h) [*]	0,35 \pm 0,49	0,56 \pm 0,38	1,60 \pm 0,93	3,50 \pm 3,61 ^{#&}	0,03 ^a
Bolus de RL	0,17 \pm 0,23	0,30 \pm 0,19	0,90 \pm 0,57	2,43 \pm 3,03 ^{#&}	0,06 ^a
Bolus de HES	0,18 \pm 0,26	0,26 \pm 0,19	0,70 \pm 0,37	1,07 \pm 0,91 ^{#&}	0,02 ^a
Volume total recebido (mL/kg/h)	3,2 \pm 0,4	3,5 \pm 0,2	4,2 \pm 0,7	4,6 \pm 1,4 ^{#&}	0,01 ^a
Débito urinário (mL/kg/h)	1,7 \pm 0,7	1,2 \pm 0,4	1,0 \pm 0,2 [§]	1,1 \pm 0,2 [#]	0,02 ^a
Débito SNG (mL/kg/h) ^{††}	0,4 \pm 0,4	0,2 \pm 0,2	0,4 \pm 0,3	0,3 \pm 0,2	0,31 ^a
Balanço hídrico final (mL/kg/h) [‡]	1,1 \pm 0,9	2,1 \pm 0,5	2,8 \pm 0,7 [§]	3,2 \pm 1,5 [#]	<0,01 ^a
Balanço hídrico final (L) [‡]	3,2 \pm 2,5	4,8 \pm 1,2	6,2 \pm 2,2 [§]	6,7 \pm 1,5 [#]	<0,01 ^a
Noradrenalina					
N/n grupo (%)	2/8 (25,0)	4/8 (50,0)	5/8 (62,5)	6/8 (75,0)	0,301 ^c
Dose média (mcg/kg/min) [*]	0,00 \pm 0,01	0,02 \pm 0,04	0,06 \pm 0,09	0,13 \pm 0,15	0,06 ^b
Dobutamina					
N/n grupo (%)	1/8 (12,5)	0/8 (0)	4/8 (50,0)	3/8 (37,5)	0,120 ^c
Dose média (mcg/kg/min) [*]	0,18 \pm 0,50	0,0 \pm 0,0	0,25 \pm 0,28	0,53 \pm 1,09	0,13 ^b

Valores apresentados como média \pm desvio padrão. [†] = soma da infusão basal com bolus adicionais, ^{*} = administrados durante o período de ressuscitação, RL = Ringer Lactato, HES = hidroxietilamido 6% (130/04), G50% = glicose 50%, SNG = sonda nasogástrica, [‡] = balanço hídrico final = (RL infusão basal + G50% infusão basal + RL bolus + HES bolus) - (débito urinário + débito SNG), ^{††} = dados disponíveis para 28 animais. a = análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*). Teste *Tukey* após ANOVA: comparações com nível de significância inferior a 0,05: [¥] = ΔT -6h vs. CG, [§] = ΔT -12h vs. CG, [#] = ΔT -24h vs. CG, [&] = ΔT -24h vs. ΔT -6h, b = teste *Kruskal-Wallis* e c = teste exato de Fisher

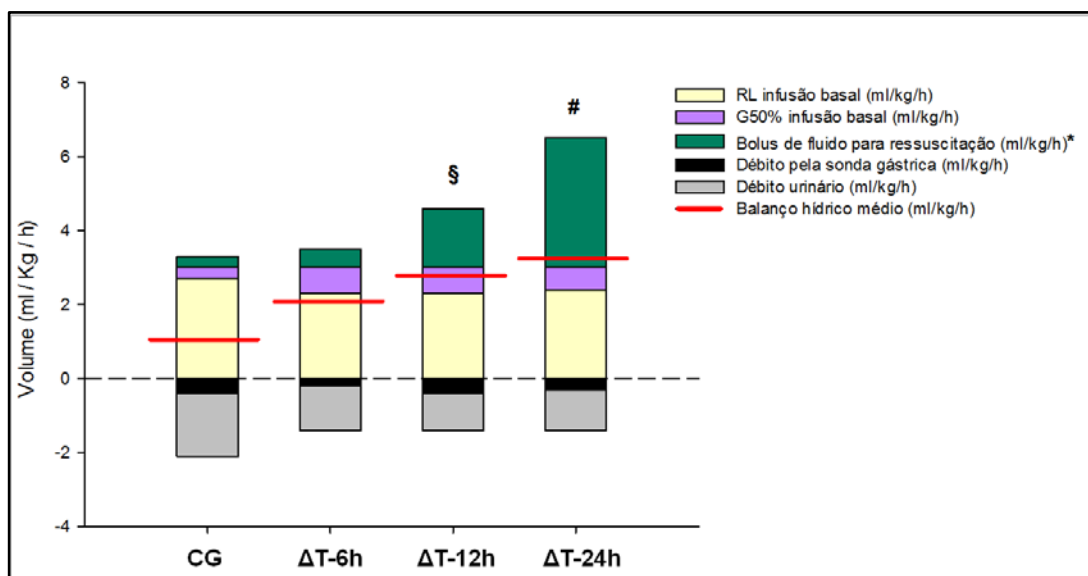


Figura 21. Fluidos administrados, perdas e balanço hídrico no final do estudo; RL = Ringer Lactato, G50% = glicose 50%; * = soma de Ringer Lactato com hidroxietilamido, administrados durante o período de ressuscitação. Balanço hídrico médio: $p < 0,05$ (Teste *Tukey* após ANOVA) § = $\Delta T-12h$ vs. CG, # = $\Delta T-24h$ vs. CG

4.4. PARÂMETROS HEMODINÂMICOS E LACTATO ARTERIAL

Os parâmetros hemodinâmicos frequência cardíaca, pressão arterial média, pressão média na artéria pulmonar, pressão venosa central, pressão de oclusão da artéria pulmonar, índice de resistência vascular sistêmica, índice cardíaco, índice de volume sistólico, saturação venosa mista de oxigênio, saturação venosa central de oxigênio, saturação venosa de oxigênio na veia cava inferior, índice de fluxo sanguíneo carotídeo, índice de fluxo sanguíneo femoral, temperatura central, temperatura periférica e lactato arterial estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Todos os animais sépticos se tornaram hiperdinâmicos durante o período de ressuscitação, com os valores mais elevados de índice cardíaco observados nos grupos $\Delta T-12h$ e $\Delta T-24h$ ($p < 0,001$, para interação tempo-grupo; Tabela 4). Não houve diferenças entre os grupos em relação à pressão arterial média ($p = 0,178$; Tabela 4).

Durante o período de observação, houve redução do lactato arterial no grupo controle enquanto que houve aumento nos animais sépticos ($p=0,002$ para interação tempo-grupo; Tabela 5). Os níveis mais elevados de lactato arterial foram observados no final do período de observação no grupo $\Delta T-24h$ ($p=0,002$; Tabela 5). Durante a fase de ressuscitação, os níveis de lactato arterial decresceram em todos os grupos estudados (Tabela 5).

4.5. PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS, GASOMÉTRICOS E HEMOGLOBINA

Os parâmetros respiratórios e gasométricos estão apresentados, respectivamente, nas tabelas 6 e 7. Os animais alocados para os grupos $\Delta T-12h$ e $\Delta T-24h$ apresentaram aumento do volume minuto durante o período de sepse sem tratamento, com os valores mais elevados ao término do período observacional no grupo $\Delta T-12h$ ($p=0,015$; Tabela 6). Todos os grupos sépticos apresentaram volume minuto superior ao grupo controle ao término do estudo, com os valores mais elevados nos grupos $\Delta T-12h$ e $\Delta T-24h$ ($p<0,001$, para interação tempo-grupo) (Tabela 6).

Durante todo o estudo ocorreu redução progressiva na relação entre pressão parcial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio (PaO_2/FiO_2) e aumento progressivo da PEEP sem que houvesse diferença estatística significativa entre os grupos sépticos e não sépticos avaliados (Tabela 6). Não houve diferenças significativas entre os quatro grupos em relação ao volume corrente, fração inspirada de oxigênio, pressão de platô, pressão parcial de CO_2 ao final da expiração e saturação periférica de oxigênio (Tabela 6).

Os quatro grupos estudados apresentaram alcalose metabólica no início do estudo (*baseline*; Tabela 7). Os diferentes períodos de sepse sem tratamento resultaram em acidose metabólica ($p<0,001$ para interação tempo-grupo) com consumo discreto de bicarbonato ($p=0,002$ para interação tempo-grupo) e redução mais intensa do excesso de bases ($p<0,001$ para interação tempo-grupo) no grupo $\Delta T-24h$ (Tabela 7). A $PaCO_2$ aumentou do *baseline* ao fim do estudo nos três grupos de animais sépticos enquanto que houve redução dos seus níveis nos animais do grupo controle ($p=0,006$ para interação tempo-

grupo). Os maiores níveis de PaCO₂ foram observados ao término do estudo no grupo ΔT-12h (p=0,032) (Tabela 7).

O aumento do tempo entre a indução da peritonite fecal e o início das manobras de ressuscitação resultou em hemoconcentração progressiva em todos os grupos de animais sépticos, com os maiores valores de hemoglobina no final do período de observação nos animais randomizados aos grupos ΔT-12h e ΔT-24h (p<0,001 para interação tempo-grupo) (Tabela 7). Ao término do estudo, animais randomizados para o grupo controle apresentaram os níveis mais baixos de hemoglobina (p<0,001) (Tabela 7).

4.6. PARÂMETROS RENAIIS E BIOQUÍMICOS

O débito urinário durante o estudo foi menor nos grupos ΔT-12h e ΔT-24h em relação ao grupo controle (p=0,02; Tabela 3 e Figura 21). As diferenças observadas entre os grupos em relação à creatinina sérica ao término do período de observação (p=0,328 para interação tempo-grupo) e ao término do estudo (p=0,380) não atingiram significância estatística (Tabela 8). Os valores do sódio sérico, potássio e glicemia arterial ao longo do estudo estão apresentados na tabela 8.

Tabela 4 - Parâmetros hemodinâmicos sistêmicos

Variáveis	Grupos	BL	EOP	RP 12h	RP 24h	RP 36h	RP 48h	END	Valor de p ¶
FC (bpm)	CG	108 ± 29	94 ± 12	86 ± 18	85 ± 15	80 ± 12	79 ± 12	79 ± 12	
	ΔT-6h	102 ± 25	135 ± 26 ¥	144 ± 11	157 ± 22	142 ± 24	123 ± 22	123 ± 22 ¥	<0,001 ^a
	ΔT-12h	94 ± 12	165 ± 31 §	171 ± 22	161 ± 26	143 ± 30	142 ± 22	153 ± 29 §	<0,001 ^b
	ΔT-24h	90 ± 15	190 ± 27 # &	188 ± 34	153 ± 21	128 ± 17	119 ± 17	150 ± 45 #	<0,001 ^c
PAM (mm Hg)	CG	96 ± 15	78 ± 21	77 ± 12	82 ± 21	71 ± 11	65 ± 15	65 ± 15	
	ΔT-6h	81 ± 15	76 ± 9	82 ± 7	73 ± 12	66 ± 7	67 ± 7	67 ± 7	0,178 ^a
	ΔT-12h	87 ± 10	85 ± 17	82 ± 19	73 ± 12	70 ± 17	68 ± 9	59 ± 18	0,509 ^c
	ΔT-24h	92 ± 8	67 ± 13	66 ± 13	70 ± 5	71 ± 3	70 ± 4	56 ± 19	
PMAP (mm Hg)	CG	15 ± 3	15 ± 3	15 ± 3	16 ± 3	16 ± 4	19 ± 4	19 ± 4	
	ΔT-6h	13 ± 1	16 ± 2	16 ± 3	16 ± 5	17 ± 4	18 ± 5	18 ± 5	0,004 ^a
	ΔT-12h	15 ± 5	20 ± 4 §	19 ± 3	22 ± 5	25 ± 4	25 ± 3	24 ± 3 §z	0,014 ^b
	ΔT-24h	16 ± 6	16 ± 3	20 ± 5	20 ± 3	20 ± 4	21 ± 4	22 ± 4	0,012 ^c
PVC (mm Hg)	CG	3 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	5 ± 2	5 ± 2	
	ΔT-6h	4 ± 1	3 ± 2	3 ± 2	4 ± 3	6 ± 3	8 ± 3	8 ± 3	0,006 ^a
	ΔT-12h	4 ± 1	2 ± 2	4 ± 3	4 ± 2	6 ± 3	7 ± 3	8 ± 3	0,026 ^b
	ΔT-24h	5 ± 4	2 ± 1 #	2 ± 2	5 ± 1	6 ± 2	7 ± 2	6 ± 2	0,160 ^c
POAP (mm Hg)	CG	3 ± 1	5 ± 1	5 ± 2	6 ± 2	5 ± 2	7 ± 2	7 ± 2	
	ΔT-6h	5 ± 1	3 ± 2	4 ± 2	5 ± 3	7 ± 3	8 ± 3	8 ± 3	0,002 ^a
	ΔT-12h	5 ± 1	3 ± 2	3 ± 2	5 ± 3	7 ± 2	8 ± 4	8 ± 3	0,128 ^b
	ΔT-24h	6 ± 3	3 ± 2	4 ± 1	6 ± 2	8 ± 2	8 ± 2	7 ± 2	0,727 ^c
IRVS (mm Hg L/Kg/min)	CG	731 ± 132	583 ± 146	589 ± 124	633 ± 181	566 ± 145	561 ± 129	561 ± 129	
	ΔT-6h	620 ± 150	638 ± 147	689 ± 134	561 ± 131	402 ± 120	398 ± 81	398 ± 81 ¥	<0,001 ^a
	ΔT-12h	623 ± 109	749 ± 169	633 ± 175	478 ± 166	409 ± 119	397 ± 79	356 ± 103 §	0,183 ^b
	ΔT-24h	679 ± 164	641 ± 132	486 ± 123	386 ± 64	448 ± 62	372 ± 73	332 ± 79 #	<0,001 ^c
IC (mL/kg/ min)	CG	128 ± 15	126 ± 18	127 ± 22	124 ± 15	122 ± 26	107 ± 20	107 ± 20	
	ΔT-6h	126 ± 12	119 ± 34	119 ± 21	125 ± 24	157 ± 35	151 ± 28	151 ± 28	<0,001 ^a
	ΔT-12h	135 ± 15	113 ± 25	125 ± 16	152 ± 33	161 ± 44	158 ± 43	142 ± 48	0,297 ^b
	ΔT-24h	133 ± 24	104 ± 15	134 ± 29	173 ± 27	147 ± 19	173 ± 29	150 ± 40	0,075 ^c
IVS (mL/kg)	CG	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,3	
	ΔT-6h	1,3 ± 0,3	0,9 ± 0,2 ¥	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,3	<0,001 ^a
	ΔT-12h	1,4 ± 0,2	0,7 ± 0,2 §	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,0 ± 0,4	<0,001 ^b
	ΔT-24h	1,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1 # &	0,8 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,1 ± 0,5	0,197 ^c
SvO₂ (%)	CG	58 ± 7	56 ± 9	58 ± 6	59 ± 6	58 ± 8	60 ± 10	60 ± 10	
	ΔT-6h	55 ± 6	57 ± 6	67 ± 4	60 ± 5	61 ± 5	62 ± 6	62 ± 6	0,003 ^a
	ΔT-12h	56 ± 11	63 ± 10	63 ± 6	63 ± 6	61 ± 10	61 ± 10	55 ± 15	0,242 ^b
	ΔT-24h	51 ± 8	55 ± 7	57 ± 10	63 ± 5	70 ± 8	71 ± 10	57 ± 23	0,801 ^c

Valores expressos em média ± DP. BL = *baseline*, EOP = final do período de observação, RP = período de ressuscitação, END = após 48 horas de ressuscitação ou imediatamente antes da morte, caso tenha morrido precocemente, FC = frequência cardíaca, PAM = pressão arterial média, PMAP = pressão média na artéria pulmonar, PVC = pressão venosa central, POAP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, IRVS = índice de resistência vascular sistêmica, IC = índice cardíaco, IVS = índice de volume sistólico, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ¶ = valores de p: a = interação tempo-grupo com ANOVA para medidas repetidas, incluindo os tempos BL, EOP, RP12h, RP24h, RP36h e RP48h, b = análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) no tempo EOP e c = análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) no tempo END. Teste *Tukey* após ANOVA: comparações significantes com p < 0,05: ¥ = ΔT-6h vs. CG, § = ΔT-12h vs. CG, z = ΔT-12h vs. ΔT-6h, # = ΔT-24h vs. CG e & = ΔT-24h vs. ΔT-6h.

Tabela 5 - Parâmetros hemodinâmicos regionais, lactato arterial, temperaturas central e periférica

Variáveis	Grupos	BL	EOP	RP 12h	RP 24h	RP 36h	RP 48h	END	Valor de p ¶
SvcO₂ (%)	CG	64 ± 10	67 ± 9	69 ± 8	68 ± 6	62 ± 10	61 ± 15	61 ± 15	
	ΔT-6h	61 ± 9	53 ± 5	60 ± 12	62 ± 8	65 ± 8	66 ± 8	66 ± 8	0,088 ^a
	ΔT-12h	65 ± 7	67 ± 9	69 ± 6	72 ± 6	68 ± 8	70 ± 6	69 ± 6	0,414 ^c
	ΔT-24h	67 ± 9	53 ± 4	53 ± 13	64 ± 5	66 ± 5	66 ± 7	61 ± 12	
SviO₂ (%)	CG	67 ± 9	63 ± 8	65 ± 4	66 ± 10	64 ± 8	62 ± 14	62 ± 14	
	ΔT-6h	62 ± 10	62 ± 12	70 ± 4	69 ± 11	69 ± 8	73 ± 9	73 ± 9	0,350 ^a
	ΔT-12h	64 ± 5	59 ± 13	61 ± 6	65 ± 13	63 ± 9	64 ± 13	62 ± 13	0,369 ^c
	ΔT-24h	56 ± 13	60 ± 12	64 ± 15	74 ± 3	76 ± 2	73 ± 11	64 ± 15	
IFSC (mL/kg/ min)	CG	8,6 ± 1,7	9,9 ± 3,0	9,4 ± 2,4	9,3 ± 4,1	8,5 ± 3,9	8,6 ± 4,3	8,6 ± 4,3	
	ΔT-6h	6,8 ± 3,0	4,7 ± 2,0 [¥]	5,1 ± 1,8	5,5 ± 1,6	6,9 ± 2,1	6,4 ± 2,1	6,4 ± 2,1	0,051 ^a
	ΔT-12h	8,1 ± 1,2	6,4 ± 1,8 [§]	7,6 ± 2,2	7,8 ± 3,7	8,8 ± 5,0	8,8 ± 3,4	7,8 ± 3,4	< 0,001 ^b
	ΔT-24h	8,1 ± 1,9	5,5 ± 1,2 [#]	6,7 ± 1,3	8,2 ± 1,4	7,3 ± 1,7	6,6 ± 1,4	6,0 ± 1,9	0,313 ^c
IFSF (mL/kg/ min)	CG	5,1 ± 1,4	4,5 ± 2,2	4,3 ± 2,6	4,4 ± 2,7	4,1 ± 2,3	4,0 ± 2,5	4,0 ± 2,5	
	ΔT-6h	4,3 ± 1,5	2,6 ± 0,9	2,4 ± 1,3	2,3 ± 0,8	3,4 ± 1,2	3,3 ± 1,0	3,3 ± 1,0	0,085 ^a
	ΔT-12h	4,0 ± 1,0	2,3 ± 0,5	2,6 ± 0,4	2,9 ± 1,3	3,5 ± 1,7	3,3 ± 1,2	3,0 ± 1,1	0,280 ^c
	ΔT-24h	4,9 ± 2,0	1,9 ± 0,5	2,0 ± 0,3	3,0 ± 0,5	2,8 ± 0,6	2,6 ± 0,7	2,5 ± 1,0	
Lactato arterial (mmol/L)	CG	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	
	ΔT-6h	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,002 ^a
	ΔT-12h	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,3	1,1 ± 0,4	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,6 ± 1,7	0,002 ^b
	ΔT-24h	0,9 ± 0,2	2,4 ± 1,2 ^{#&§}	1,9 ± 1,0	1,3 ± 0,5	1,3 ± 0,4	0,9 ± 0,3	2,4 ± 2,7	0,123 ^c
TC (°C)	CG	39,3 ± 0,6	40,3 ± 0,2	39,7 ± 0,6	39,6 ± 0,7	39,3 ± 0,7	39,2 ± 0,8	39,2 ± 0,8	
	ΔT-6h	39,8 ± 1,0	40,9 ± 0,2	40,8 ± 0,4	40,5 ± 0,7	40,5 ± 0,6	40,2 ± 0,3	40,2 ± 0,3 [¥]	0,123 ^a
	ΔT-12h	39,4 ± 0,8	40,9 ± 0,3	40,9 ± 0,1	40,5 ± 0,2	40,4 ± 0,3	40,4 ± 0,4	40,4 ± 0,4 [§]	0,001 ^c
	ΔT-24h	39,4 ± 0,8	41,0 ± 0,4	40,6 ± 0,2	40,3 ± 0,4	40,0 ± 0,5	40,0 ± 0,8	40,1 ± 0,6 [#]	
TP (°C)	CG	35,5 ± 1,3	36,3 ± 0,5	35,6 ± 1,5	35,4 ± 1,5	36,0 ± 0,8	35,3 ± 1,0	35,3 ± 1,0	
	ΔT-6h	36,9 ± 1,4	34,9 ± 1,6	32,6 ± 5,2	34,4 ± 2,2	36,8 ± 1,8	36,4 ± 1,4	36,4 ± 1,4	0,001 ^a
	ΔT-12h	35,9 ± 1,1	29,0 ± 4,3 ^{§z}	32,3 ± 4,1	34,0 ± 2,7	36,0 ± 2,0	35,8 ± 1,0	34,9 ± 2,0	< 0,001 ^b
	ΔT-24h	36,0 ± 1,4	29,4 ± 3,9 ^{#&}	31,0 ± 4,6	36,8 ± 0,8	36,1 ± 1,9	35,2 ± 2,2	33,9 ± 3,6	0,202 ^c

Valores expressos em média ± DP. BL = *baseline*, EOP = final do período de observação, RP = período de ressuscitação, END = após 48 horas de ressuscitação ou imediatamente antes da morte, caso tenha morrido precocemente, SvcO₂ = saturação venosa central de oxigênio, SviO₂ = saturação venosa de oxigênio na veia cava inferior, IFSC = índice de fluxo sanguíneo carotídeo, IFSF = índice de fluxo sanguíneo femoral, TC = temperatura central, TP = temperatura periférica, ¶ = valores de p: a = interação tempo-grupo com ANOVA para medidas repetidas, incluindo os tempos BL, EOP, RP12h, RP24h, RP36h e RP48h, b = análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) no tempo EOP e c = análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) no tempo END. Teste *Tukey* após ANOVA: comparações significantes com p < 0,05: ¥ = ΔT-6h vs. CG, § = ΔT-12h vs. CG, z = ΔT-12h vs. ΔT-6h, # = ΔT-24h vs. CG, & = ΔT-24h vs. ΔT-6h e \$ = ΔT-24h vs. ΔT-12h

Tabela 6. Parâmetros respiratórios

Variáveis	Grupos	BL	EOP	RP 12 h	RP 24 h	RP 36 h	RP 48 h	End	Valor de p ¶
RR (ipm)	CG	20 ± 1	19 ± 1	19 ± 1	19 ± 2	19 ± 2	19 ± 3	19 ± 3	
	ΔT-6h	21 ± 2	22 ± 3	22 ± 4	22 ± 3	26 ± 6	24 ± 3	24 ± 3	<0,001 ^a
	ΔT-12h	22 ± 5	25 ± 5 [§]	24 ± 4	27 ± 6	29 ± 6	32 ± 5	31 ± 5 ^{§z}	0,027 ^b
	ΔT-24h	21 ± 2	23 ± 2	26 ± 2	25 ± 2	26 ± 2	26 ± 3	29 ± 4 [#]	<0,001 ^c
VC (mL/kg)	CG	8,1 ± 0,6	8,1 ± 0,5	8,3 ± 0,6	8,2 ± 0,6	8,3 ± 0,5	8,1 ± 0,8	8,1 ± 0,8	
	ΔT-6h	8,0 ± 0,3	8,0 ± 0,3	8,2 ± 0,6	8,2 ± 0,4	8,0 ± 0,9	8,1 ± 0,9	8,1 ± 0,9	0,420 ^a
	ΔT-12h	8,3 ± 0,5	8,3 ± 0,7	7,9 ± 0,8	8,4 ± 0,9	8,0 ± 0,4	8,1 ± 0,7	8,5 ± 1,0	0,648 ^c
	ΔT-24h	8,4 ± 0,5	8,4 ± 0,6	8,6 ± 0,8	8,1 ± 0,3	8,3 ± 0,4	8,2 ± 0,4	8,5 ± 0,7	
VM (L/min)	CG	6,7 ± 0,5	6,5 ± 0,7	6,3 ± 0,8	6,3 ± 0,9	6,4 ± 0,9	6,1 ± 1,0	6,1 ± 1,0	
	ΔT-6h	6,8 ± 0,5	7,3 ± 0,6	7,5 ± 0,9	7,5 ± 0,8	8,4 ± 1,3	8,1 ± 0,8	8,1 ± 0,8 [¥]	<0,001 ^a
	ΔT-12h	7,1 ± 1,1	8,2 ± 1,3 [§]	7,6 ± 1,0	9,4 ± 1,8	9,6 ± 1,5	10,8 ± 1,8	10,6 ± 1,7 ^{§z}	0,015 ^b
	ΔT-24h	6,8 ± 1,0	7,7 ± 1,3	8,6 ± 0,9	8,2 ± 1,3	8,7 ± 1,6	8,7 ± 1,4	9,5 ± 1,5 [#]	<0,001 ^c
FiO ₂ (%)	CG	30 ± 0	34 ± 7	36 ± 7	41 ± 11	45 ± 9	54 ± 14	54 ± 14	
	ΔT-6h	30 ± 0	32 ± 5	34 ± 5	40 ± 13	40 ± 11	47 ± 13	47 ± 13	0,663 ^a
	ΔT-12h	30 ± 0	32 ± 5	40 ± 24	47 ± 24	55 ± 23	63 ± 29	61 ± 25	0,461 ^c
	ΔT-24h	30 ± 0	31 ± 3	37 ± 5	36 ± 5	46 ± 5	48 ± 8	54 ± 13	
PaO ₂ / FiO ₂	CG	482 ± 36	394 ± 63	346 ± 84	331 ± 96	253 ± 82	237 ± 74	237 ± 74	
	ΔT-6h	459 ± 40	400 ± 39	377 ± 48	289 ± 91	289 ± 73	257 ± 62	257 ± 62	0,430 ^a
	ΔT-12h	476 ± 64	408 ± 56	340 ± 139	260 ± 86	208 ± 65	194 ± 93	183 ± 83	0,211 ^c
	ΔT-24h	459 ± 63	406 ± 60	287 ± 77	279 ± 38	254 ± 42	240 ± 59	205 ± 69	
PEEP (cm H ₂ O)	CG	5 ± 0	5 ± 1	5 ± 1	6 ± 2	7 ± 2	9 ± 3	9 ± 3	
	ΔT-6h	5 ± 0	5 ± 0	5 ± 1	6 ± 2	7 ± 2	8 ± 3	8 ± 3	0,818 ^a
	ΔT-12h	5 ± 0	5 ± 0	6 ± 2	8 ± 4	9 ± 5	10 ± 4	9 ± 4	0,836 ^c
	ΔT-24h	5 ± 0	5 ± 0	5 ± 0	6 ± 1	7 ± 1	9 ± 3	8 ± 3	
PP (cm H ₂ O)	CG	15 ± 1	16 ± 3	18 ± 2	19 ± 5	22 ± 4	27 ± 7	27 ± 7	
	ΔT-6h	16 ± 1	16 ± 1	18 ± 2	19 ± 3	21 ± 3	22 ± 4	22 ± 4	0,045 ^a
	ΔT-12h	15 ± 1	17 ± 2	19 ± 4	23 ± 6	27 ± 8	29 ± 6	30 ± 6	0,308 ^b
	ΔT-24h	14 ± 1	18 ± 2	20 ± 3	23 ± 4	25 ± 4	25 ± 3	26 ± 3	0,063 ^c
EtCO ₂ (mm Hg)	CG	38 ± 3	36 ± 2	34 ± 1	32 ± 2	32 ± 2	31 ± 3	31 ± 3	
	ΔT-6h	38 ± 4	40 ± 4	37 ± 2	37 ± 2	33 ± 2	33 ± 1	33 ± 1	0,274 ^a
	ΔT-12h	38 ± 2	38 ± 3	37 ± 3	34 ± 2	34 ± 2	31 ± 5	31 ± 5	0,297 ^c
	ΔT-24h	39 ± 3	37 ± 3	34 ± 4	35 ± 3	33 ± 2	33 ± 3	33 ± 3	
SpO ₂ (%)	CG	98 ± 1	97 ± 2	95 ± 3	97 ± 2	96 ± 2	97 ± 2	97 ± 2	
	ΔT-6h	98 ± 2	97 ± 2	97 ± 1	94 ± 4	93 ± 3	96 ± 2	96 ± 2	0,227 ^a
	ΔT-12h	97 ± 2	97 ± 2	93 ± 4	94 ± 5	94 ± 4	94 ± 3	92 ± 5	0,090 ^c
	ΔT-24h	98 ± 1	95 ± 5	95 ± 2	94 ± 3	96 ± 3	95 ± 5	91 ± 9	

Valores expressos em média ± DP. BL = *baseline*, EOP = final do período de observação, RP = período de ressuscitação, END = após 48 horas de ressuscitação ou imediatamente antes da morte, caso tenha morrido precocemente, RR = frequência respiratória, VC = volume corrente, VM = volume minuto expirado, PaO₂/FiO₂ = relação entre pressão parcial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio, PEEP = pressão expiratória final positiva, PP = pressão de platô, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, ¶ = valores de p: a = interação tempo-grupo com ANOVA para medidas repetidas, incluindo os tempos BL, EOP, RP12h, RP24h, RP36h e RP48h, b = análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) no tempo EOP e c = análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) no tempo END. Teste *Tukey* após ANOVA: comparações significantes com p < 0,05: ¥ = ΔT-6h vs. CG, § = ΔT-12h vs. CG, z = ΔT-12h vs. ΔT-6h e # = ΔT-24h vs. CG

Tabela 7. Resultados das gasometrias arteriais e hemoglobina

Variáveis	Grupos	BL	EOP	RP 12 h	RP 24 h	RP 36 h	RP 48 h	End	Valor de p ¶
pH	CG	7,53 ± 0,04	7,50 ± 0,03	7,52 ± 0,05	7,52 ± 0,03	7,51 ± 0,02	7,51 ± 0,04	7,51 ± 0,04	
	ΔT-6h	7,55 ± 0,01	7,48 ± 0,04	7,47 ± 0,03	7,45 ± 0,04	7,49 ± 0,04	7,49 ± 0,03	7,49 ± 0,03	<0,001 ^a
	ΔT-12h	7,52 ± 0,03	7,44 ± 0,03 [§]	7,42 ± 0,06	7,47 ± 0,05	7,41 ± 0,07	7,44 ± 0,07	7,40 ± 0,09	0,001 ^b
	ΔT-24h	7,52 ± 0,04	7,39 ± 0,07 ^{#&}	7,44 ± 0,09	7,49 ± 0,02	7,52 ± 0,02	7,51 ± 0,06	7,39 ± 0,17	0,069 ^c
Bic (mmol/L)	CG	33,2 ± 1,0	30,3 ± 1,4	30,6 ± 2,5	30,1 ± 2,8	29,9 ± 2,7	30,1 ± 3,0	30,1 ± 3,0	
	ΔT-6h	33,1 ± 1,4	30,7 ± 1,6	29,6 ± 1,4	30,0 ± 2,0	30,6 ± 2,2	30,6 ± 1,3	30,6 ± 1,3	0,002 ^a
	ΔT-12h	32,7 ± 1,7	27,8 ± 1,9 ^z	29,4 ± 2,3	30,0 ± 1,6	29,3 ± 1,4	29,9 ± 1,9	29,2 ± 2,1	<0,001 ^b
	ΔT-24h	32,4 ± 1,2	25,5 ± 3,1 ^{#&}	28,8 ± 4,0	32,1 ± 1,3	32,4 ± 1,4	32,4 ± 1,8	27,7 ± 6,5	0,527 ^c
BE (mmol/L)	CG	10,2 ± 1,1	7,5 ± 1,6	6,7 ± 0,7	7,3 ± 2,8	6,8 ± 2,6	7,0 ± 3,2	7,0 ± 3,2	
	ΔT-6h	10,6 ± 1,3	7,7 ± 2,1	6,7 ± 1,6	6,4 ± 2,4	7,6 ± 2,5	7,4 ± 1,4	7,4 ± 1,4	<0,001 ^a
	ΔT-12h	9,7 ± 1,5	4,6 ± 2,2	5,3 ± 2,5	6,8 ± 2,0	5,1 ± 1,4	5,8 ± 1,8	4,6 ± 2,8	<0,001 ^b
	ΔT-24h	9,3 ± 1,8	1,7 ± 3,7 ^{#&}	5,2 ± 5,2	8,9 ± 1,3	9,7 ± 1,6	9,3 ± 2,0	3,3 ± 8,5	0,318 ^c
PaCO₂ (mm Hg)	CG	41,1 ± 3,6	39,6 ± 2,2	38,1 ± 2,7	37,4 ± 3,7	38,1 ± 3,4	38,0 ± 3,5	38,0 ± 3,5	
	ΔT-6h	38,3 ± 1,7	42,5 ± 2,3	41,5 ± 2,5	44,6 ± 3,0	41,4 ± 3,2	41,1 ± 2,6	41,1 ± 2,6	0,006 ^a
	ΔT-12h	40,8 ± 3,7	42,4 ± 2,4	46,4 ± 6,7	42,3 ± 4,5	48,3 ± 10,0	45,4 ± 8,8	48,7 ± 9,6 [§]	0,190 ^b
	ΔT-24h	40,3 ± 3,5	43,6 ± 5,9	43,1 ± 3,1	43,6 ± 2,5	40,2 ± 1,9	42,0 ± 5,9	47,0 ± 10,1	0,032 ^c
PaO₂ (mm Hg)	CG	145 ± 11	130 ± 15	121 ± 17	130 ± 31	111 ± 30	121 ± 36	121 ± 36	
	ΔT-6h	138 ± 12	128 ± 11	126 ± 15	107 ± 16	113 ± 37	116 ± 13	116 ± 13	0,723 ^a
	ΔT-12h	143 ± 19	132 ± 23	113 ± 27	106 ± 15	102 ± 8	102 ± 16	97 ± 17	0,921 ^b
	ΔT-24h	138 ± 19	127 ± 20	104 ± 20	99 ± 7,6	115 ± 11	112 ± 18	103 ± 18	0,148 ^c
Hb (g/dL)	CG	9,3 ± 1,1	7,8 ± 1,0	7,4 ± 1,0	6,7 ± 0,7	6,4 ± 0,8	5,9 ± 0,8	5,9 ± 0,8	
	ΔT-6h	8,7 ± 0,5	10,9 ± 1,7 [¥]	11,1 ± 1,2	11,1 ± 0,9	9,1 ± 1,1	8,4 ± 1,0	8,4 ± 1,0 [¥]	<0,001 ^a
	ΔT-12h	9,0 ± 1,1	12,5 ± 1,6 [§]	11,6 ± 1,0	10,2 ± 0,8	8,9 ± 0,7	8,6 ± 0,9	9,2 ± 1,3 [§]	<0,001 ^b
	ΔT-24h	9,0 ± 0,8	12,9 ± 1,3 ^{#&}	10,9 ± 0,7	9,0 ± 0,6	8,5 ± 0,9	7,7 ± 0,8	8,4 ± 1,5 [#]	<0,001 ^c

Valores expressos em média ± DP. BL = baseline, EOP = final do período de observação, RP = período de ressuscitação, END = após 48 horas de ressuscitação ou imediatamente antes da morte, caso tenha morrido precocemente, Bic = bicarbonato, PaCO₂ = pressão arterial parcial de CO₂, BE = excesso de bases, PaO₂ = pressão parcial de oxigênio, Hb = hemoglobina arterial, ¶ = valores de p: a = interação tempo-grupo com ANOVA para medidas repetidas, incluindo os tempos BL, EOP, RP12h, RP24h, RP36h e RP48h, b = análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) no tempo EOP e c = análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) no tempo END. Teste Tukey após ANOVA: comparações significantes com p < 0,05: ¥ = ΔT-6h vs. CG, § = ΔT-12h vs. CG, z = ΔT-12h vs. ΔT-6h, # = ΔT-24h vs. CG e & = ΔT-24h vs. ΔT-6h

Tabela 8. Creatinina sérica e parâmetros bioquímicos

Variáveis	Grupos	BL	EOP	RP 12 h	RP 24 h	RP 36 h	RP 48 h	END	Valor de p [¶]
Sódio (mmol/L)	CG	136 ± 1	138 ± 2	140 ± 2	140 ± 3	140 ± 2	139 ± 3	139 ± 3	
	ΔT-6h	136 ± 2	135 ± 3 [¥]	135 ± 4	136 ± 4	137 ± 3	137 ± 4	137 ± 4	0,001 ^a
	ΔT-12h	136 ± 1	135 ± 2	136 ± 2	136 ± 2	137 ± 2	135 ± 2	135 ± 2 [§]	0,016 ^b
	ΔT-24h	136 ± 1	134 ± 1 [#]	135 ± 2	137 ± 1	138 ± 3	137 ± 2	135 ± 3 [#]	0,018 ^c
Potássio (mmol/L)	CG	3,9 ± 0,2	3,9 ± 0,4	3,7 ± 0,2	3,7 ± 0,2	3,8 ± 0,2	4,0 ± 0,3	4,0 ± 0,3	
	ΔT-6h	4,5 ± 1,0	4,4 ± 0,3	4,1 ± 0,4	3,8 ± 0,2	3,8 ± 0,3	3,9 ± 0,4	3,9 ± 0,4	0,040 ^a
	ΔT-12h	4,2 ± 0,4	4,6 ± 0,6 [§]	4,2 ± 0,4	4,1 ± 0,4	4,7 ± 0,8	4,6 ± 0,9	4,5 ± 0,8	0,040 ^b
	ΔT-24h	4,1 ± 0,3	4,4 ± 0,6	4,5 ± 1,0	3,9 ± 0,5	3,9 ± 0,7	4,0 ± 0,7	4,8 ± 1,2	0,083 ^c
Glicose arterial (mmol/L)	CG	6,5 ± 1,4	5,0 ± 0,5	5,1 ± 0,6	4,7 ± 0,6	4,8 ± 0,6	4,1 ± 0,7	4,1 ± 0,7	
	ΔT-6h	8,1 ± 4,0	4,2 ± 0,6	3,8 ± 0,4	4,0 ± 0,4	3,8 ± 0,4	4,7 ± 0,4	4,7 ± 0,4	0,158 ^a
	ΔT-12h	6,9 ± 2,1	3,8 ± 0,6	3,8 ± 0,3	3,8 ± 0,5	4,2 ± 0,6	4,9 ± 1,9	4,9 ± 1,6	0,499 ^c
	ΔT-24h	5,9 ± 2,2	3,6 ± 0,8	3,9 ± 0,6	4,2 ± 0,4	4,4 ± 0,5	4,6 ± 0,5	4,8 ± 0,9	
Creatinina (mg/dL)	CG	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,2		1,1 ± 0,1		1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	
	ΔT-6h	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,2		1,1 ± 0,2		1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,4	0,328 ^d
	ΔT-12h	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,5		1,3 ± 0,6		2,0 ± 2,0	1,8 ± 1,8	0,380 ^c
	ΔT-24h	1,0 ± 0,2	1,4 ± 0,7		1,0 ± 0,3		0,9 ± 0,2	1,9 ± 1,5	

Valores expressos em média ± DP. BL = *baseline*, EOP = final do período de observação, RP = período de ressuscitação, END = após 48 horas de ressuscitação ou imediatamente antes da morte, caso tenha morrido precocemente, ¶ = valores de p: a = interação tempo-grupo com ANOVA para medidas repetidas, incluindo os tempos BL, EOP, RP12h, RP24h, RP36h e RP48h, b = análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) no tempo EOP e c = análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) no tempo END. Teste *Tukey* após ANOVA: comparações significantes com $p < 0,05$: ¥ = ΔT-6h vs. CG, § = ΔT-12h vs. CG, # = ΔT-24h vs. CG e & = ΔT-24h vs. ΔT-6h, d = interação tempo-grupo com ANOVA para medidas repetidas, incluindo os tempos BL, EOP, RP24h e RP48h

4.7. RESULTADOS DA ANÁLISE DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL

A única alteração mitocondrial induzida pela sepse antes do início das manobras de ressuscitação foi observada nas mitocôndrias isoladas no músculo esquelético (Figura 22). Houve aumento do Complexo I - RCR após 12 horas da indução da peritonite fecal ($p=0,021$; efeito tempo com ANOVA para medidas repetidas), resultante da redução da atividade do Complexo I - estado 4. Esta alteração não foi observada nos grupos ΔT-6h e ΔT-24h (Figura 22).

Houve redução da respiração mitocondrial dependente do Complexo II estado 3 ($p=0,008$; efeito tempo com ANOVA para medidas repetidas) e estado 4 ($p=0,01$; efeito tempo com ANOVA para medidas repetidas) no músculo esquelético durante o período de observação em todos os grupos estudados (Tabela 9). As atividades do Complexo II estado 3 e do estado 4 aumentaram durante o período de ressuscitação nos quatro grupos estudados (Tabela 9).

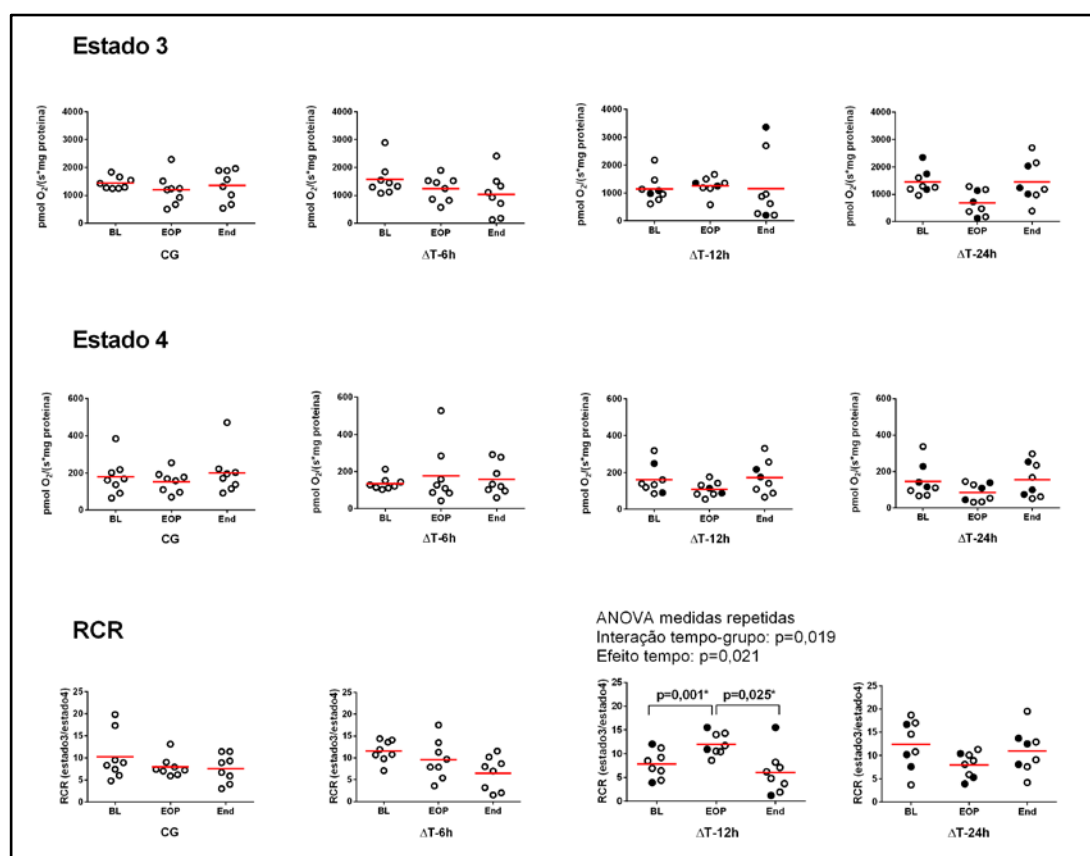


Figura 22. Respiração mitocondrial dependente do Complexo I em mitocôndrias isoladas do músculo esquelético; O consumo de oxigênio nos estados 3 e 4 foi expresso em pmol/s/mg proteína. BL = *baseline*, EOP = final do período de observação, RCR = razão de controle respiratório, calculado dividindo-se a taxa de respiração no estado 3 pela a taxa de respiração no estado 4, * = teste-t pareado entre BL e EOP e entre EOP e End. As barras horizontais vermelhas representam os valores médios e os círculos preenchidos em preto os animais que morreram precocemente antes de completar 48 horas de ressuscitação

Tabela 9 - Respiração mitocondrial dependente do Complexo II em mitocôndrias isoladas do músculo esquelético

Variáveis	Grupos	BL	EOP	End	p ¶	Teste-t pareado *
Estado 3	CG	2241 ± 598	1975 ± 748	2266 ± 866		
	ΔT-6h	2222 ± 629	1900 ± 734	1889 ± 782	0,31 ^a	BL vs. EOP: p=0,002
	ΔT-12h	1996 ± 656	1736 ± 363	1969 ± 1180	0,008 ^b	EOP vs. End: p=0,039
	ΔT-24h	2464 ± 809	1259 ± 861	2053 ± 856	0,80 ^c	
Estado 4	CG	363 ± 148	329 ± 112	450 ± 200		
	ΔT-6h	317 ± 84	329 ± 192	296 ± 144	0,22 ^a	BL vs. EOP: p=0,010
	ΔT-12h	356 ± 163	260 ± 84	364 ± 212	0,01 ^b	EOP vs. End: p=0,012
	ΔT-24h	355 ± 150	188 ± 109	347 ± 202	0,56 ^c	
RCR	CG	6,7 ± 2,1	6,1 ± 1,3	5,4 ± 2,0		
	ΔT-6h	7,2 ± 1,2	6,5 ± 1,8	6,7 ± 1,3	0,74 ^a	
	ΔT-12h	6,2 ± 2,2	6,9 ± 1,1	5,8 ± 1,8	0,22 ^b	
	ΔT-24h	7,4 ± 1,5	6,5 ± 1,5	6,7 ± 1,7	0,35 ^c	

Valores expressos em média ± DP. O consumo de oxigênio nos estados 3 e 4 foi expresso em pmol/s/mg proteína. BL = *baseline*, EOP = final do período de observação, RCR = razão de controle respiratório, calculado dividindo-se a taxa de respiração no estado 3 pela a taxa de respiração no estado 4. ¶ = valor de p com ANOVA para medidas repetidas: a = interação tempo-grupo, b = efeito tempo e c = efeito grupo. * = teste-t pareado: como não se demonstrou interação tempo-grupo com RM-ANOVA, foi conduzido teste-t pareado com os dados dos quatro grupos agrupados, comparando-se BL com EOP e EOP com End

Do mesmo modo, houve aumento da respiração mitocondrial dependente do Complexo IV estado 3 (p=0,002; efeito tempo com ANOVA para medidas repetidas) no músculo esquelético durante o período de ressuscitação (Tabela 10).

Tabela 10. Respiração mitocondrial dependente do Complexo IV em mitocôndrias isoladas do músculo esquelético

Variáveis	Grupos	BL	EOP	End	p ¶	Teste-t pareado *
Estado 3	CG	1453 ± 569	1361 ± 619	1955 ± 1036		
	ΔT-6h	1406 ± 615	1345 ± 605	1503 ± 827	0,44 ^a	BL vs. EOP: p=0,147
	ΔT-12h	1120 ± 341	1198 ± 391	1827 ± 1252	0,002 ^b	EOP vs. End: p=0,001
	ΔT-24h	1444 ± 425	827 ± 710	1919 ± 1337	0,89 ^c	

Legenda: Valores expressos em média ± DP. O consumo de oxigênio foi expresso em pmol/s/mg proteína. BL = *baseline*, EOP = final do período de observação. ¶ = valor de p com ANOVA para medidas repetidas: a = interação tempo-grupo, b = efeito tempo e c = efeito grupo. * = teste-t pareado: como não se demonstrou interação tempo-grupo com ANOVA para medidas repetidas, foi conduzido teste-t pareado com os dados dos quatro grupos agrupados, comparando-se BL com EOP e EOP com End

Animais randomizados para o grupo ΔT -24h apresentaram redução da atividade do Complexo II estado 3 nas mitocôndrias isoladas do cérebro ao término do estudo ($p=0,048$; Figura 23).

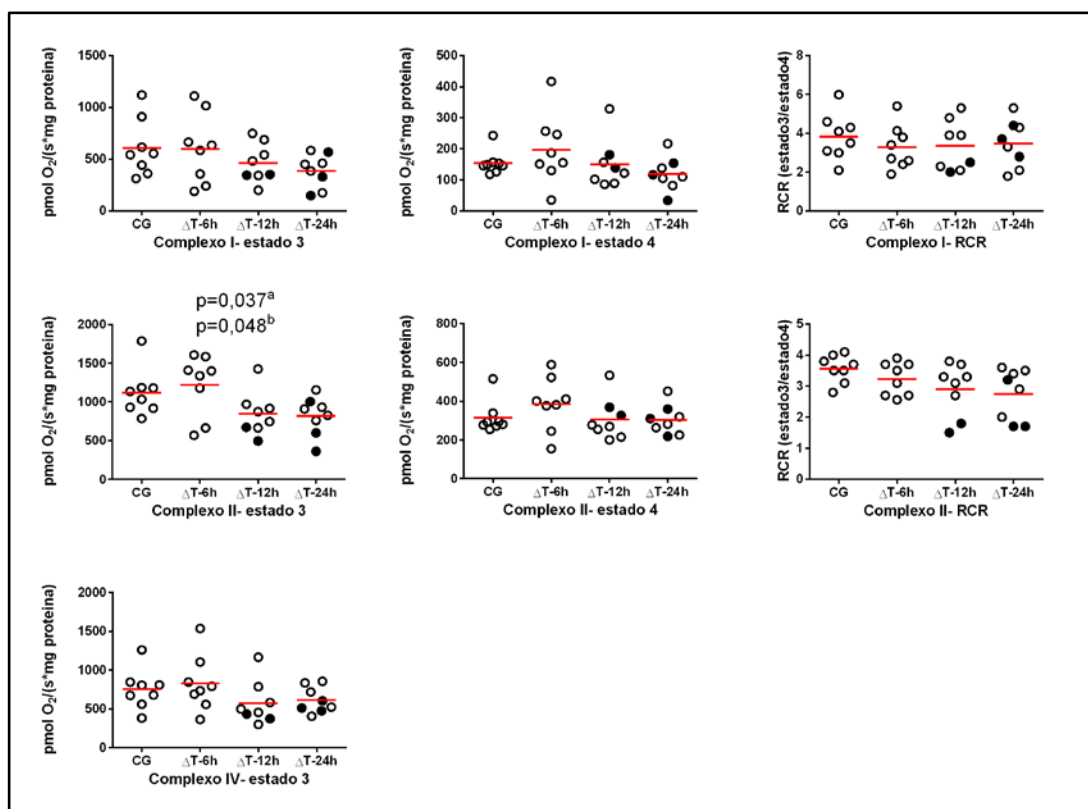


Figura 23. Respiração mitocondrial isolada do cérebro nos animais sépticos e no grupo controle; Legenda: O consumo de oxigênio nos estados 3 e 4 foi expresso em pmol/s/mg proteína. RCR = razão de controle respiratório, calculado dividindo-se a taxa de respiração no estado 3 pela a taxa de respiração no estado 4. As barras horizontais vermelhas representam os valores médios e os círculos preenchidos em preto os animais que morreram precocemente antes de completar 48 horas de ressuscitação. a = valor de p para análise de variância de um fator, b = teste-t independente para CG vs. ΔT -24h

Em contraste, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação à atividade mitocondrial avaliada nas fibras musculares (Tabela 11) e cardíacas (Tabela 12) permeabilizadas, nas mitocôndrias isoladas do fígado (Figura 24) e do ventrículo esquerdo (Figura 25).

Tabela 11 - Respiração mitocondrial máxima (estado 3) avaliada em fibras musculares permeabilizadas

Variáveis	Grupos	BL	EOP	End	p ¶
Complexo I	CG	85 ± 33	98 ± 39	91 ± 49	0,708 ^a
	ΔT-6h	83 ± 55	90 ± 42	95 ± 13	0,654 ^b
	ΔT-12h	96 ± 45	88 ± 23	125 ± 62	0,703 ^c
	ΔT-24h	109 ± 44	102 ± 71	97 ± 30	
Complexo I + II	CG	131 ± 73	130 ± 51	128 ± 68	0,789 ^a
	ΔT-6h	115 ± 53	117 ± 58	121 ± 24	0,621 ^b
	ΔT-12h	144 ± 71	123 ± 22	178 ± 69	0,437 ^c
	ΔT-24h	155 ± 76	139 ± 103	138 ± 44	
Complexo II	CG	90 ± 40	99 ± 35	93 ± 45	0,889 ^a
	ΔT-6h	92 ± 39	87 ± 37	94 ± 23	0,616 ^b
	ΔT-12h	105 ± 64	93 ± 13	127 ± 50	0,505 ^c
	ΔT-24h	102 ± 43	102 ± 56	104 ± 28	
Complexo IV	CG	72 ± 64	64 ± 27	86 ± 54	0,731 ^a
	ΔT-6h	80 ± 97	50 ± 26	45 ± 22	0,079 ^b
	ΔT-12h	102 ± 64	53 ± 20	76 ± 45	0,696 ^c
	ΔT-24h	91 ± 65	73 ± 79	80 ± 31	

Valores expressos em média ± DP. O consumo de oxigênio nos estados 3 e 4 foi expresso em pmol/s/mg proteína. BL = *baseline*, EOP = final do período de observação. ¶ = valor de p com ANOVA para medidas repetidas: a = interação tempo-grupo, b = efeito tempo e c = efeito grupo

Tabela 12 - Respiração mitocondrial máxima (estado 3) avaliada em fibras cardíacas permeabilizadas

Variáveis	CG	ΔT-6h	ΔT-12h	ΔT-24h	p ¶
Complexo I	184 ± 130	212 ± 112	187 ± 66	221 ± 67	0,458
Complexo I + II	253 ± 184	300 ± 179	274 ± 106	302 ± 84	0,890
Complexo II	179 ± 113	187 ± 75	194 ± 60	205 ± 55	0,925
Complexo IV	124 ± 115	125 ± 71	98 ± 53	145 ± 48	0,691

O consumo de oxigênio foi expresso em pmol/s/mg proteína. ¶ = valor de p com análise de variância com um fator

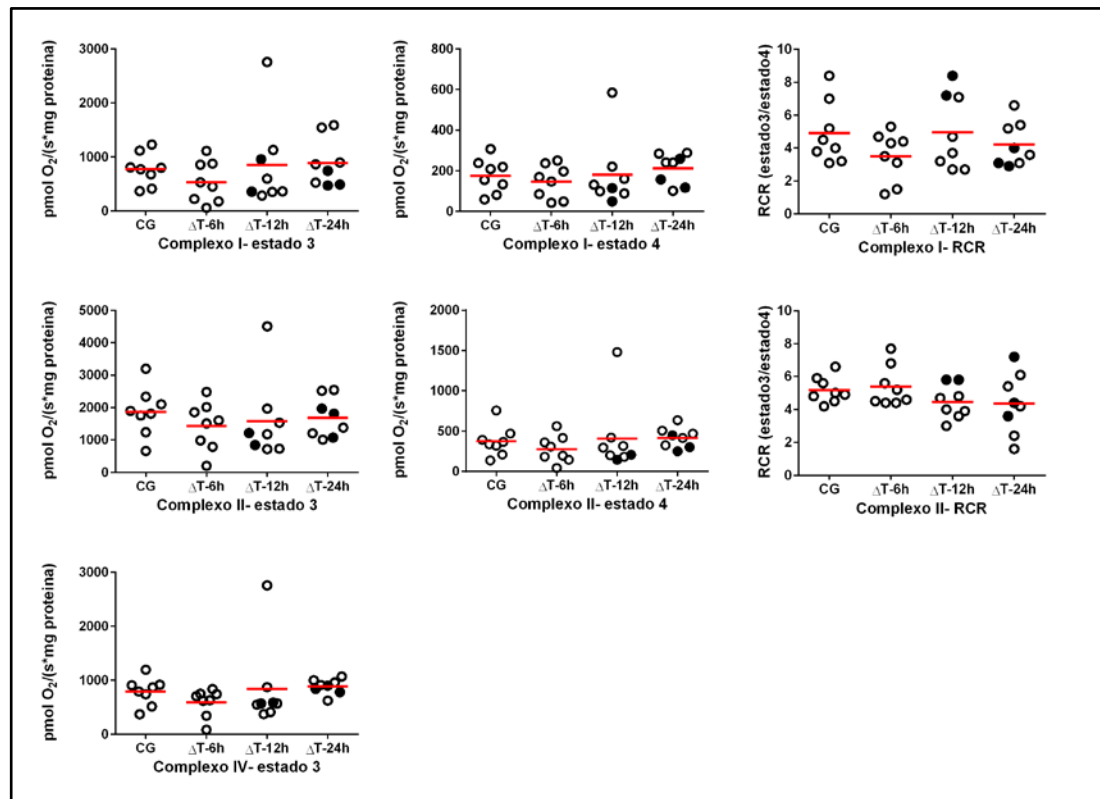


Figura 24. Respiração mitocondrial isolada do fígado nos animais sépticos e no grupo controle; O consumo de oxigênio nos estados 3 e 4 foi expresso em pmol/s/mg proteína. RCR = razão de controle respiratório, calculado dividindo-se a taxa de respiração no estado 3 pela a taxa de respiração no estado 4. As barras horizontais vermelhas representam os valores médios e os círculos preenchidos em preto os animais que morreram precocemente antes de completar 48 horas de ressuscitação

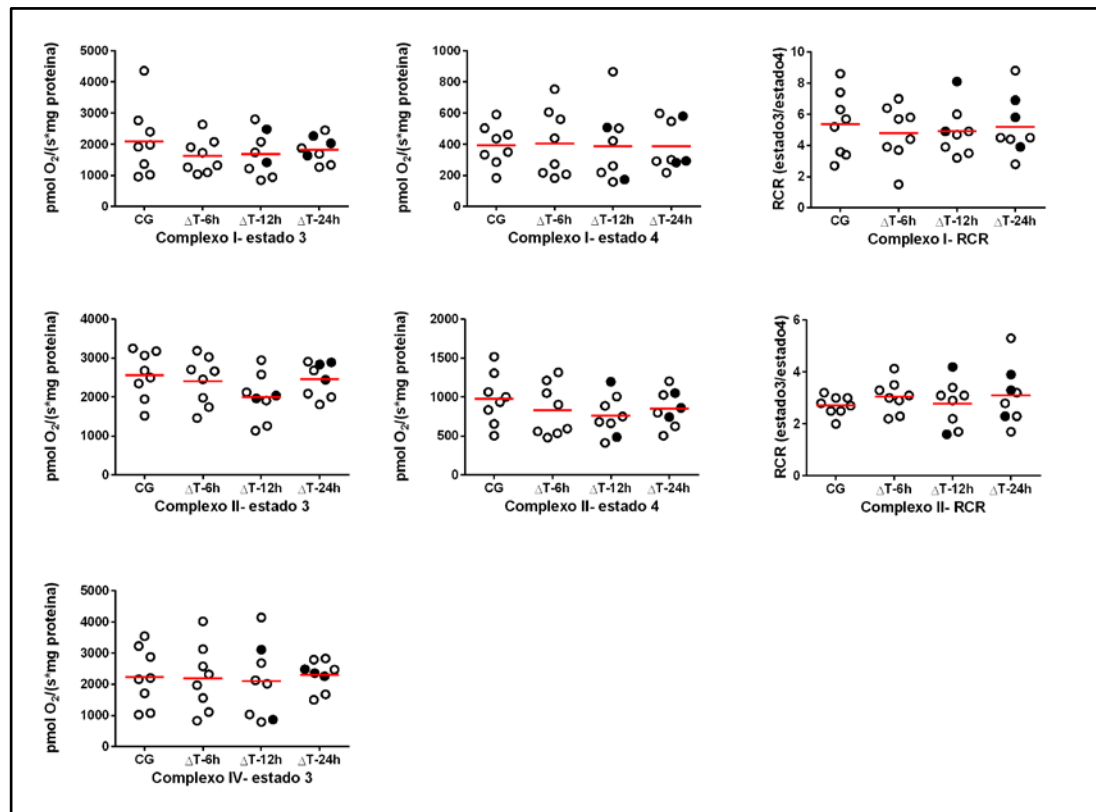


Figura 25. Respiração mitocondrial isolada do coração nos animais sépticos e no grupo controle; O consumo de oxigênio nos estados 3 e 4 foi expresso em pmol/s/mg proteína. RCR = razão de controle respiratório, calculado dividindo-se a taxa de respiração no estado 3 pela a taxa de respiração no estado 4. As barras horizontais vermelhas representam os valores médios e os círculos preenchidos em preto os animais que morreram precocemente antes de completar 48 horas de ressuscitação

4.8. QUANTIFICAÇÃO DO ATP NO MUSCULO ESQUELÉTICO

As concentrações de ATP no músculo esquelético tenderam a aumentar durante o período de observação e decaíram nos quatro grupos estudados durante o período de ressuscitação ($p < 0,001$, efeito tempo com ANOVA para medidas repetidas), com os valores mais baixos no fim do estudo nos grupos $\Delta T-12h$ e $\Delta T-24h$ ($p = 0,002$) (Figura 26).

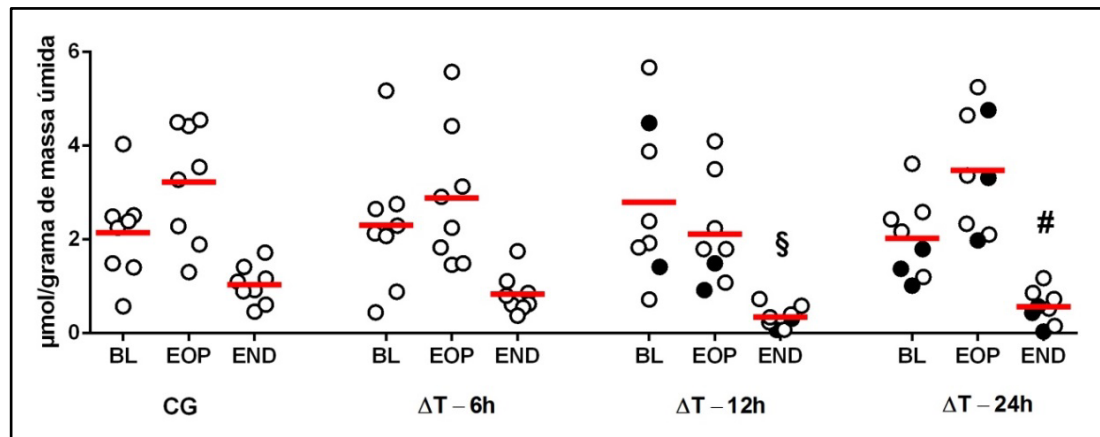


Figura 26. Concentração de ATP no músculo esquelético durante e ao término do estudo; BL = baseline, EOP = final do período de observação, END = após 48 horas de ressuscitação ou imediatamente antes da morte, se precoce, ¶ = valor de p com ANOVA para medidas repetidas incluindo BL, EOP e END: interação tempo-grupo ($p=0,17$), efeito tempo ($p<0,001$). Análise de variância de um fator no EOP ($p=0,20$) e no END ($p=0,002$). Teste *Tukey* após ANOVA: comparações com $p<0,05$: § = $\Delta T-12h$ vs. CG e # = $\Delta T-24h$ vs. CG. Os círculos preenchidos em preto representam os animais que morreram precocemente antes de completar 48 horas de ressuscitação

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados deste modelo experimental de sepse foram que o atraso em iniciar as medidas de ressuscitação aumentou a necessidade de reposição hídrica, a utilização de vasopressores, a intensidade da liberação de mediadores inflamatórios, resultou em disfunções orgânicas mais graves, reduziu a capacidade máxima de respiração mitocondrial cerebral dependente do Complexo II e aumentou a mortalidade. A ausência de mortalidade no grupo em que a ressuscitação foi iniciada após 6 horas da indução de peritonite fecal enfatiza a existência de uma estreita janela de oportunidade para tratamento da sepse.

É provável que a terapia precoce guiada por metas possa melhorar o desfecho de pacientes com sepse grave e choque séptico²⁸. Os nossos resultados enfatizam o fato de que mesmo quando o tratamento adequado é administrado, o retardo no seu início tem grande impacto sobre o curso clínico da doença. Dados provenientes de estudos experimentais com animais^{46,47} e de estudos clínicos^{30,48} demonstraram que o início precoce do tratamento com antibióticos de amplo espectro na sepse grave e no choque séptico possui impacto positivo na sobrevida dos pacientes. Todavia, nestes estudos o tempo para administração dos antibióticos foi abordado isoladamente, enquanto que no presente estudo nós iniciamos todas as medidas de ressuscitação simultaneamente. Portanto, em nosso estudo, não foi possível avaliar o impacto de cada intervenção isoladamente, como a administração de antibióticos, fluidos e drogas vasoativas. A administração precoce de todas as intervenções supracitadas, e não cada intervenção isoladamente teve impacto positivo nos resultados.

A quantidade de fluidos e vasopressores administrados em nosso modelo experimental foi semelhante ao relatado em grandes ensaios clínicos controlados com pacientes sépticos tratados com protocolos de terapia precoce guiada por metas^{28,29}. No entanto, a exposição a catecolaminas e fluidos em nosso estudo variou de acordo com o tempo decorrido entre a indução da sepse e início da ressuscitação, sendo que os animais randomizados para receberem

ressuscitação tardia (ΔT -12h e ΔT -24h) necessitaram de maior aporte de fluidos e vasopressores para que a estabilidade hemodinâmica fosse atingida. A presença de baixo débito urinário associado a maior necessidade de administração de fluidos nestes dois grupos de animais resultaram em um balanço hídrico progressivamente positivo ao término do estudo.

Dados provenientes de estudos experimentais⁴² e de estudos clínicos^{18,49-55} demonstraram que o balanço hídrico progressivamente positivo e a administração de catecolaminas^{26,27,52,53} para restabelecimento da estabilidade hemodinâmica estão associados a piores desfechos em pacientes com sepse grave, choque séptico e lesão pulmonar aguda. Foi demonstrado que a administração de catecolaminas, particularmente em doses elevadas, está associada a alterações do fluxo sanguíneo regional^{56,57}, ocorrência de eventos adversos^{26,27} e ao aumento do risco de óbito^{27,52,53}.

A presença de hipotensão refratária a fluidos associada à dose máxima de vasopressores permitida neste estudo ocorreu apenas nos animais cujo tratamento foi iniciado com tempo superior a seis horas. As repetidas tentativas de restabelecimento da estabilidade hemodinâmica nestes animais resultou em um maior balanço hídrico ao final do estudo com baixos índices de oxigenação (PaO_2/FiO_2), sugerindo que, além de progressão da gravidade da sepse, uma maior intensidade do tratamento administrado possa ter contribuído para a progressão da disfunção pulmonar. Além disso, é possível que a grande quantidade de vasopressores administrados a esses animais possa ter contribuído para o desenvolvimento de disfunção miocárdica⁵². Todavia, nós não avaliamos no presente estudo a função ventricular dos animais com ecocardiografia e não mensuramos os níveis séricos dos marcadores de necrose miocárdica para confirmarmos ou refutarmos esta hipótese.

A disfunção mitocondrial tem sido observada tanto em estudos experimentais^{42,58-64} como na sepse em humanos^{16,65}. Entretanto, a contribuição e a relevância da disfunção mitocondrial na fisiopatologia da síndrome da disfunção de múltiplos órgãos, na morbidade e na mortalidade de pacientes sépticos permanecem controversas^{42,58-64}. Enquanto que a presença da disfunção mitocondrial foi demonstrada em biópsias de músculo esquelético

obtidas em 28 pacientes sépticos após 24 horas da admissão na unidade de terapia intensiva¹⁶ e em amostras de músculo esquelético e fígado provenientes de ratos submetidos a 72 horas peritonite fecal⁵⁹, outros autores reportaram função mitocondrial inalterada em amostras de músculo esquelético obtidas de ratos submetidos a endotoxemia⁶⁶ e no fígado de ratos submetidos a 16 horas de peritonite fecal induzida por ligadura cecal e punção⁵⁸.

No presente estudo, a única alteração mitocondrial associada à sepse detectada antes do início das manobras de ressuscitação protocolada foi o aumento do RCR do Complexo I no músculo esquelético 12 horas após a indução da peritonite fecal. Tal achado sugere um aumento transitório da eficiência da respiração mitocondrial do Complexo I, uma vez que esta alteração não estava presente após 6 horas e após 24 horas de evolução da peritonite. A redução da respiração mitocondrial dependente do Complexo II estados 3 e 4 no músculo esquelético durante o período de observação, antes de iniciadas as manobras de ressuscitação, foi observada em todos os grupos de animais estudados, inclusive no grupo controle. Tal fato sugere um possível efeito do ato cirúrgico e da anestesia geral na função mitocondrial e não efeito da sepse propriamente dita. No entanto, mesmo após adequadamente ressuscitados, observamos redução da respiração mitocondrial cerebral máxima dependente do Complexo II no grupo de animais em que as manobras de ressuscitação foram iniciadas tardiamente, após 24 horas de evolução da peritonite fecal.

A presença de disfunção mitocondrial cerebral foi observada em um modelo experimental em ratos submetidos a 24 horas de sepse sem tratamento⁶³. Neste estudo, o foco da sepse também foi peritonite fecal, porém induzida através da ligadura cecal e punção⁶³. Foram descritos ainda neste estudo evidências de extravazamento de prótons através da membrana mitocondrial interna e a redução do conteúdo e da atividade dos citocromos da cadeia respiratória⁶³. Foram demonstrados em modelos experimentais de sepse em ratos, semelhantes ao descrito anteriormente, redução da atividade do Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial no cérebro, redução da atividade da enzima succinato desidrogenase⁶⁷ e o aumento da apoptose em neurônios do hipocampo e cerebelo⁶⁸. Devido ao fato de outros aspectos da

função mitocondrial não terem sido avaliados em nosso estudo, nós não podemos propor explicações fisiopatológicas para os possíveis mecanismos envolvidos na disfunção mitocondrial cerebral encontrada em nosso estudo.

Em contraste com a respiração mitocondrial cerebral, a respiração mitocondrial hepática e no miocárdio do ventrículo esquerdo permaneceram inalteradas. Resultados obtidos em outros estudos experimentais têm demonstrado diferenças órgão-específicas na respiração mitocondrial durante a sepse^{60,69-71}. Foram descritos redução da respiração mitocondrial no coração, mas não nos rins⁷⁰, no fígado, mas não no coração⁷², no fígado, mas não nos rins e músculo esquelético⁶⁰, ou na mucosa do intestino delgado, mas não na sua camada muscular⁶⁹.

Alguns mecanismos têm sido propostos com o intuito de explicar os resultados conflitantes obtidos e descritos anteriormente sobre as alterações da função mitocondrial na sepse⁷³. Acredita-se que um dos principais fatores responsáveis sejam as variações observadas nos diferentes modelos experimentais utilizados para reproduzir a sepse humana no laboratório⁷³. Essas variações incluem o modelo utilizado para indução da sepse, como a exposição a exotoxinas^{23,25,71}, a peritonite fecal induzida através da instilação de fezes no interior da cavidade peritoneal^{35,42,59} ou por ligadura cecal e punção^{58,74}. A atividade mitocondrial também parece ser influenciada pelas espécies utilizadas para investigação, variando desde seres humanos¹⁶ a porcos^{23,25,42}, ratos^{58,59,66,74} e coelhos⁷⁵. É provável ainda que a utilização de anestesia geral^{76,77}, a ressuscitação hídrica e com vasopressores^{23,25,35,42,59} e o tempo decorrido entre a indução da sepse e a coleta das amostras de tecido para análise da atividade mitocondrial também possuam grande relevância.

Os métodos utilizados para preparo das amostras, incluindo a utilização de mitocôndrias isoladas³⁴ ou células intactas permeabilizadas³⁹, os métodos utilizados para isolamento das mitocôndrias nos tecidos, destacando-se o método de Percoll^{74,78} e a centrifugação diferencial^{35,42,60,79}, e finalmente, a mensuração do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias através da respirometria de alta resolução^{23,35,42} e do eletrodo de oxigênio tipo Clark^{25,58}

possam também explicar, ainda que parcialmente, as variações observadas nos diferentes modelos experimentais.

Nós observamos ao término do estudo redução dos níveis musculares de ATP em todos os grupos sépticos avaliados. Entretanto, os níveis mais baixos de ATP foram observados nos grupos ressuscitados após 12 e 24 horas da indução da peritonite fecal. Uma vez que o conteúdo de ATP não foi relacionado à massa seca, o ganho significativo de peso em todos os animais sépticos, como resultado da administração de fluidos de manutenção (Ringer Lactato e glicose 50%) e fluídos para ressuscitação, pode ter confundido nossos resultados. Uma redução de aproximadamente 15% no conteúdo de ATP muscular foi descrita durante anestesia de longa duração em animais saudáveis⁷⁷, possivelmente associada à perfusão reduzida da musculatura esquelética durante o período de anestesia^{76,77}. No entanto, foi descrita redução da concentração de ATP tecidual em modelos experimentais de sepse em roedores^{59,80} e em porcos⁷², possivelmente, em consequência da deficiência de substratos, do aumento da hidrólise de ATP e redução da densidade mitocondrial ^{59,72,80}.

Foi observada redução da atividade dos Complexos mitocondriais I e IV nos músculos vasto lateral e intercostal, assim como redução da concentração muscular de ATP em pacientes graves em ventilação mecânica e com disfunção de múltiplos órgãos induzida pela sepse⁶⁵. Curiosamente, as alterações na atividade destes complexos da cadeia respiratória estavam presentes apenas quando expressas por massa muscular magra e não quando expressas pela atividade da enzima citrato sintase, sugerindo redução da densidade mitocondrial e não inibição específica dos complexos mitocondriais avaliados⁶⁵.

A redução da densidade mitocondrial poderia explicar os resultados obtidos em nosso estudo, no qual observamos nos grupos submetidos à ressuscitação tardia (ΔT -12h e ΔT -24h), manutenção da respiração mitocondrial no músculo esquelético associado à redução das concentrações ATP neste tecido, em comparação aos animais do grupo controle. Todavia, no seu conjunto, os dados experimentais disponíveis na literatura sugerem que as concentrações de ATP tecidual diminuem durante a sepse, provavelmente de modo

dependente da gravidade da lesão instalada e do tipo de tratamento instituído, com uma variabilidade significativa entre as espécies e modelos estudados.

A extrapolação dos resultados obtidos em modelos experimentais de sepse para a prática clínica deve ser feita com muita cautela, particularmente quando os modelos experimentais utilizados diferem do cenário clínico da sepse em humanos⁸¹. De modo geral, podemos afirmar que as duas principais limitações dos estudos experimentais em sepse são curto tempo decorrido entre a indução da sepse e o início das manobras de ressuscitação e a não incorporação no modelo experimental das terapias padronizadas para o seu tratamento^{82,83}, como por exemplo, as recomendações da Campanha Sobrevivendo a Sepse³. Os estudos experimentais em sepse têm focado principalmente em modelos de curta duração, ou seja, com duração inferior a 24 horas, com breve exposição à peritonite⁸⁴⁻⁸⁶ ou em modelos nos quais as medidas de ressuscitação são iniciadas imediatamente após a indução de peritonite^{42,44,64,87-89}, utilizando diferentes critérios para administração de líquidos e catecolaminas^{44,87,90}. Sabe-se que a sepse em seres humanos se desenvolve tipicamente ao longo de dias¹², e que os órgãos e sistemas entram em disfunção e falência em períodos distintos da evolução da doença⁹¹. Sendo assim, modelos experimentais de sepse com duração inferior a 24 horas representam um modelo com fisiopatologia distinta da doença em humanos, não refletindo integralmente sua complexidade.

A escolha cautelosa das espécies de animais a serem utilizadas nos modelos de sepse também é de importância primordial. Deve-se dar preferência a animais de grande porte como, por exemplo, porcos e ovelhas, pelo fato de possuírem anatomia e fisiologia mais próximas dos seres humanos além de permitirem a instalação de monitorização hemodinâmica completa^{82,83}. Em relação às espécies de pequeno porte como camundongos, ratos e coelhos, embora utilizados com frequência, elas não permitem a instituição de monitorização hemodinâmica plena e, frequentemente, não permitem que as medidas de ressuscitação preconizadas em seres humanos sejam aplicadas integralmente no modelo estudado, gerando assim resultados passíveis de erro⁸¹.

Nós objetivamos reproduzir neste modelo experimental de sepse um ambiente de terapia intensiva semelhante ao utilizado com seres humanos na prática clínica. Para tanto, médicos intensivistas treinados realizaram as manobras de ressuscitação, 24 horas por dia, utilizando algoritmos de ressuscitação protocolados, incluindo a administração de antibióticos de amplo espectro na primeira hora do tratamento, administração de fluidos, noradrenalina, dobutamina, cuidados respiratórios, controle rigoroso da glicemia e profilaxia para trombose venosa profunda³.

Todavia, este estudo possui limitações. Em primeiro lugar, vale destacar que nós utilizamos neste modelo experimental de peritonite fecal apenas animais jovens, saudáveis e sem comorbidades, o que difere significativamente da população de pacientes sépticos, frequentemente idosos e com múltiplas comorbidades, incluídos nos estudos clínicos^{8,9}.

Nosso algoritmo para suporte hemodinâmico contemplou a utilização de hidroxietilamido (HES) 130/04 para restabelecimento da volemia dos animais. Entretanto, na época em que este estudo foi conduzido, recomendava-se a utilização de cristaloides ou colóides para ressuscitação de pacientes com sepse grave ou choque séptico⁹². Estudos clínicos randomizados^{93,94} e metanálises^{95,96} publicadas posteriormente demonstraram que a utilização de colóides sintéticos, como o hidroxietilamido 130/04, está associada a maior incidência de disfunção renal e mortalidade nesta população de pacientes. Desta forma, é possível que a maior exposição ao hidroxietilamido no grupo $\Delta T-24h$ possa ter contribuído para a maior incidência de disfunção renal e para maior mortalidade neste grupo. Nós adotamos o limite inferior da saturação venosa mista de oxigênio de 50%, enquanto que nos estudos clínicos^{28,29} e nas recomendações da Campanha Sobrevivendo a Sepse³, recomenda-se o valor de 65%. Esta adaptação foi necessária uma vez que os níveis de hemoglobina em suínos jovens são relativamente inferiores ao de pacientes adultos⁸⁶.

A utilização de ventilação mecânica invasiva, sedação contínua e a administração basal de fluidos durante o desenvolvimento da peritonite fecal sem tratamento pode ter modulado a fisiopatologia da sepse neste modelo experimental. O ato cirúrgico e a anestesia prolongada podem por si só induzir

alterações hemodinâmicas, interferindo com a função orgânica e com a respiração mitocondrial^{76,77}. Entretanto, para que se possam utilizar modelos experimentais de longa duração, com animais de grande porte, com monitorização hemodinâmica adequada, que permitam amostragens repetidas de sangue e tecidos, torna-se imprescindível que os animais estejam sedados e, principalmente, que estejam recebendo analgesia adequadamente.

Nós avaliamos a função mitocondrial através do consumo de oxigênio pelos complexos I, II e IV, não sendo avaliados outros aspectos importantes da função mitocondrial. Além disso, mensuramos o ATP apenas no músculo esquelético, em relação a sua massa úmida e não seca⁶⁵. Nós escolhemos esta metodologia por razões práticas, incluindo a viabilidade da realização de repetidas amostragens nos animais.

Devido aos diferentes períodos de sepse sem tratamento com seus respectivos intervalos de tempo para coleta de amostras de sangue e tecidos, não foi possível cegar os investigadores em relação aos quatro grupos estudados. Todavia, uma vez que todos os animais foram monitorados e ressuscitados de acordo com o mesmo protocolo de tratamento, acreditamos que as consequências desta limitação na validade dos nossos resultados tenha sido mínima. Finalmente, foi estudado um pequeno número de animais. Portanto, existe possibilidade de termos cometido erros dos tipos I e II. Pesquisas experimentais futuras devem, portanto, ponderar estes fatos na determinação do tamanho da amostra a ser estudada.

6. CONCLUSÃO

Em nosso modelo de peritonite fecal, o intervalo de tempo inferior a doze horas entre o início da sepse e o início das manobras de ressuscitação reduziu a intensidade da resposta inflamatória, a gravidade das disfunções orgânicas e mitocondrial cerebral, preservou os níveis de ATP na musculatura esquelética e reduziu a mortalidade.

O tempo transcorrido entre a indução da peritonite fecal e o início da ressuscitação teve impacto significativo na intensidade do tratamento necessário para o restabelecimento da estabilidade hemodinâmica, com necessidades crescentes de fluídos e vasopressores. O impacto da maior exposição a fluídos e vasopressores no desfecho dos pacientes com sepse grave e choque séptico precisa ser avaliado em estudos futuros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med*. 2007 May;35(5):1244-50.
2. Weycker D, Akhras KS, Edelsberg J, Angus DC, Oster G. Long-term mortality and medical care charges in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2003 Sep;31(9):2316-23.
3. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*. 2013 Feb;41(2):580-637.
4. Solomkin JS, Mazuski JE, Bradley JS, Rodvold KA, Goldstein EJ, Baron EJ, et al. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. *Surg Infect (Larchmt)*. 2010 Feb;11(1):79-109.
5. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7):1303-10.
6. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7 Suppl):S109-S116.
7. Silva E, Pedro MA, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*. 2004 Aug;8(4):R251-R260.
8. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*. 2006 Feb;34(2):344-53.
9. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 2009 Dec 2;302(21):2323-9.
10. Beale R, Reinhart K, Brunkhorst FM, Dobb G, Levy M, Martin G, et al. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. *Infection*. 2009 Jun;37(3):222-32.
11. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002 Dec 19;420(6917):885-91.

* De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

12. Russell JA, Singer J, Bernard GR, Wheeler A, Fulkerson W, Hudson L, et al. Changing pattern of organ dysfunction in early human sepsis is related to mortality. *Crit Care Med*. 2000 Oct;28(10):3405-11.
13. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med*. 2007 Oct;35(10):2408-16.
14. Ospina-Tascon G, Neves AP, Occhipinti G, Donadello K, Buchele G, Simion D, et al. Effects of fluids on microvascular perfusion in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med*. 2010 Jun;36(6):949-55.
15. Vincent JL, De BD. Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. *Crit Care*. 2005;9 Suppl 4:S9-12.
16. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*. 2002 Jul 20;360(9328):219-23.
17. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003 Jan 9;348(2):138-50.
18. Wiedemann HP, Wheeler AP, Bernard GR, Thompson BT, Hayden D, deBoisblanc B, et al. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. *N Engl J Med*. 2006 Jun 15;354(24):2564-75.
19. Murphy CV, Schramm GE, Doherty JA, Reichley RM, Gajic O, Afessa B, et al. The importance of fluid management in acute lung injury secondary to septic shock. *Chest*. 2009 Jul;136(1):102-9.
20. Dart AB, Mutter TC, Ruth CA, Taback SP. Hydroxyethyl starch (HES) versus other fluid therapies: effects on kidney function. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(1):CD007594.
21. Prowle JR, Bellomo R. Fluid administration and the kidney. *Curr Opin Crit Care*. 2010 Aug;16(4):332-6.
22. Rivers EP, Jaehne AK, Eichhorn-Wharry L, Brown S, Amponsah D. Fluid therapy in septic shock. *Curr Opin Crit Care*. 2010 Jul 1;
23. Regueira T, Banziger B, Djafarzadeh S, Brandt S, Gorrasi J, Takala J, et al. Norepinephrine to increase blood pressure in endotoxaemic pigs is associated with improved hepatic mitochondrial respiration. *Crit Care*. 2008;12(4):R88.
24. Dunser MW, Ruokonen E, Pettila V, Ulmer H, Torgersen C, Schmittinger CA, et al. Association of arterial blood pressure and vasopressor load with septic shock mortality: a post hoc analysis of a multicenter trial. *Crit Care*. 2009;13(6):R181.
25. Porta F, Bracht H, Weikert C, Beck M, Takala J, Brandt S, et al. Effects of endotoxin and catecholamines on hepatic mitochondrial respiration. *Inflammation*. 2009 Oct;32(5):315-21.
26. De Backer D, Biston P, Devriendt J, Madl C, Chochrad D, Aldecoa C, et al. Comparison of dopamine and norepinephrine in the treatment of shock. *N Engl J Med*. 2010 Mar 4;362(9):779-89.

27. De Backer D, Aldecoa C, Njimi H, Vincent JL. Dopamine versus norepinephrine in the treatment of septic shock: A meta-analysis*. *Crit Care Med*. 2012 Mar;40(3):725-30.
28. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2001 Nov 8;345(19):1368-77.
29. Lin SM, Huang CD, Lin HC, Liu CY, Wang CH, Kuo HP. A modified goal-directed protocol improves clinical outcomes in intensive care unit patients with septic shock: a randomized controlled trial. *Shock*. 2006 Dec;26(6):551-7.
30. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*. 2006 Jun;34(6):1589-96.
31. Gaieski DF, Mikkelsen ME, Band RA, Pines JM, Massone R, Furia FF, et al. Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency department. *Crit Care Med*. 2010 Apr;38(4):1045-53.
32. Corrêa TD, Vuda M, Blaser AR, Takala J, Djafarzadeh S, Dunser MW, et al. Effect of treatment delay on disease severity and need for resuscitation in porcine fecal peritonitis. *Crit Care Med*. 2012 Oct;40(10):2841-9.
33. Corrêa TD, Vuda M, Takala J, Djafarzadeh S, Silva E, Jakob SM. Increasing mean arterial blood pressure in sepsis: effects on fluid balance, vasopressor load and renal function. *Crit Care*. 2013 Jan 30;17(1):R21.
34. Hoppel CL, Kerr DS, Dahms B, Roessmann U. Deficiency of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase component of complex I of mitochondrial electron transport. Fatal infantile lactic acidosis and hypermetabolism with skeletal-cardiac myopathy and encephalopathy. *J Clin Invest*. 1987 Jul;80(1):71-7.
35. Vuda M, Brander L, Schroder R, Jakob SM, Takala J, Djafarzadeh S. Effects of catecholamines on hepatic and skeletal muscle mitochondrial respiration after prolonged exposure to faecal peritonitis in pigs. *Innate Immun*. 2012;18(2):217-30.
36. Boehm EA, Jones BE, Radda GK, Veech RL, Clarke K. Increased uncoupling proteins and decreased efficiency in palmitate-perfused hyperthyroid rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Mar;280(3):H977-H983.
37. Saks VA, Kuznetsov AV, Kupriyanov VV, Miceli MV, Jacobus WE. Creatine kinase of rat heart mitochondria. The demonstration of functional coupling to oxidative phosphorylation in an inner membrane-matrix preparation. *J Biol Chem*. 1985 Jun 25;260(12):7757-64.

38. Vilela SM, Santos DJ, Felix L, Almeida JM, Antunes L, Peixoto F. Are fentanyl and remifentanyl safe opioids for rat brain mitochondrial bioenergetics? *Mitochondrion*. 2009 Jul;9(4):247-53.
39. Kuznetsov AV, Mayboroda O, Kunz D, Winkler K, Schubert W, Kunz WS. Functional imaging of mitochondria in saponin-permeabilized mice muscle fibers. *J Cell Biol*. 1998 Mar 9;140(5):1091-9.
40. Gnaiger E, kuznetsov AV, Schneeberger S, Seiler R, Brandacher G, Steurer W, et al. Mitochondria in the cold. In: Heldmaier G, Klingenspor M, editors. Life in the cold. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York; 2000. p. 431-42.
41. Hildebrand LB, Krejci V, Jakob SM, Takala J, Sigurdsson GH. Effects of vasopressin on microcirculatory blood flow in the gastrointestinal tract in anesthetized pigs in septic shock. *Anesthesiology*. 2007 Jun;106(6):1156-67.
42. Brandt S, Regueira T, Bracht H, Porta F, Djafarzadeh S, Takala J, et al. Effect of fluid resuscitation on mortality and organ function in experimental sepsis models. *Crit Care*. 2009;13(6):R186.
43. Regueira T, Djafarzadeh S, Brandt S, Gorrasi J, Borotto E, Porta F, et al. Oxygen transport and mitochondrial function in porcine septic shock, cardiogenic shock, and hypoxaemia. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2012 Aug;56(7):846-59.
44. Chvojka J, Sykora R, Krouzecky A, Radej J, Varnerova V, Karvunidis T, et al. Renal haemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathological responses to peritonitis-induced septic shock in pigs. *Crit Care*. 2008;12(6):R164.
45. Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. *ALTEX*. 2002;19(2):73-8.
46. Turnbull IR, Javadi P, Buchman TG, Hotchkiss RS, Karl IE, Coopersmith CM. Antibiotics improve survival in sepsis independent of injury severity but do not change mortality in mice with markedly elevated interleukin 6 levels. *Shock*. 2004 Feb;21(2):121-5.
47. Kumar A, Haery C, Paladugu B, Kumar A, Symeonides S, Taiberg L, et al. The duration of hypotension before the initiation of antibiotic treatment is a critical determinant of survival in a murine model of Escherichia coli septic shock: association with serum lactate and inflammatory cytokine levels. *J Infect Dis*. 2006 Jan 15;193(2):251-8.
48. Larche J, Azoulay E, Fieux F, Mesnard L, Moreau D, Thiery G, et al. Improved survival of critically ill cancer patients with septic shock. *Intensive Care Med*. 2003 Oct;29(10):1688-95.
49. Bellomo R, Cass A, Cole L, Finfer S, Gallagher M, Lee J, et al. An observational study fluid balance and patient outcomes in the Randomized Evaluation of Normal vs. Augmented Level of Replacement Therapy trial. *Crit Care Med*. 2012 Jun;40(6):1753-60.

50. Boyd JH, Forbes J, Nakada TA, Walley KR, Russell JA. Fluid resuscitation in septic shock: a positive fluid balance and elevated central venous pressure are associated with increased mortality. *Crit Care Med*. 2011 Feb;39(2):259-65.
51. De Almeida JP, Palomba H, Galas FR, Fukushima JT, Duarte FA, Nagaoka D, et al. Positive fluid balance is associated with reduced survival in critically ill patients with cancer. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2012 Jul;56(6):712-7.
52. Dunser MW, Ruokonen E, Pettila V, Ulmer H, Torgersen C, Schmittinger CA, et al. Association of arterial blood pressure and vasopressor load with septic shock mortality: a post hoc analysis of a multicenter trial. *Crit Care*. 2009;13(6):R181.
53. Pova P, Carneiro AH, Ribeiro OS, Pereira AC. Influence of vasopressor agent in septic shock mortality. Results from the Portuguese Community-Acquired Sepsis Study (SACiUCI study). *Crit Care Med*. 2009 Feb;37(2):410-6.
54. Rosenberg AL, Dechert RE, Park PK, Bartlett RH. Review of a large clinical series: association of cumulative fluid balance on outcome in acute lung injury: a retrospective review of the ARDSnet tidal volume study cohort. *J Intensive Care Med*. 2009 Jan;24(1):35-46.
55. Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Sugihara M, French C, Stephens D, et al. Pulmonary artery catheter versus pulse contour analysis: a prospective epidemiological study. *Crit Care*. 2006;10(6):R174.
56. Di Giandomenico D, May CN, Bellomo R. Norepinephrine and vital organ blood flow during experimental hyperdynamic sepsis. *Intensive Care Med*. 2003 Oct;29(10):1774-81.
57. Di Giandomenico D, Bellomo R, May CN. The haemodynamic and metabolic effects of epinephrine in experimental hyperdynamic septic shock. *Intensive Care Med*. 2005 Mar;31(3):454-62.
58. Taylor DE, Ghio AJ, Piantadosi CA. Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Arch Biochem Biophys*. 1995 Jan 10;316(1):70-6.
59. Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, et al. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 Mar;286(3):R491-R497.
60. Porta F, Takala J, Weikert C, Bracht H, Kolarova A, Lauterburg BH, et al. Effects of prolonged endotoxemia on liver, skeletal muscle and kidney mitochondrial function. *Crit Care*. 2006;10(4):R118.
61. Kozlov AV, van GM, Haindl S, Calzia E, Redl H, Ohlinger W, et al. Organ Specific Relationship Between Mitochondrial Function and Tissue Damage in A Model of Peritonitis in Pigs. *Shock*. 2006 Oct 1;26(4 Supplement 1):p 31.
62. Singer M. Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure. *Crit Care Med*. 2007 Sep;35(9 Suppl):S441-S448.

63. d'Avila JC, Santiago AP, Amancio RT, Galina A, Oliveira MF, Bozza FA. Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction. *Crit Care Med*. 2008 Jun;36(6):1925-32.
64. Kozlov AV, van GM, Haindl S, Kehrer I, Duvigneau JC, Hartl RT, et al. Peritoneal inflammation in pigs is associated with early mitochondrial dysfunction in liver and kidney. *Inflammation*. 2010 Oct;33(5):295-305.
65. Fredriksson K, Hammarqvist F, Strigard K, Hultenby K, Ljungqvist O, Wernerman J, et al. Derangements in mitochondrial metabolism in intercostal and leg muscle of critically ill patients with sepsis-induced multiple organ failure. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 Nov;291(5):E1044-E1050.
66. Geller ER, Jankauskas S, Kirkpatrick J. Mitochondrial death in sepsis: a failed concept. *J Surg Res*. 1986 May;40(5):514-7.
67. Comim CM, Rezin GT, Scaini G, Di-Pietro PB, Cardoso MR, Petronilho FC, et al. Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Mitochondrion*. 2008 Sep;8(4):313-8.
68. Messaris E, Memos N, Chatzianni E, Konstadoulakis MM, Menenakos E, Katsaragakis S, et al. Time-dependent mitochondrial-mediated programmed neuronal cell death prolongs survival in sepsis. *Crit Care Med*. 2004 Aug;32(8):1764-70.
69. Revelly JP, Liaudet L, Frascarolo P, Joseph JM, Martinet O, Markert M. Effects of norepinephrine on the distribution of intestinal blood flow and tissue adenosine triphosphate content in endotoxic shock. *Crit Care Med*. 2000 Jul;28(7):2500-6.
70. Fukumoto K, Pierro A, Spitz L, Eaton S. Neonatal endotoxemia affects heart but not kidney bioenergetics. *J Pediatr Surg*. 2003 May;38(5):690-3.
71. Kozlov AV, Staniek K, Haindl S, Piskernik C, Ohlinger W, Gille L, et al. Different effects of endotoxic shock on the respiratory function of liver and heart mitochondria in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Mar;290(3):G543-G549.
72. Hart DW, Gore DC, Rinehart AJ, Asimakis GK, Chinkes DL. Sepsis-induced failure of hepatic energy metabolism. *J Surg Res*. 2003 Nov;115(1):139-47.
73. Jeger V, Djafarzadeh S, Jakob SM, Takala J. Mitochondrial function in sepsis. *Eur J Clin Invest*. 2013 May;43(5):532-42.
74. Taylor DE, Kantrow SP, Piantadosi CA. Mitochondrial respiration after sepsis and prolonged hypoxia. *Am J Physiol*. 1998 Jul;275(1 Pt 1):L139-L144.
75. Trumbeckaite S, Opalka JR, Neuhof C, Zierz S, Gellerich FN. Different sensitivity of rabbit heart and skeletal muscle to endotoxin-induced impairment of mitochondrial function. *Eur J Biochem*. 2001 Mar;268(5):1422-9.

76. Goetz TE, Manohar M, Nganwa D, Gustafson R. A study of the effect of isoflurane anaesthesia on equine skeletal muscle perfusion. *Equine Vet J Suppl.* 1989 Jun;(7):133-7.
77. Edner A, Essen-Gustavsson B, Nyman G. Muscle metabolic changes associated with long-term inhalation anaesthesia in the horse analysed by muscle biopsy and microdialysis techniques. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2005 Mar;52(2):99-107.
78. Kantrow SP, Taylor DE, Carraway MS, Piantadosi CA. Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Arch Biochem Biophys.* 1997 Sep 15;345(2):278-88.
79. Crouser ED, Julian MW, Blaho DV, Pfeiffer DR. Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. *Crit Care Med.* 2002 Feb;30(2):276-84.
80. Huang LJ, Hsu C, Tsai TN, Wang SJ, Yang RC. Suppression of mitochondrial ATPase inhibitor protein (IF1) in the liver of late septic rats. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jul;1767(7):888-96.
81. Dyson A, Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med.* 2009 Jan;37(1 Suppl):S30-S37.
82. Goldfarb RD, Dellinger RP, Parrillo JE. Porcine models of severe sepsis: emphasis on porcine peritonitis. *Shock.* 2005 Dec;24 Suppl 1:75-81.
83. Marshall JC, Deitch E, Moldawer LL, Opal S, Redl H, van der Poll T. Preclinical models of shock and sepsis: what can they tell us? *Shock.* 2005 Dec;24 Suppl 1:1-6.
84. Hildebrand LB, Krejci V, Banic A, Erni D, Wheatley AM, Sigurdsson GH. Dynamic study of the distribution of microcirculatory blood flow in multiple splanchnic organs in septic shock. *Crit Care Med.* 2000 Sep;28(9):3233-41.
85. Hildebrand LB, Krejci V, tenHoevel ME, Banic A, Sigurdsson GH. Redistribution of microcirculatory blood flow within the intestinal wall during sepsis and general anesthesia. *Anesthesiology.* 2003 Mar;98(3):658-69.
86. Krejci V, Hildebrand LB, Erni D, Sigurdsson GH. Endothelin receptor antagonist bosentan improves microcirculatory blood flow in splanchnic organs in septic shock. *Crit Care Med.* 2003 Jan;31(1):203-10.
87. Simon F, Giudici R, Scheuerle A, Groger M, Asfar P, Vogt JA, et al. Comparison of cardiac, hepatic, and renal effects of arginine vasopressin and noradrenaline during porcine fecal peritonitis: a randomized controlled trial. *Crit Care.* 2009;13(4):R113.
88. Hauser B, Barth E, Bassi G, Simon F, Groger M, Oter S, et al. Hemodynamic, metabolic, and organ function effects of pure oxygen ventilation during established fecal peritonitis-induced septic shock. *Crit Care Med.* 2009 Aug;37(8):2465-9.

89. Taccone FS, Su F, Pierrakos C, He X, James S, Dewitte O, et al. Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: an experimental study. *Crit Care*. 2010 Jul 28;14(4):R140.
90. Barth E, Bassi G, Maybauer DM, Simon F, Groger M, Oter S, et al. Effects of ventilation with 100% oxygen during early hyperdynamic porcine fecal peritonitis. *Crit Care Med*. 2008 Feb;36(2):495-503.
91. Moreno R, Vincent JL, Matos R, Mendonca A, Cantraine F, Thijs L, et al. The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. Working Group on Sepsis related Problems of the ESICM. *Intensive Care Med*. 1999 Jul;25(7):686-96.
92. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med*. 2008 Jan;36(1):296-327.
93. Perner A, Haase N, Guttormsen AB, Tenhunen J, Klemenzson G, Aneman A, et al. Hydroxyethyl starch 130/0.42 versus Ringer's acetate in severe sepsis. *N Engl J Med*. 2012 Jul 12;367(2):124-34.
94. Myburgh JA, Finfer S, Bellomo R, Billot L, Cass A, Gattas D, et al. Hydroxyethyl starch or saline for fluid resuscitation in intensive care. *N Engl J Med*. 2012 Nov 15;367(20):1901-11.
95. Haase N, Perner A, Hennings LI, Siegemund M, Lauridsen B, Wetterslev M, et al. Hydroxyethyl starch 130/0.38-0.45 versus crystalloid or albumin in patients with sepsis: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *BMJ*. 2013;346:f839.
96. Zarychanski R, Abou-Setta AM, Turgeon AF, Houston BL, McIntyre L, Marshall JC, et al. Association of hydroxyethyl starch administration with mortality and acute kidney injury in critically ill patients requiring volume resuscitation: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2013 Feb 20;309(7):678-88.

ANEXO 1. Aprovação do estudo pelo Comitê de Estudos com Animais do Departamento de Agricultura e Natureza do Cantão de Berna e pelo Serviço Veterinário Secretaria de Estudos com Animais do Cantão de Berna, Suíça

Amt für Landwirtschaft
und Natur
des Kantons Bern

Office de l'agriculture et de la
nature
du canton de Berne

Veterinärdienst
Sekretariat Tierversuche
jacques.voland@vol.be.ch

Service vétérinaire
Secrétariat pour les
expériences sur animaux

Herrengasse 1
3011 Bern
Telefon 031 633 52 63
Telefax 031 633 52 65

Herr
Prof. Dr. med. Stephan Jakob
Universitätsklinik für Intensivmedizin,
Inselspital
Freiburgstrasse
3010 Bern

Bern, 12.10.2009

Tierversuche / Bewilligung Nr. 88/09

Sehr geehrter Herr Jakob



Gestützt auf den Antrag der Kommission für Tierversuche konnte Ihr Gesuch vom 01.09.2009 bewilligt werden. In der Beilage erhalten Sie die entsprechende Bewilligung sowie eine Kopie Ihres Gesuches.

Diese Bewilligung stellt eine Verfügung im Sinne von Artikel 49 des Gesetzes vom 23. Mai 1989 über die Verwaltungsrechtspflege dar, gegen die innert 30 Tagen seit Eröffnung bei der Volkswirtschaftsdirektion schriftlich und begründet Beschwerde (im Doppel) erhoben werden kann.

Wir möchten Sie darauf hinweisen, dass Sie aufgrund des Behördenbeschwerderechts des Bundesamtes für Veterinärwesen (siehe Art. 25. Abs. 1 des Eidgenössischen Tierschutzgesetzes vom 16. Dezember 2005), erst 30 Tage nach Erhalt der Bewilligung mit den Tierversuchen beginnen können, sofern bis dahin kein Rekurs eingereicht wurde.

Die Gebühr pro Tierversuchsbewilligung beträgt Fr. 300.- und wird auch für kantonale Institutionen (Universitätsinstitute und -kliniken) erhoben. Wir bitten um Überweisung der Bewilligungsgebühr von Fr. 300.- innert 30 Tagen. Rechnung folgt.



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit.

Mit freundlichen Grüssen

J. Voland

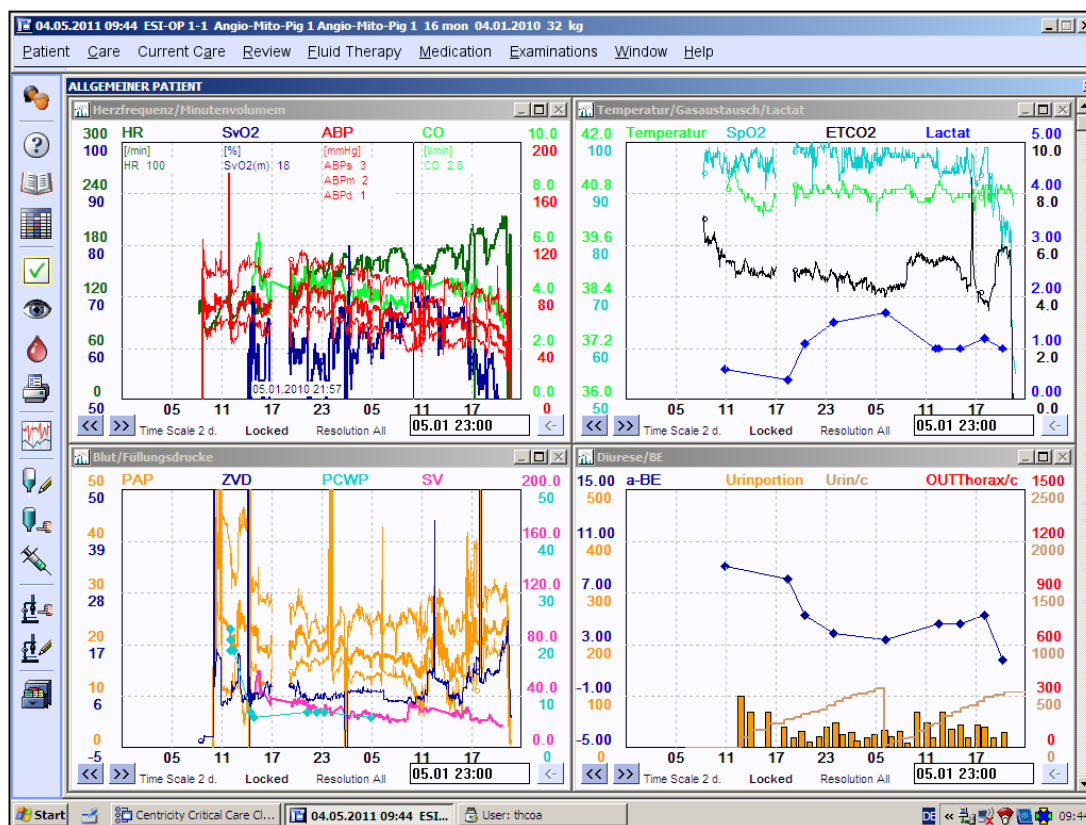
Beilagen erwähnt

ANEXO 1 (continuação). Aprovação do estudo pelo Comitê de Estudos com Animais do Departamento de Agricultura e Natureza do Cantão de Berna e pelo Serviço Veterinário Secretaria de Estudos com Animais do Cantão de Berna, Suíça

	Nr. 88/09 Fortsetzungsgesuch zu Nr. Ergänzungsgesuch zur Nr. 1 Adresse Gesuchsteller/in								
Tierversuche Form. B Bewilligung / Entscheid der Behörde <small>(Art. 18 Abs. 1 Eidg. Tierschutzgesetz, TSchG; Art. 139 bis 62 Eidg. Tierschutzverordnung, TSchV)</small>	Prof. Dr. med. Stephan Jakob Universitätsklinik für Intensivmedizin, Inselspital Freiburgstrasse 3010 Bern								
Kurztitel: Time to resuscitation, hemodynamic targets and angiotensin: effects on mitochondrial function and outcome in experimental sepsis									
2 ENTSCHEID, BEDINGUNGEN UND AUFLAGEN 21 Über das beiliegende Gesuch wird wie folgt entschieden: <input type="checkbox"/> Gesuch nicht belastender Versuch bewilligt <input type="checkbox"/> Gesuch belastender Versuch ohne Einschränkungen bewilligt <input checked="" type="checkbox"/> Gesuch belastender Versuch mit folgenden Einschränkungen bewilligt, siehe Ziffern 22 und 23 <input type="checkbox"/> Gesuch abgelehnt, Begründung siehe Beilage 22 Folgende Bedingungen und Auflagen bilden Bestandteil der Bewilligung: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td><input type="checkbox"/> Tierart und Anzahl Tiere</td> <td><input type="checkbox"/> Haltung und Fütterung (Auslauf, Gruppenhaltung, Beschäftigung etc.)</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Herkunft und Wiederverwendung der Tiere</td> <td><input type="checkbox"/> Angewöhnung, Überwachung und Pflege der Tiere</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Prüfung von Alternativmethoden</td> <td><input type="checkbox"/> Methode (Änderung des Modells, Schmerzmittel, Tötungsart, Parameter, etc.)</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Personelle Voraussetzungen</td> <td><input type="checkbox"/> Durchführung eines Pilotversuchs (mit Datum melden)</td> </tr> </table> Beschreibung: Auflage: Herr Dr. med. Thiago Domingos Correa und Herr Dr. med. Fritz Daudel haben die ausstehende Ausbildung in Labortierkunde (LTK 1/LTK 20E) innerhalb von 9 Monaten zu absolvieren, den Nachweis dem Veterinärdienst zu erbringen und müssen bis dahin unter direkter Aufsicht einer behördlich anerkannten Person arbeiten. 23 Abweichungen von den Haltungsvorschriften (Art, Dauer), Vorschriften über die Herkunft der Tiere und Vorschriften betreffend Ausbildung beteiligter Personen gemäss Tierschutzverordnung werden wie folgt bewilligt:		<input type="checkbox"/> Tierart und Anzahl Tiere	<input type="checkbox"/> Haltung und Fütterung (Auslauf, Gruppenhaltung, Beschäftigung etc.)	<input type="checkbox"/> Herkunft und Wiederverwendung der Tiere	<input type="checkbox"/> Angewöhnung, Überwachung und Pflege der Tiere	<input type="checkbox"/> Prüfung von Alternativmethoden	<input type="checkbox"/> Methode (Änderung des Modells, Schmerzmittel, Tötungsart, Parameter, etc.)	<input checked="" type="checkbox"/> Personelle Voraussetzungen	<input type="checkbox"/> Durchführung eines Pilotversuchs (mit Datum melden)
<input type="checkbox"/> Tierart und Anzahl Tiere	<input type="checkbox"/> Haltung und Fütterung (Auslauf, Gruppenhaltung, Beschäftigung etc.)								
<input type="checkbox"/> Herkunft und Wiederverwendung der Tiere	<input type="checkbox"/> Angewöhnung, Überwachung und Pflege der Tiere								
<input type="checkbox"/> Prüfung von Alternativmethoden	<input type="checkbox"/> Methode (Änderung des Modells, Schmerzmittel, Tötungsart, Parameter, etc.)								
<input checked="" type="checkbox"/> Personelle Voraussetzungen	<input type="checkbox"/> Durchführung eines Pilotversuchs (mit Datum melden)								
3 BERICHTE UND VERSUCHSÄNDERUNGEN (Art. 145 TSchV) 31 Der/die verantwortliche Bereichsleiter/in hat den Abschluss des Versuchs mit dem Formular C innert zwei Monaten zu melden. Bei mehrjährigen Versuchen hat die Mitteilung mit den entsprechenden Angaben für das abgelaufene Kalenderjahr bis spätestens Ende Februar zu erfolgen. 32 Bevor Abweichungen vom Versuch gemäss Angaben in den Ziffern 4-10 des Gesuchs und Ziffer 2 dieser amtlichen Bewilligung/Entscheidung vorgenommen werden (wie Änderung von Methode und Versuchsdauer, Einbeziehen anderer Tierarten, Erhöhung der Tierzahlen, Wechsel von Personal), ist bei der Bewilligungsstelle eine Ergänzungsbewilligung einzuholen.									
4 ABLAUF DER GÜLTIGKEIT (Art. 141 Abs. 2 TSchV) 31. Oktober 2012	5 BEWILLIGUNGSGEBÜHR Fr. 300.--								
6 Gegen diese Verfügung kann innert 30 Tagen schriftlich und begründet Beschwerde (im Doppel) bei der Volkswirtschaftsdirektion des Kantons Bern erhoben werden. Gemäss Art. 25 Abs. 1 TSchG darf erst von der rechtskräftigen Bewilligung Gebrauch gemacht werden.	7 Bern, 12. Oktober 2009 Kantonaler Veterinärdienst Der Kantonstierarzt:  Dr. Reto Wyss								
Zusätzliche Unterlagen zu Gesuch und Anhang sind bei der Bewilligungsstelle vorhanden <input type="checkbox"/> ; nicht vorhanden <input type="checkbox"/>									
Verteiler: <input type="checkbox"/> Gesuchsteller/in <input type="checkbox"/> Bundesamt für Veterinärwesen	Beilagen: <input type="checkbox"/> Bewilligungsgesuch inkl. Anhang (Seiten 1-3)								

ANEXO 2: Visão geral dos experimentos: “printscreens” dos prontuários digitalizados dos animais utilizados no estudo

Experimento 1



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-12h

Peso: 32,0 Kg, gênero: fêmea

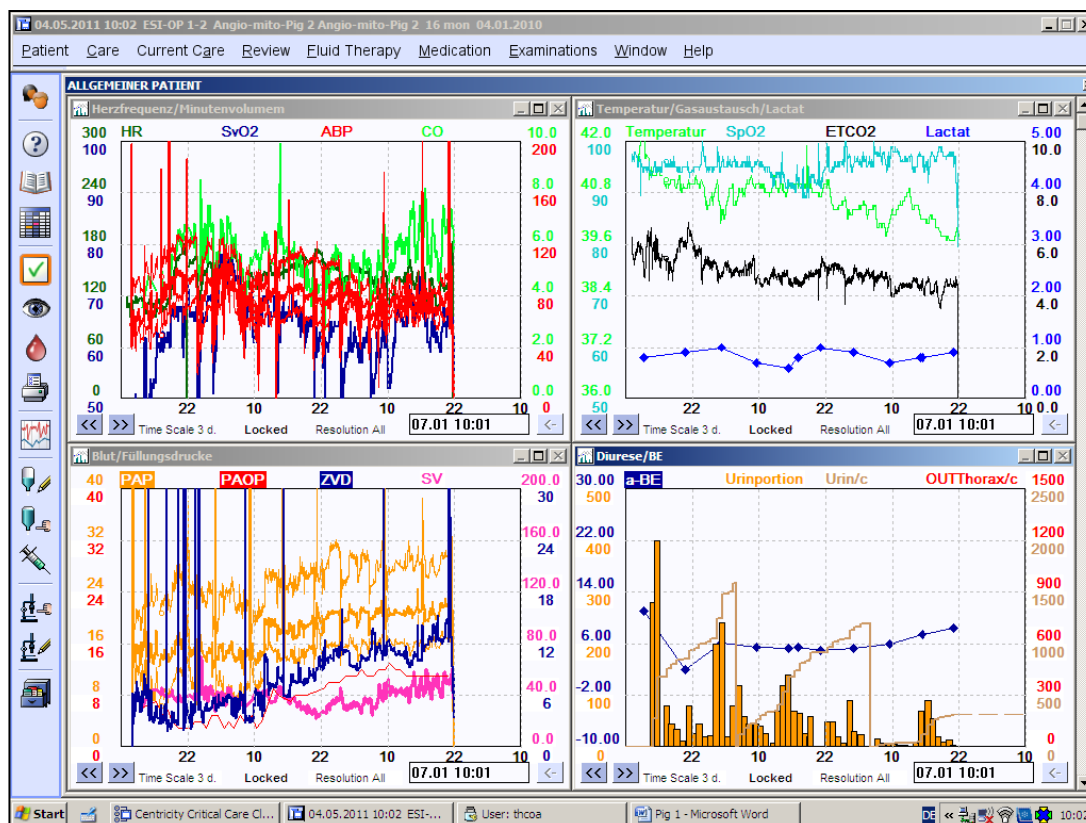
Início: 04/01/2010

Indução da peritonite: 12:08 h

Fim: 05/01/2010

Status: óbito 34 horas após indução da peritonite

Experimento 2



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-6h

Peso: 34,0 Kg, gênero: macho

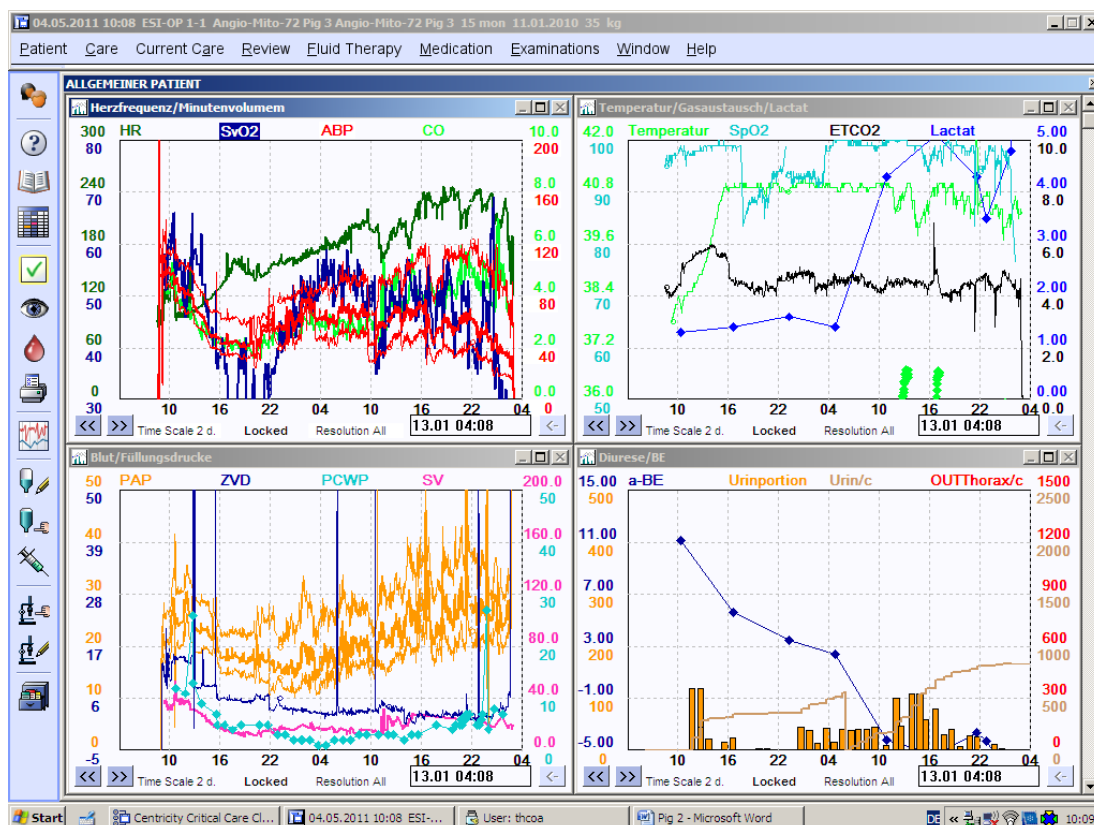
Início: 04/01/2010

Indução da peritonite: 15:20 h

Fim: 06/01/2010

Status: sobreviveu até o fim do experimento

Experimento 3



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-24h

Peso: 35,0 Kg, gênero: macho

Início: 11/01/2010

Indução da peritonite: 10:45 h

Fim: 13/01/2010

Status: Óbito 40 horas após indução da peritonite

Experimento 4



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-24h

Peso: 40,0 Kg, gênero: macho

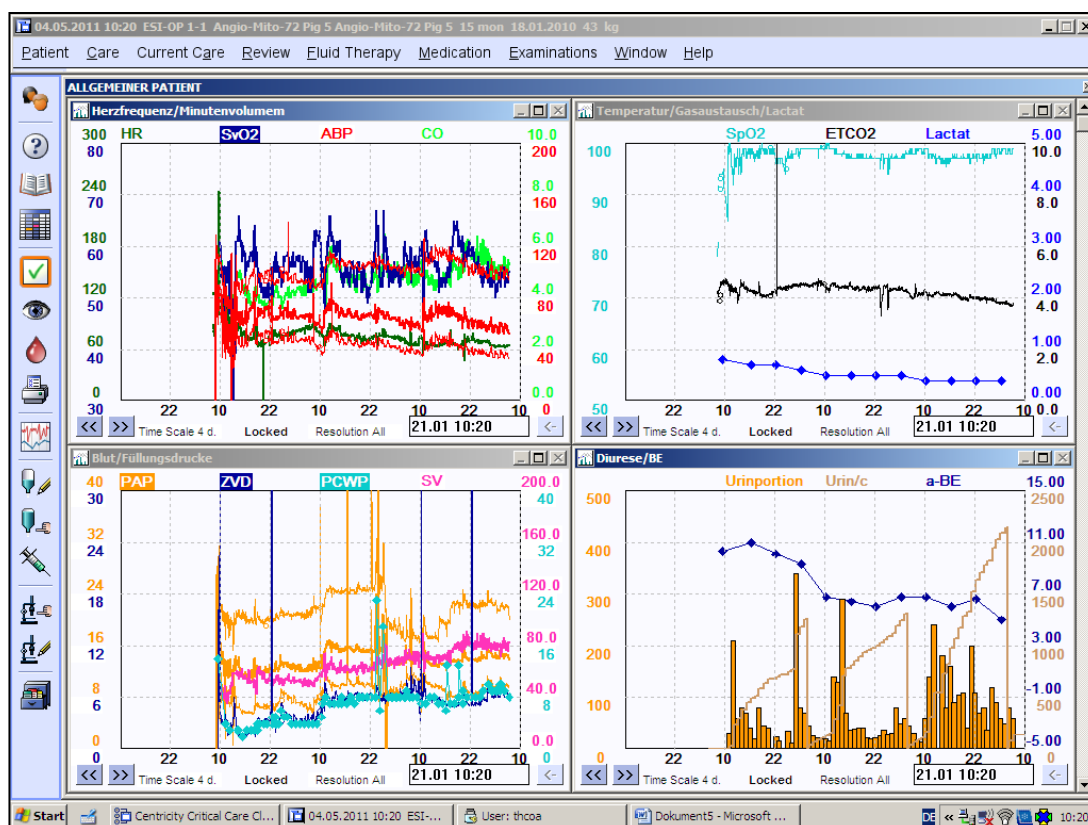
Início: 11/01/2010

Indução da peritonite: 13:15 h

Fim: 14/01/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 5



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: Grupo controle

Peso: 43,0 Kg, gênero: macho

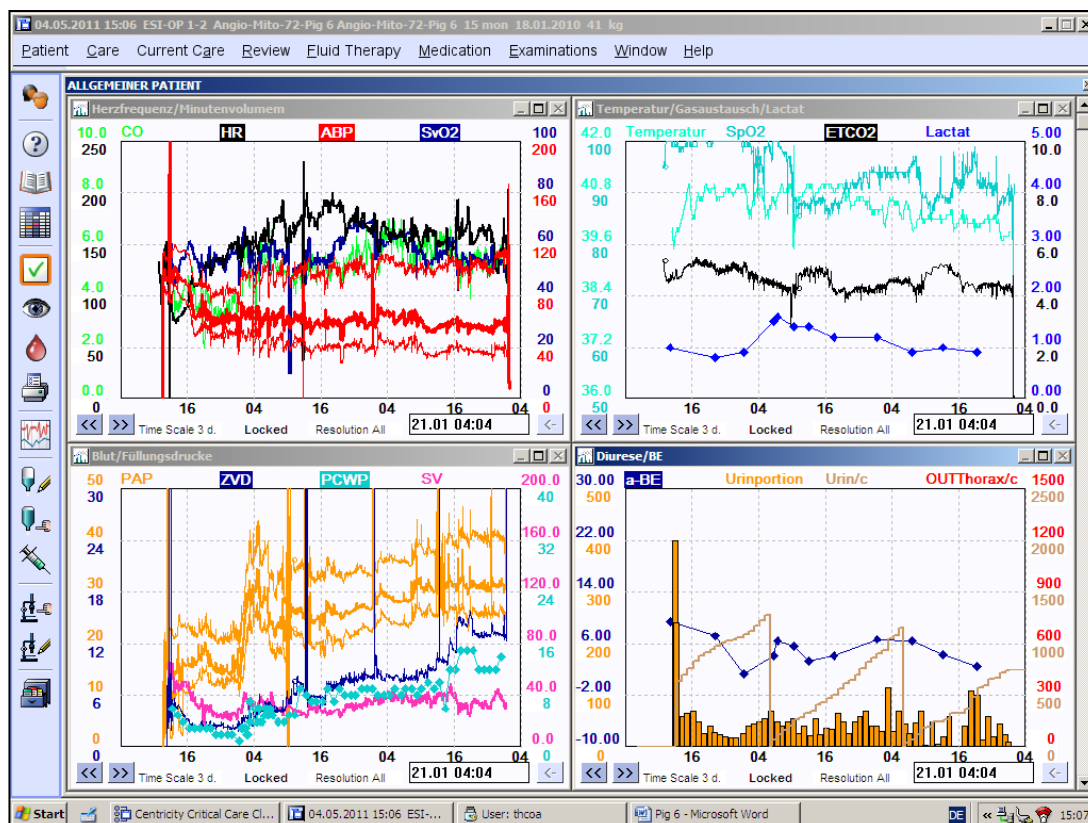
Início: 18/01/2010

Indução da peritonite: sadio, sem peritonite

Fim: 21/01/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 6



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-12h

Peso: 41,0 Kg, gênero: macho

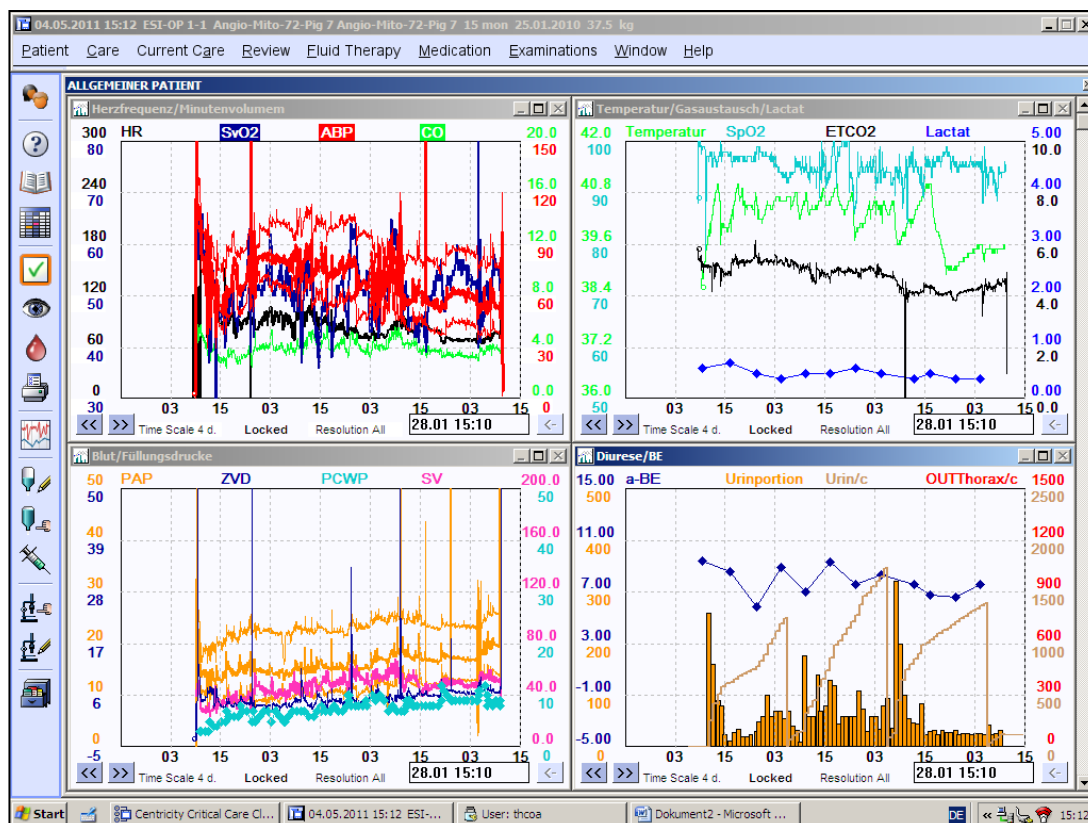
Início: 18/01/2010

Indução da peritonite: 13:15 h

Fim: 21/01/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 7



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: Grupo controle

Peso: 37,0 Kg, gênero: macho

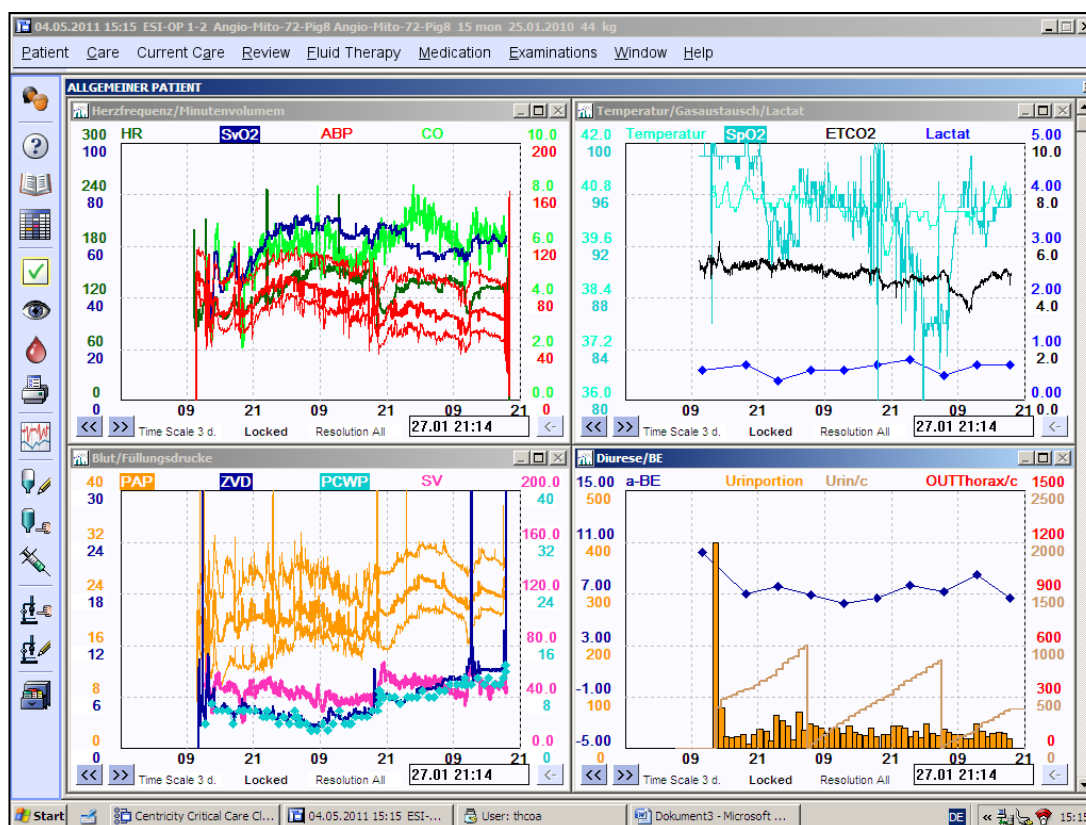
Início: 25/01/2010

Indução da peritonite: sadio, sem peritonite

Fim: 28/01/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 8



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT -6h

Peso: 44,0 Kg, gênero: fêmea

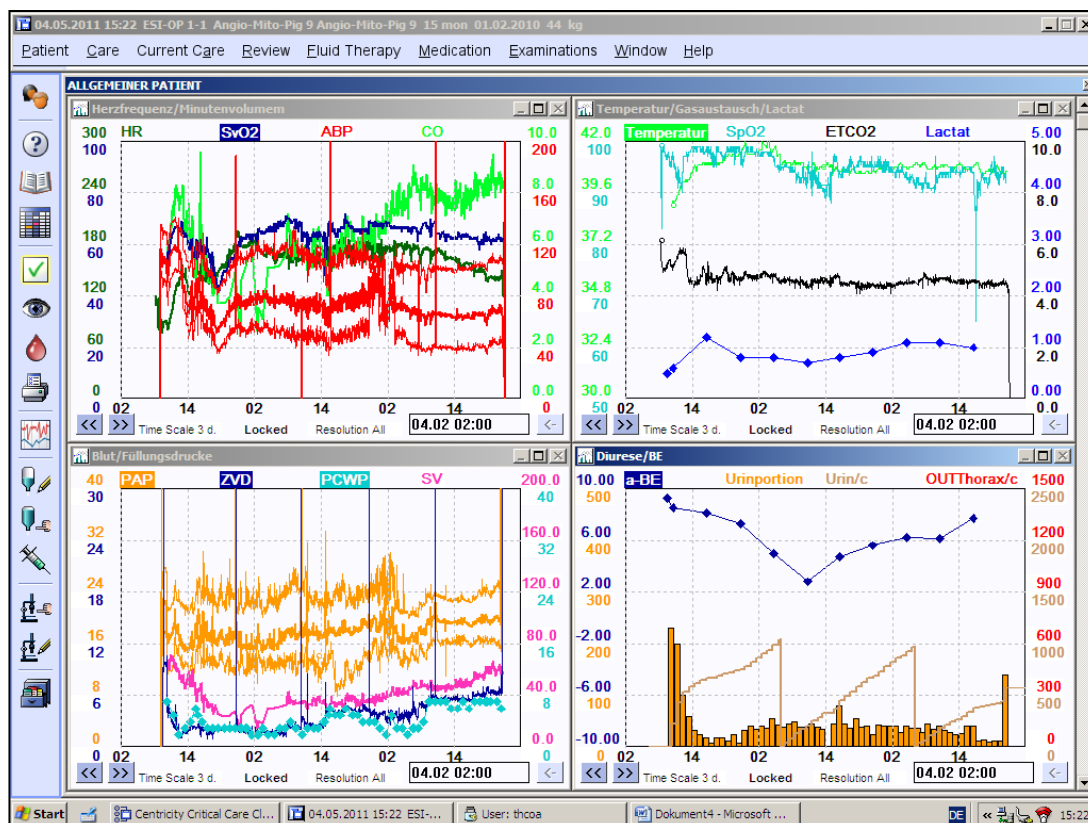
Início: 25/01/2010

Indução da peritonite: 12:30 h

Fim: 27/01/2010

Status: sobreviveu até o fim do experimento

Experimento 9



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-12h

Peso: 44,0 Kg, gênero: fêmea

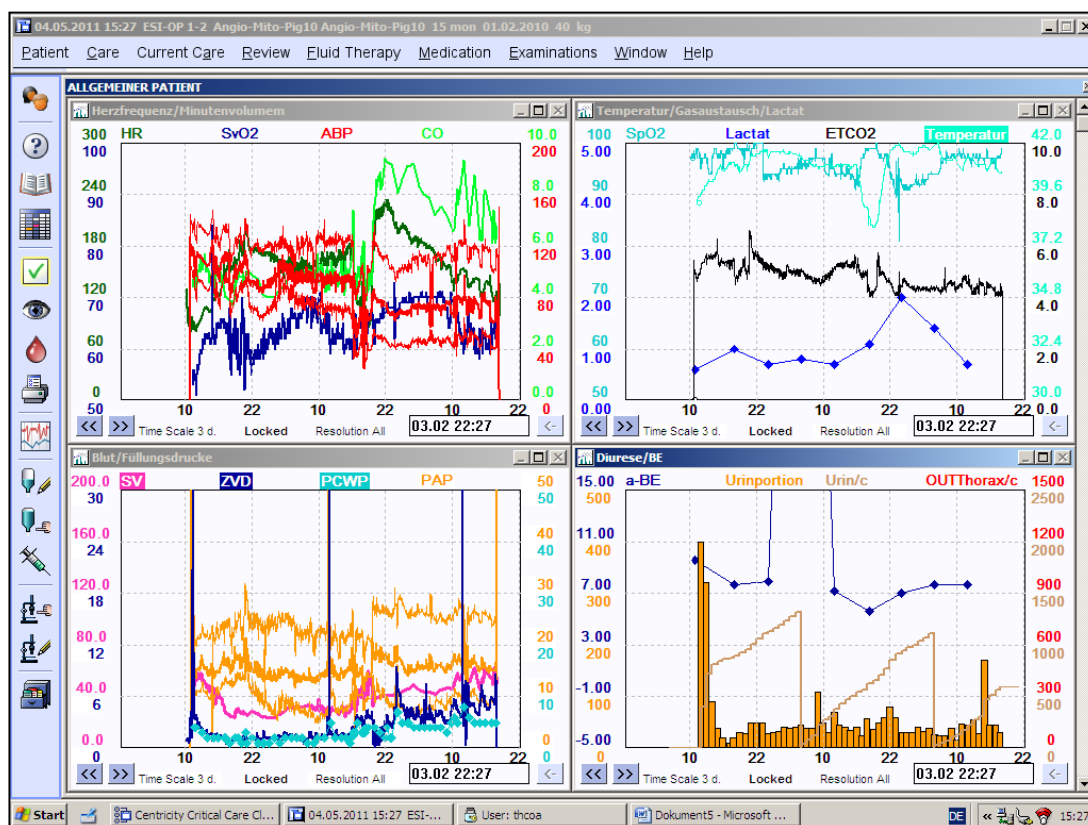
Início: 01/02/2010

Indução da peritonite: 10:30 h

Fim: 03/02/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 10



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-6h

Peso: 40,0 Kg, gênero: macho

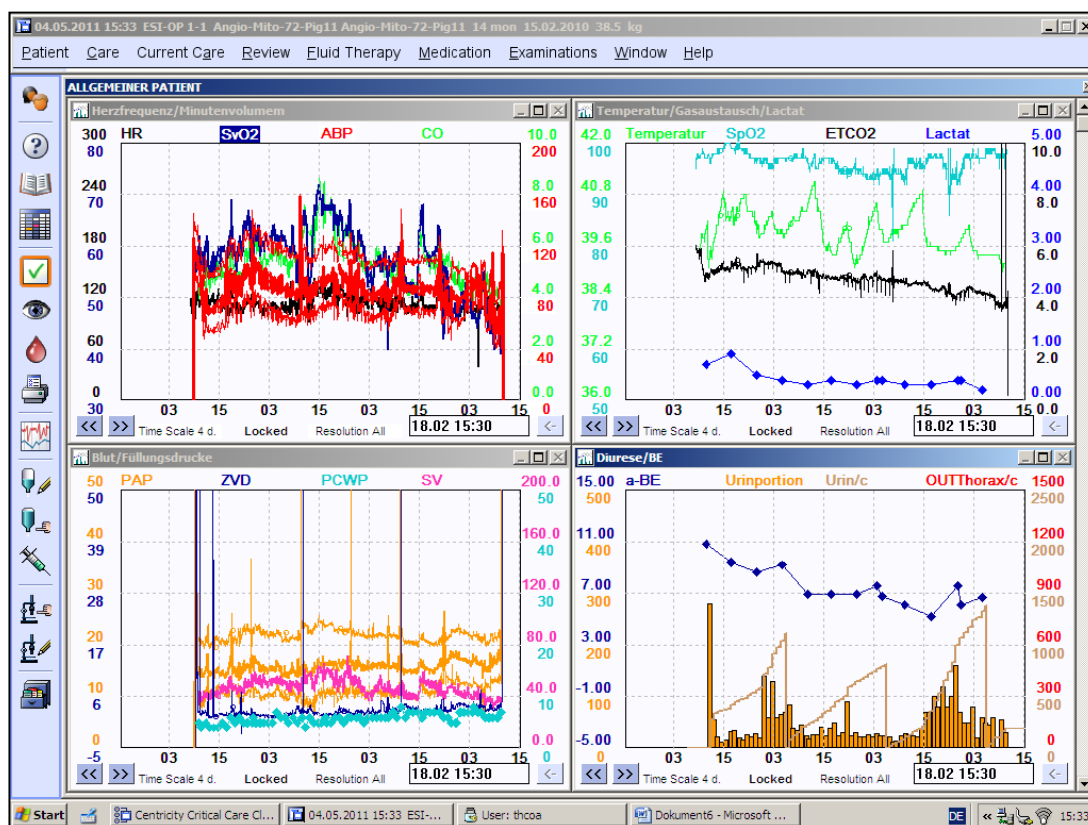
Início: 01/02/2010

Indução da peritonite: 12:00 h

Fim: 03/02/2010

Status: sobreviveu até o fim do experimento

Experimento 11



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: Grupo controle

Peso: 38,5 Kg, gênero: fêmea

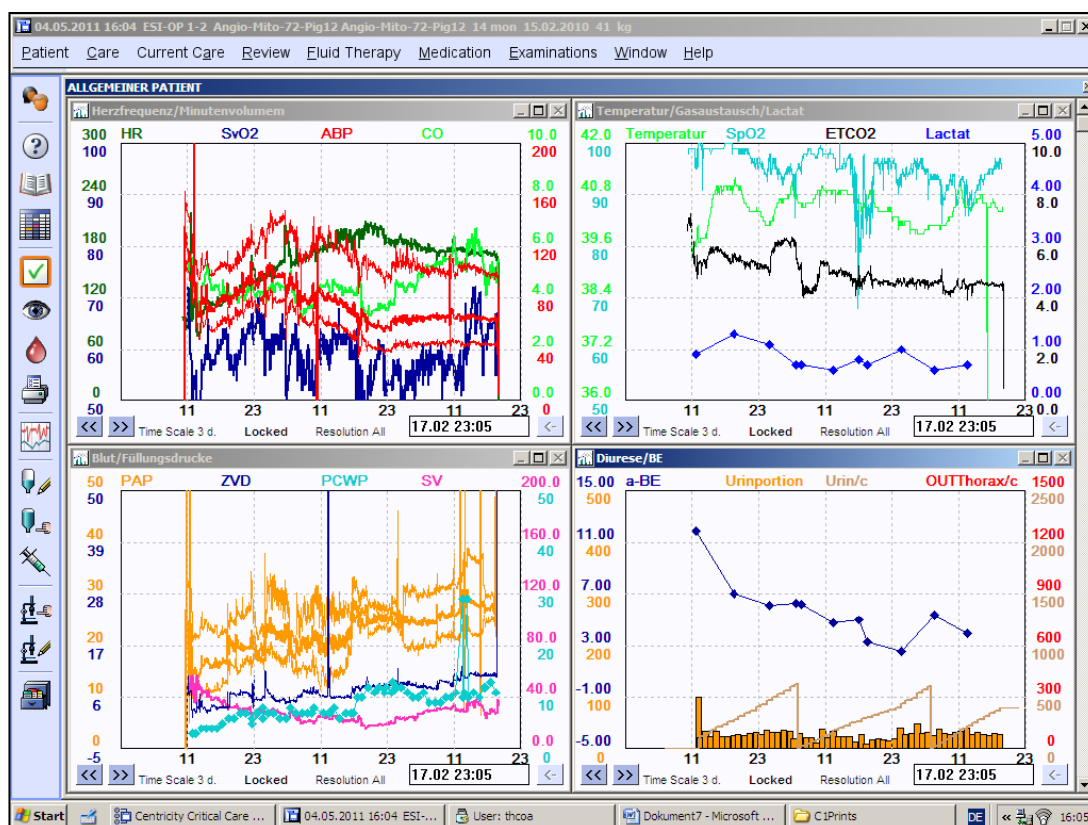
Início: 15/02/2010

Indução da peritonite: sadio, sem peritonite

Fim: 18/02/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 12



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-6h

Peso: 41,0 Kg, gênero: macho

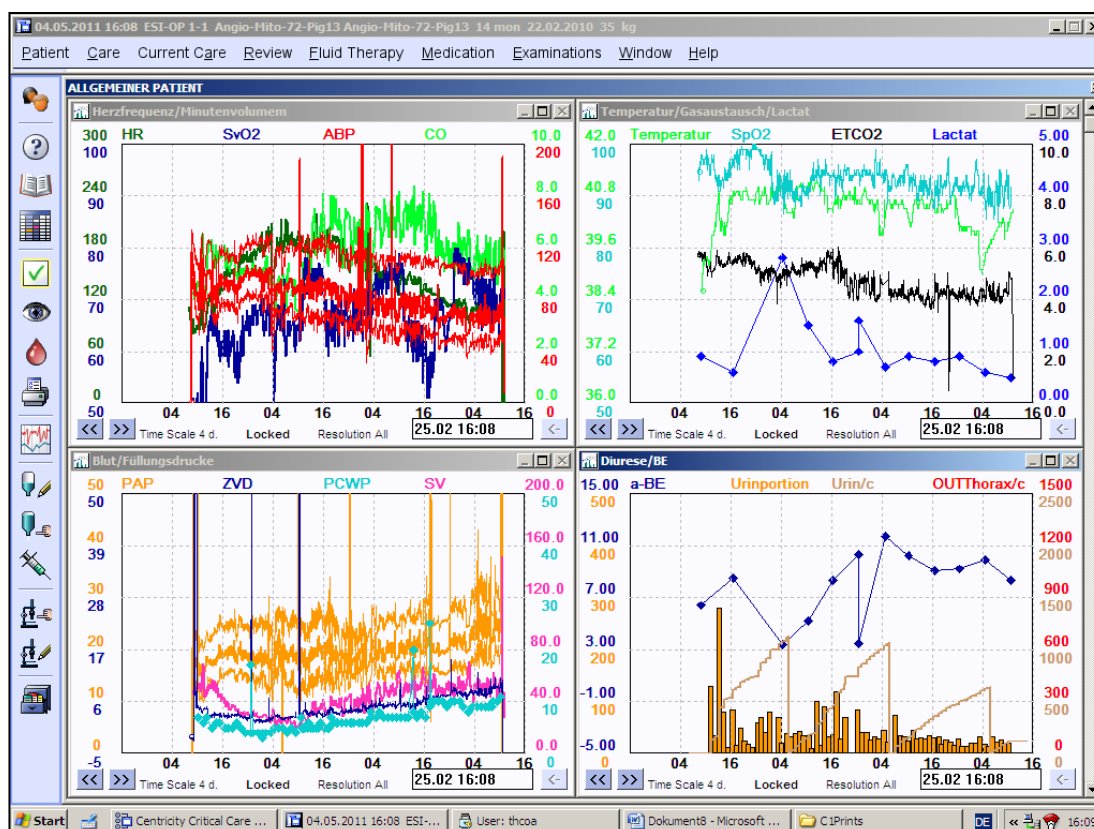
Início: 15/02/2010

Indução da peritonite: 12:30 h

Fim: 17/02/2010

Status: sobreviveu até o fim do experimento

Experimento 13



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-24h

Peso: 35,0 Kg, gênero: fêmea

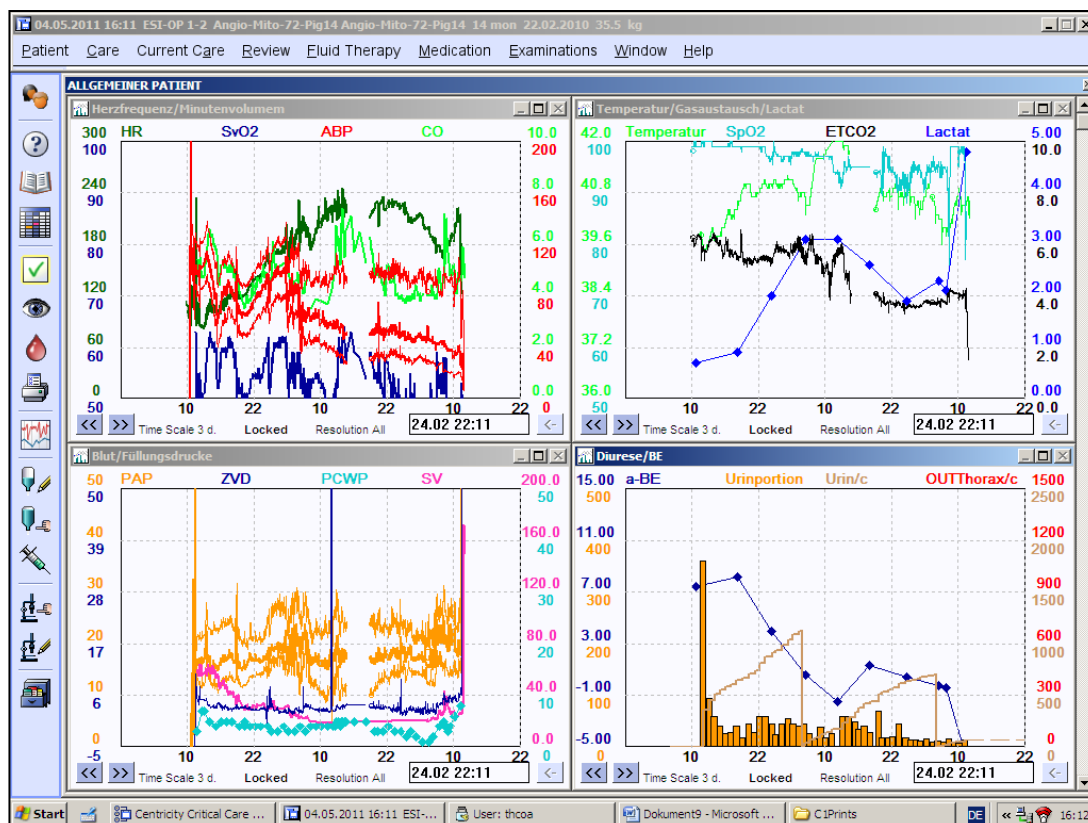
Início: 22/02/2010

Indução da peritonite: 10:30 h

Fim: 25/02/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 14



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-24h

Peso: 35,0 Kg, gênero: macho

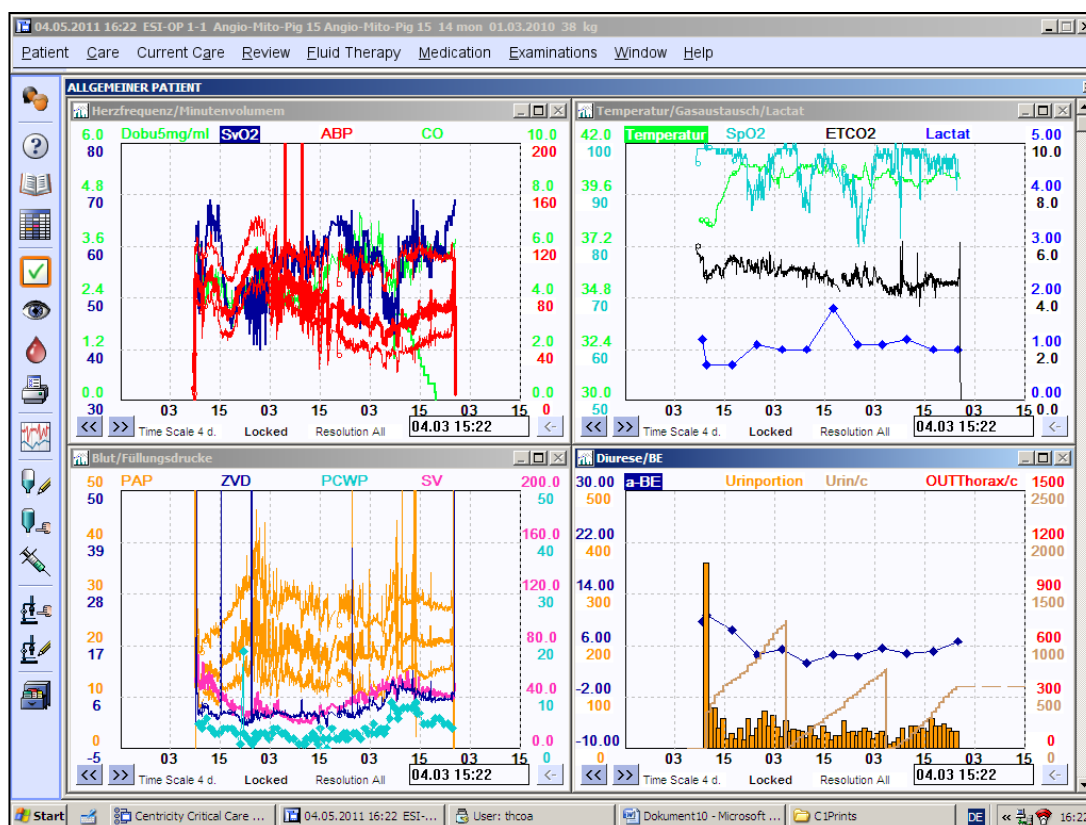
Início: 22/02/2010

Indução da peritonite: 12:15 h

Fim: 24/02/2010

Status: Óbito 47 horas após indução da peritonite

Experimento 15



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-12h

Peso: 38,0 Kg, gênero: fêmea

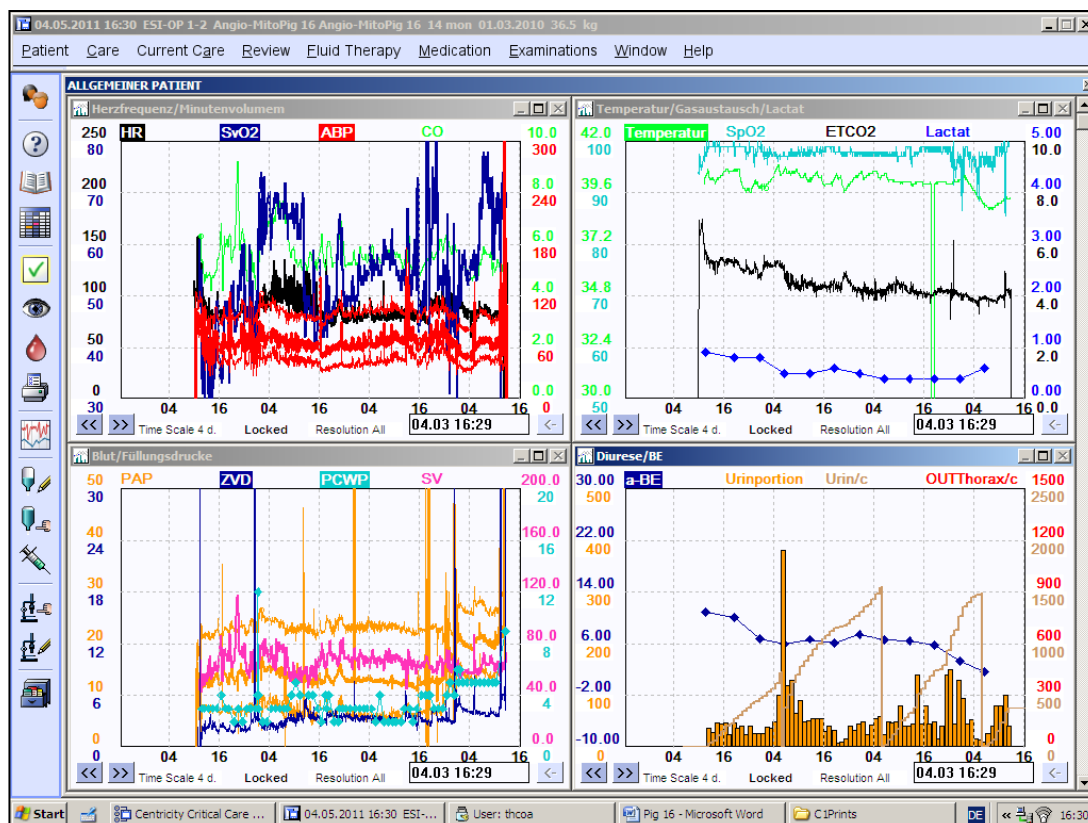
Início: 01/03/2010

Indução da peritonite: 10:50 h

Fim: 03/03/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 16



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: Grupo controle

Peso: 36,5 Kg, gênero: macho

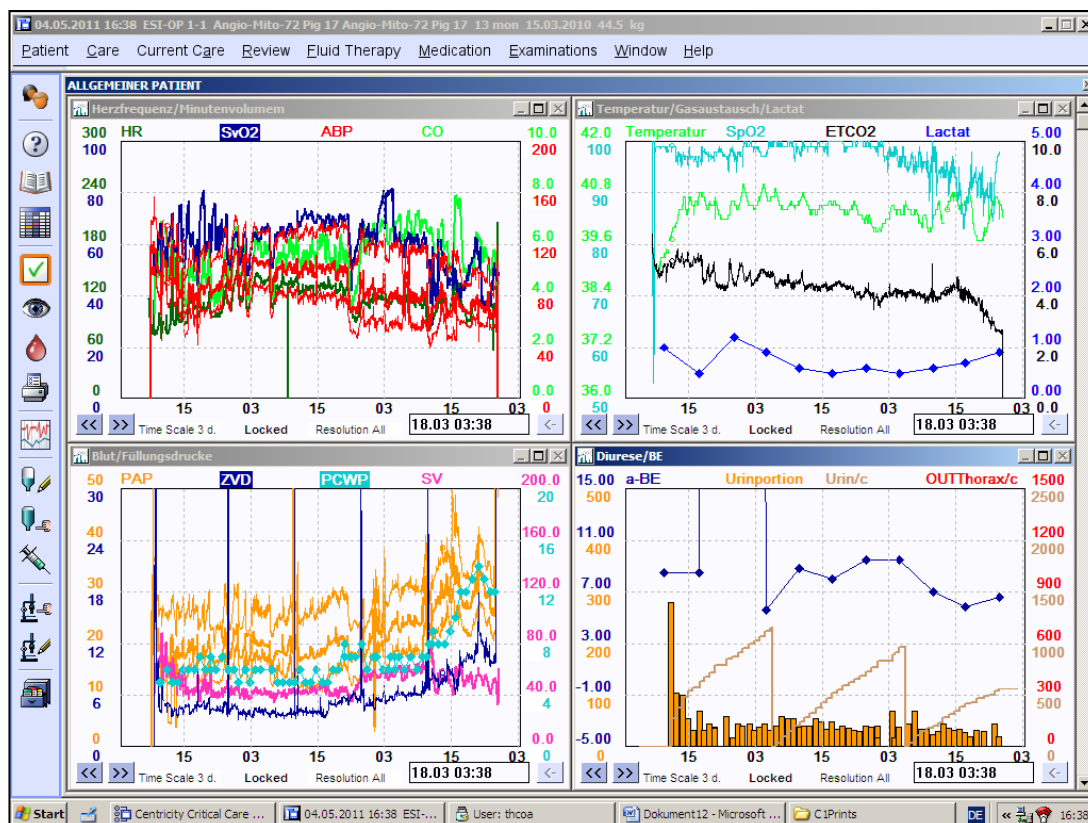
Início: 01/03/2010

Indução da peritonite: sadio, sem peritonite

Fim: 04/03/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 17



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-12h

Peso: 44,5 Kg, gênero: macho

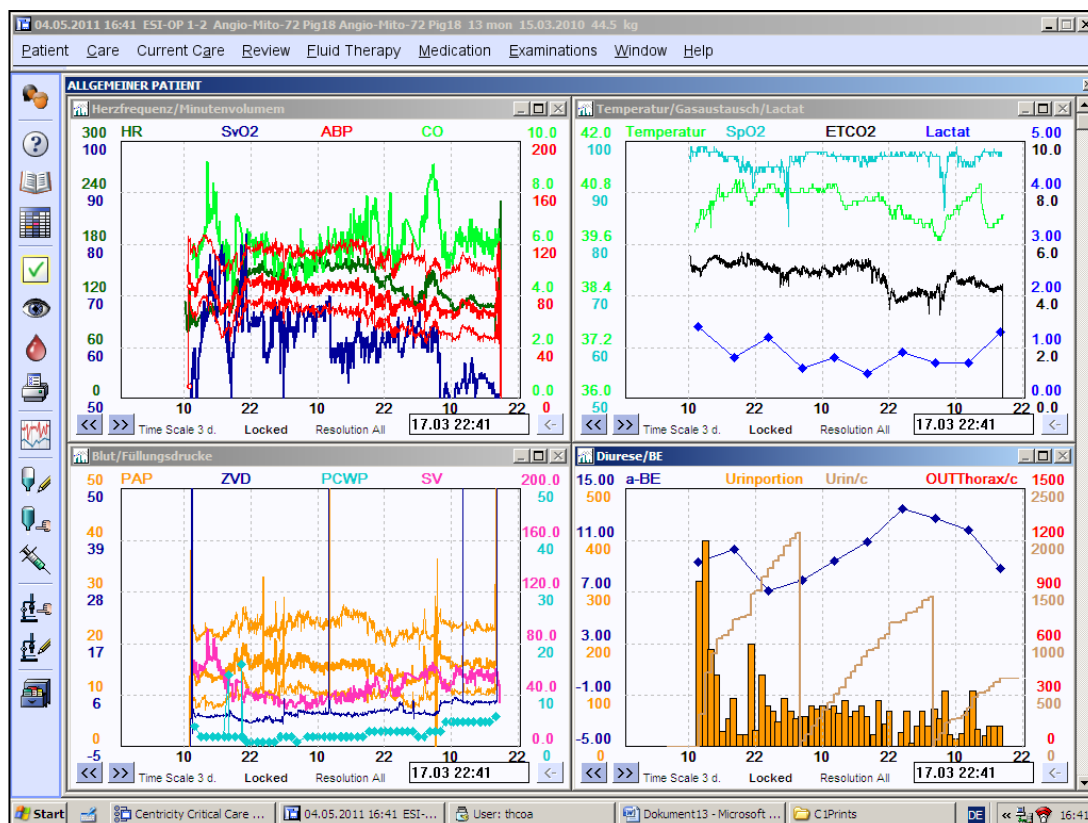
Início: 15/03/2010

Indução da peritonite: 10:50 h

Fim: 17/03/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 18



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-6h

Peso: 44,5 Kg, gênero: macho

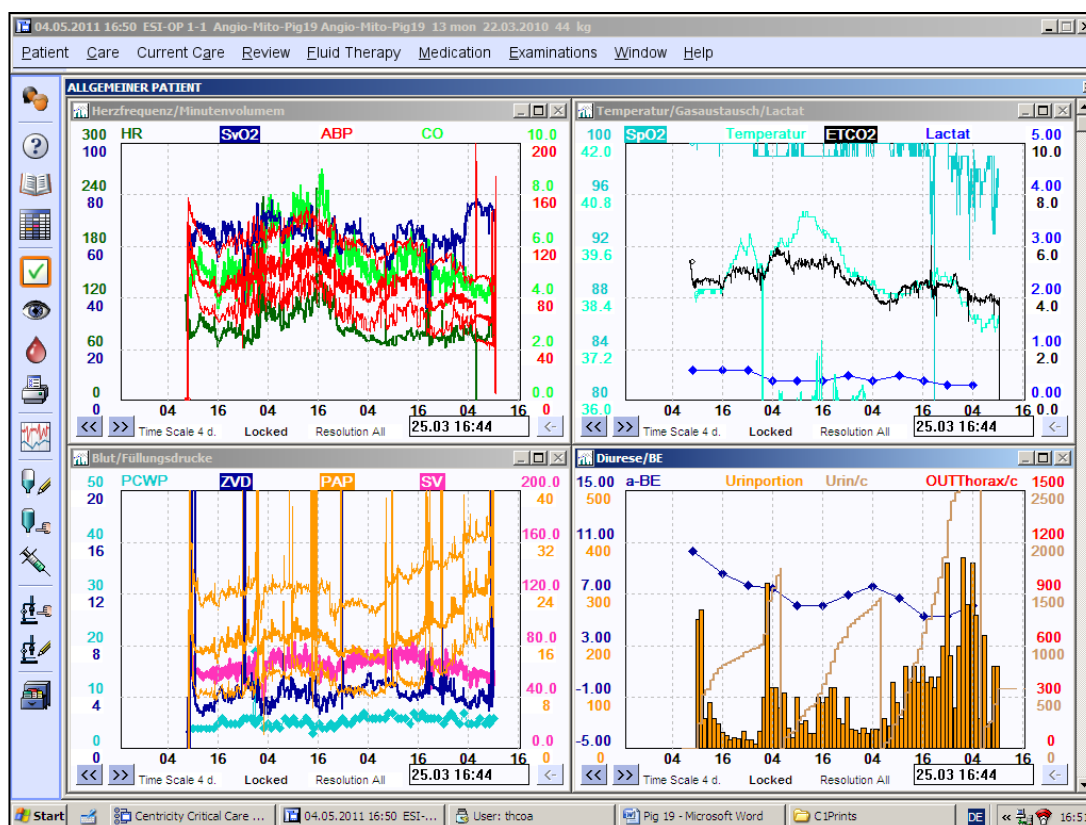
Início: 15/03/2010

Indução da peritonite: 12:10 h

Fim: 17/03/2010

Status: sobreviveu até o fim do experimento

Experimento 19



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: Grupo controle

Peso: 44,0 Kg, gênero: fêmea

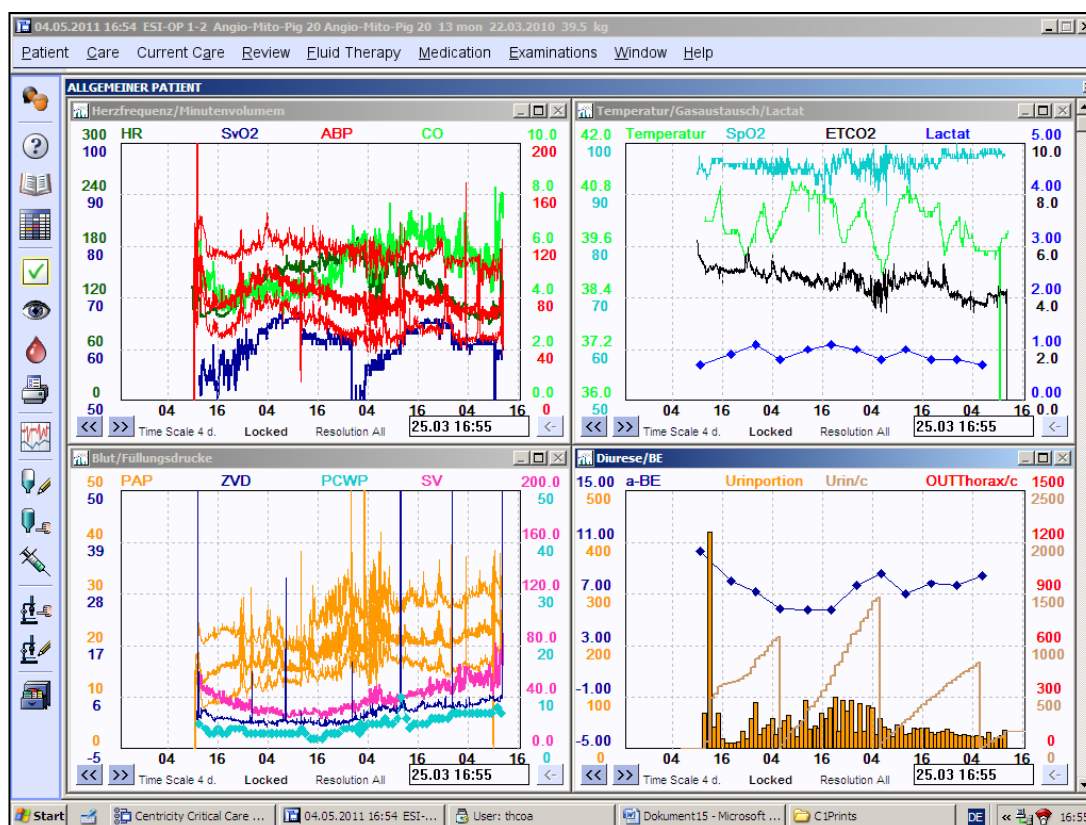
Início: 22/03/2010

Indução da peritonite: sadio, sem peritonite

Fim: 25/03/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 20



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-24h

Peso: 39,5 Kg, gênero: fêmea

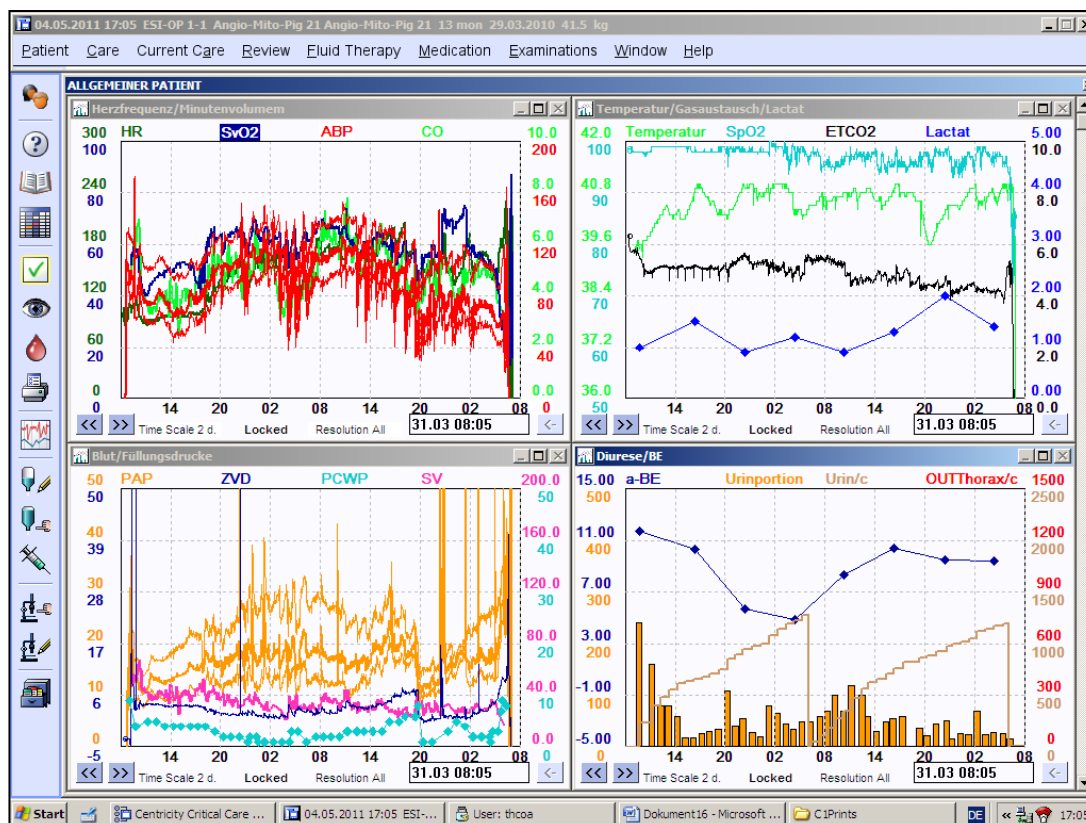
Início: 22/03/2010

Indução da peritonite: 12:10 h

Fim: 25/03/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 21



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-12h

Peso: 41,5 Kg, gênero: macho

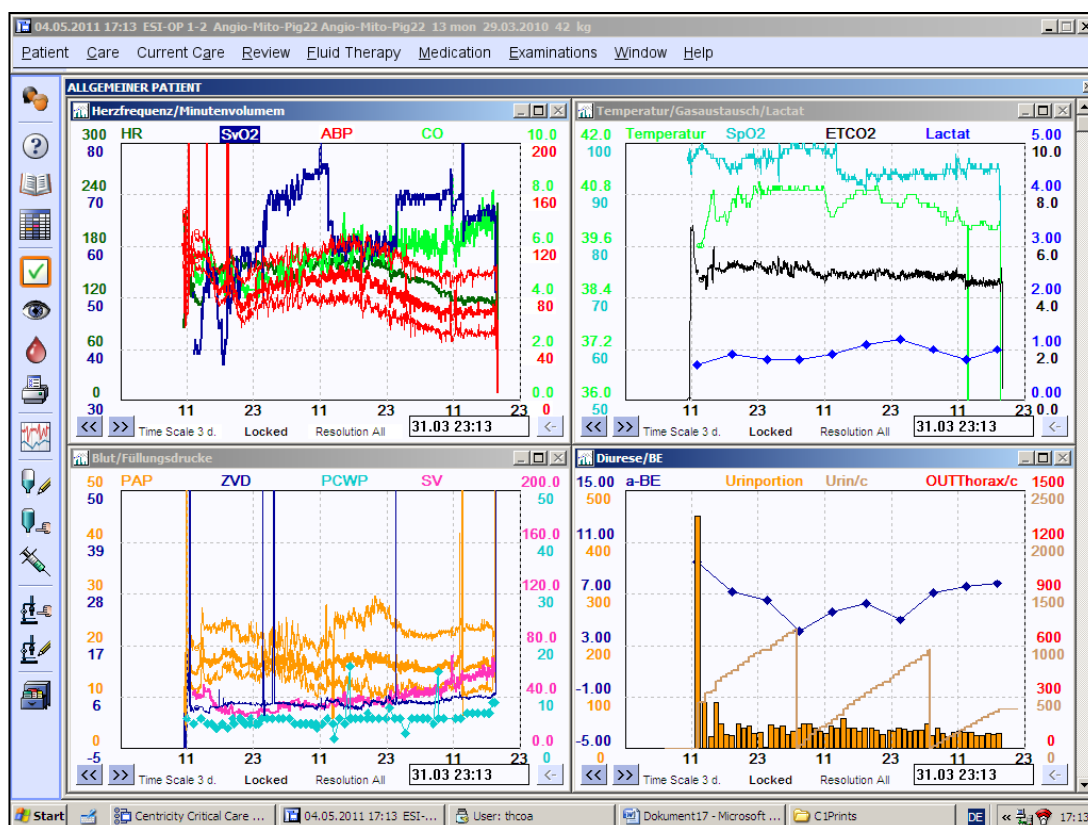
Início: 29/03/2010

Indução da peritonite: 10:15 h

Fim: 31/03/2010

Status: Óbito 44 horas após indução da peritonite

Experimento 22



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-6h

Peso: 42,0 Kg, gênero: fêmea

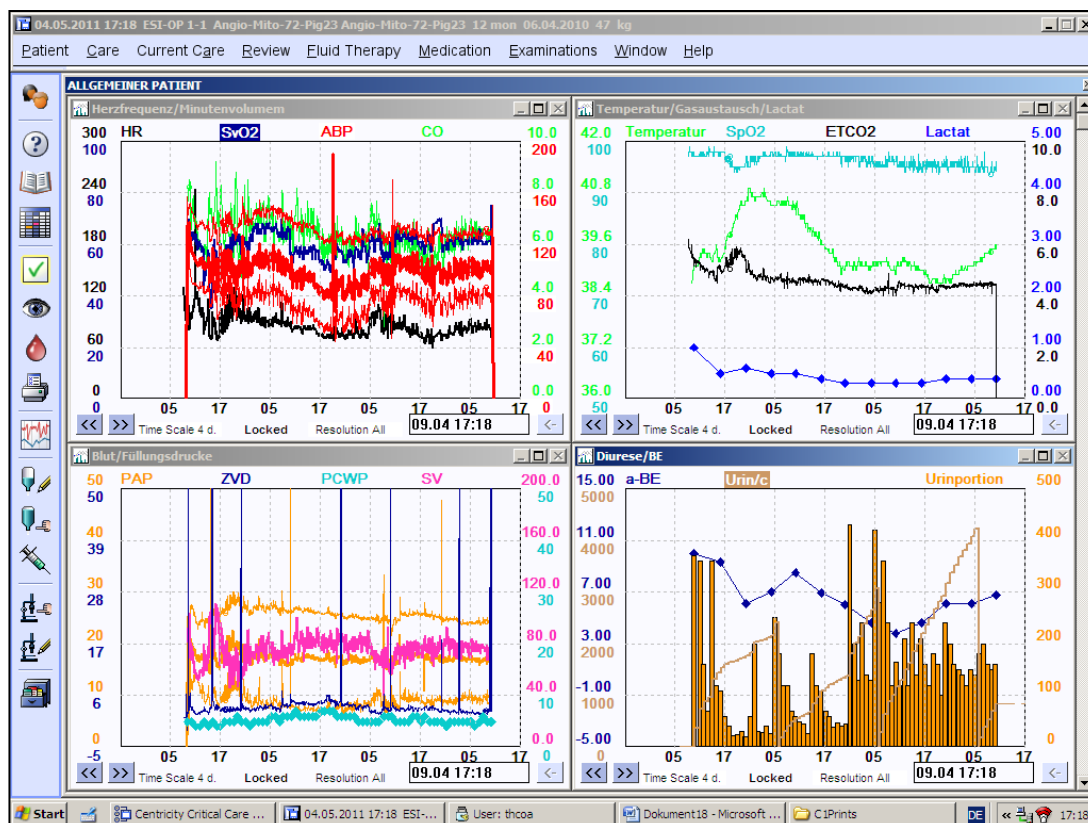
Início: 29/03/2010

Indução da peritonite: 12:25 h

Fim: 31/03/2010

Status: sobreviveu até o fim do experimento

Experimento 23



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: Grupo controle

Peso: 47,0 Kg, gênero: fêmea

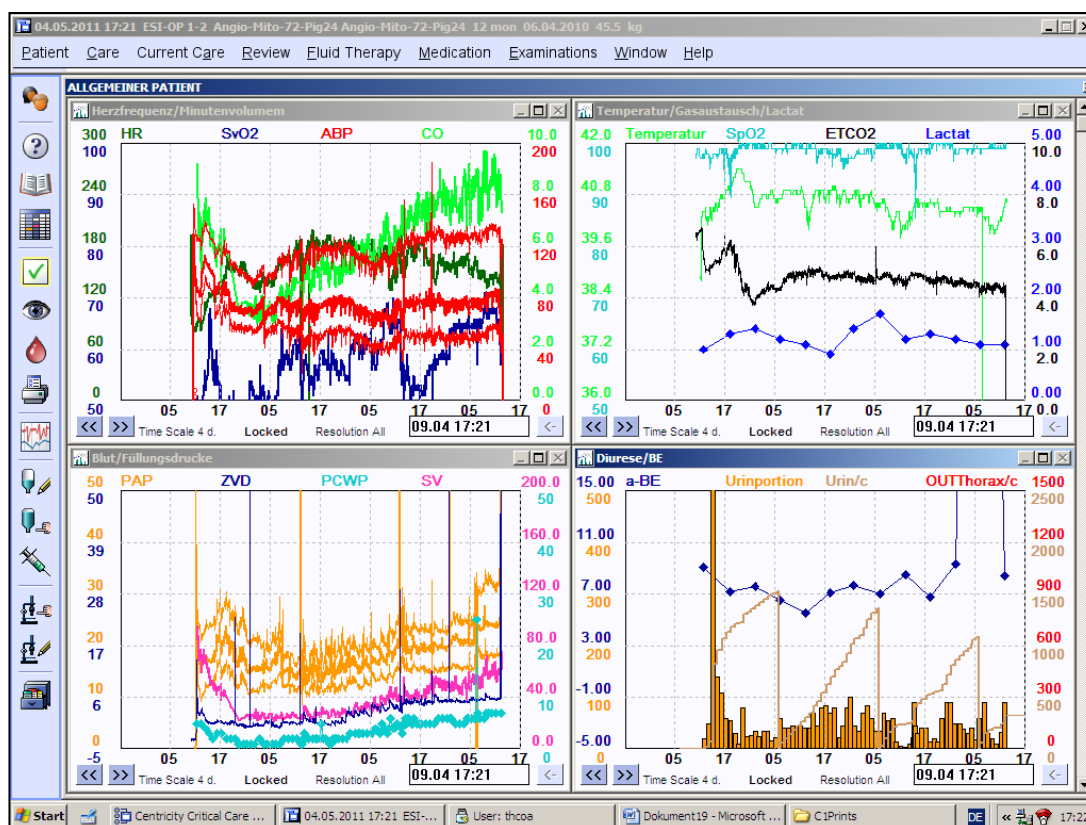
Início: 06/04/2010

Indução da peritonite: sadio, sem peritonite

Fim: 09/04/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 24



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-24h

Peso: 45,5 Kg, gênero: fêmea

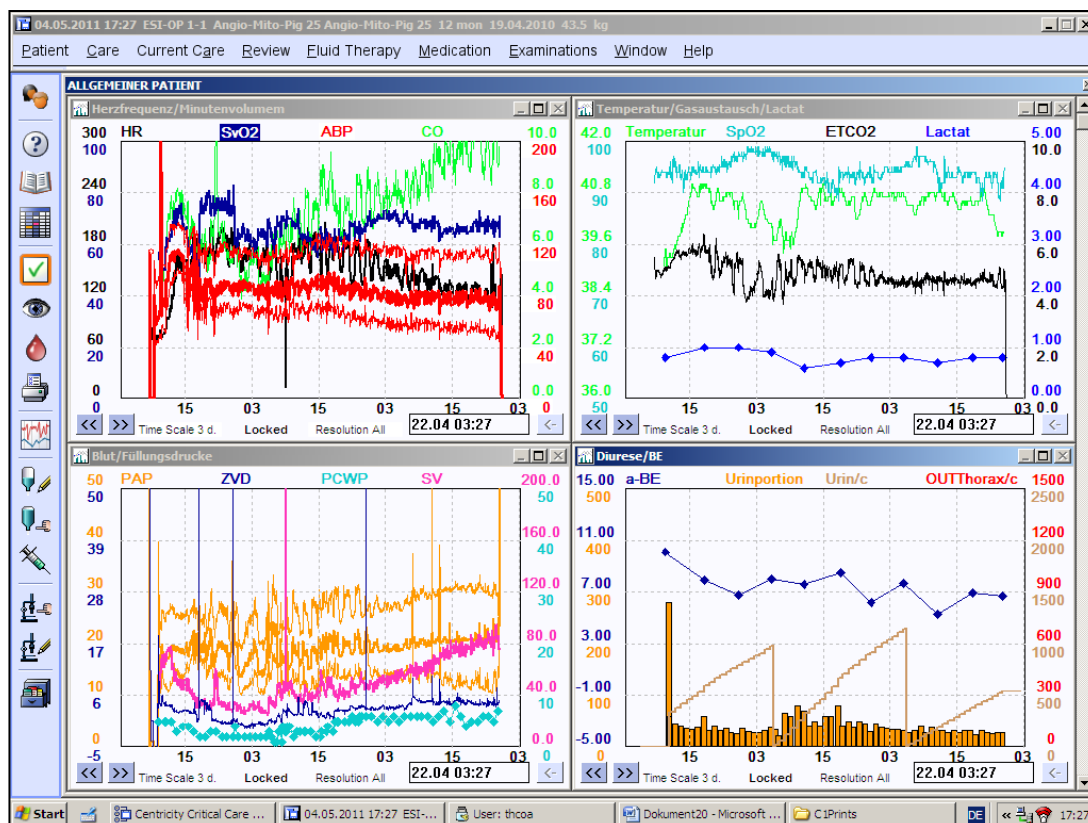
Início: 06/04/2010

Indução da peritonite: 12:30 h

Fim: 09/04/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 25



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-12h

Peso: 43,0 Kg, gênero: fêmea

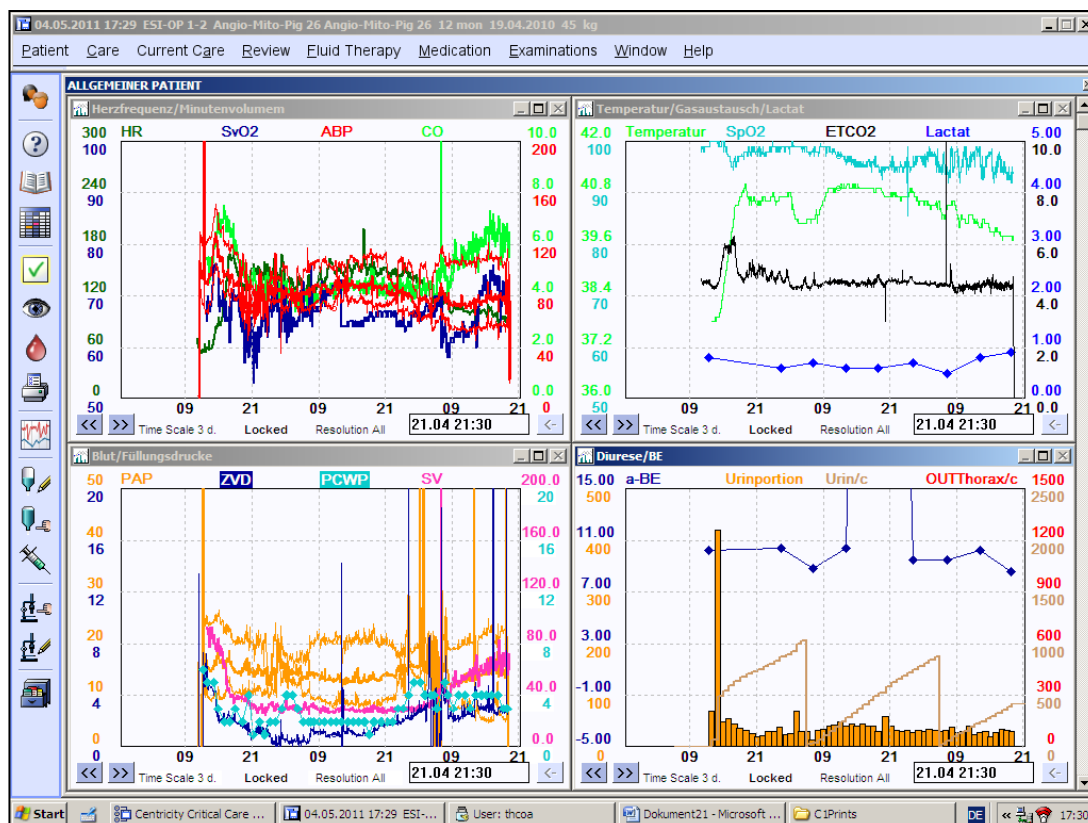
Início: 19/04/2010

Indução da peritonite: 11:30

Fim: 21/04/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 26



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-6h

Peso: 45,0 Kg, gênero: macho

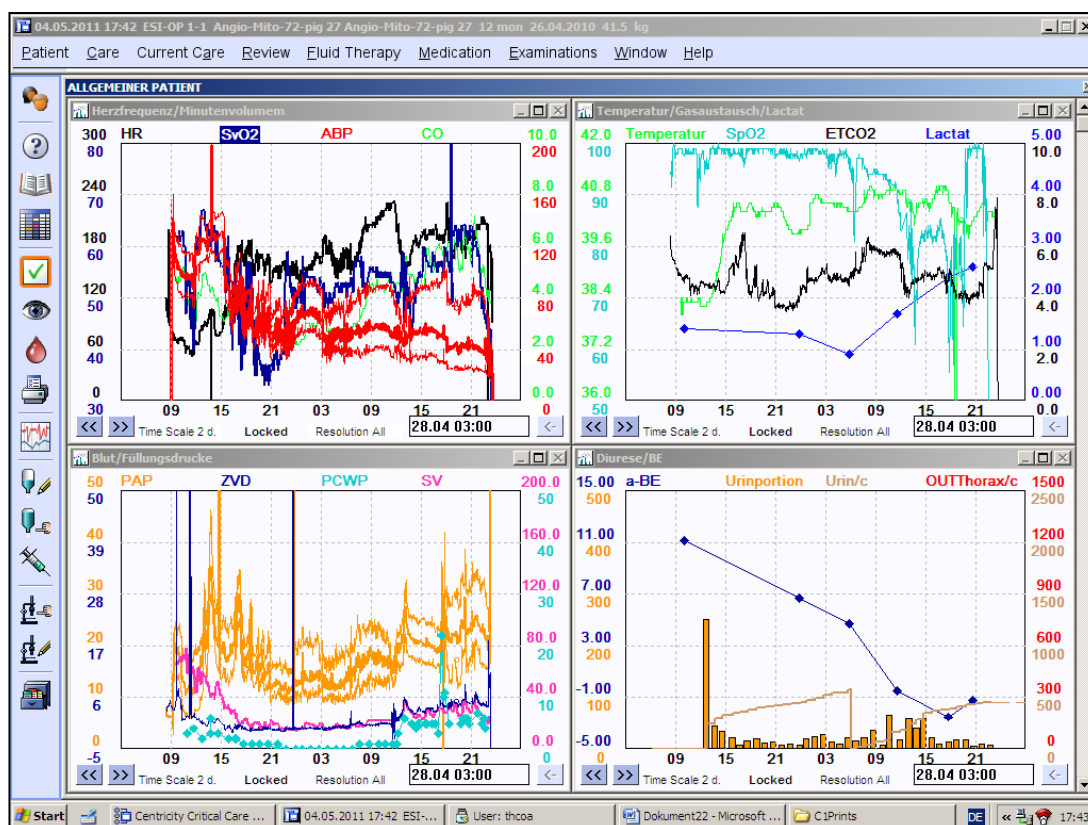
Início: 19/04/2010

Indução da peritonite: 13:15 h

Fim: 21/04/2010

Status: sobreviveu até o fim do experimento

Experimento 27



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-24h

Peso: 341,5 Kg, gênero: macho

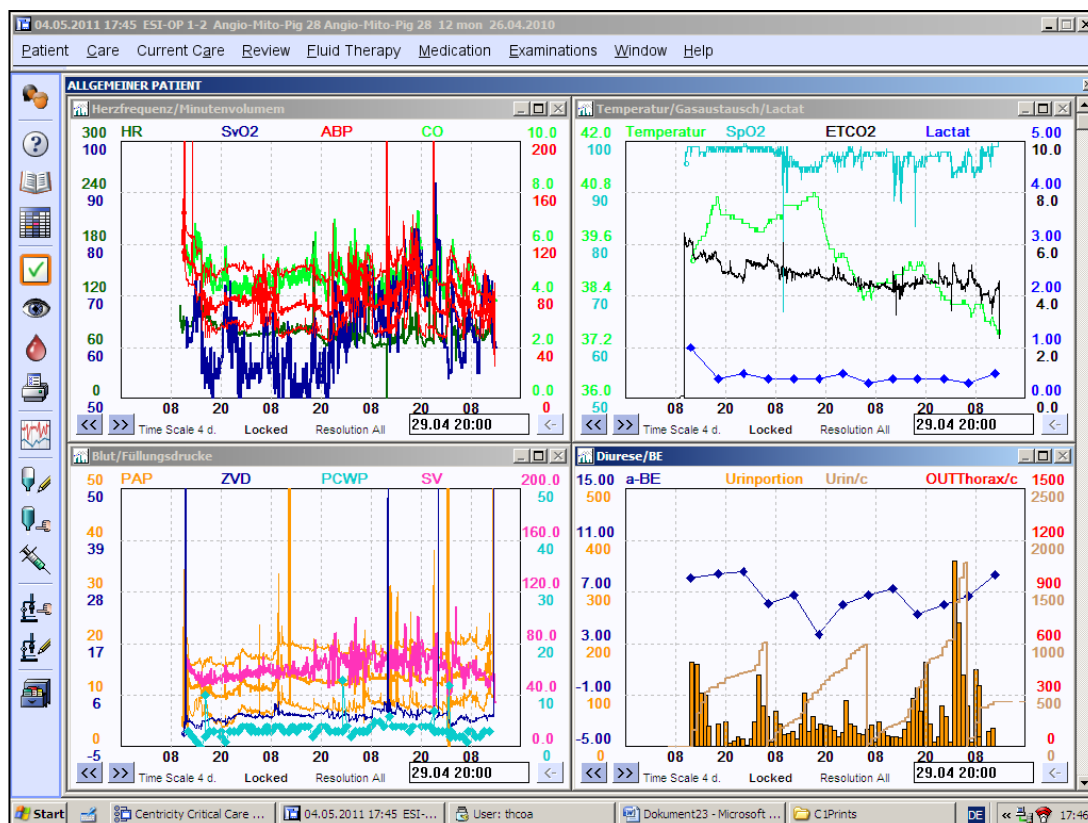
Início: 26/04/2010

Indução da peritonite: 11:45 h

Fim: 27/04/2010

Status: Óbito 35 horas após indução da peritonite

Experimento 28



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: Grupo controle

Peso: 38,0 Kg, gênero: fêmea

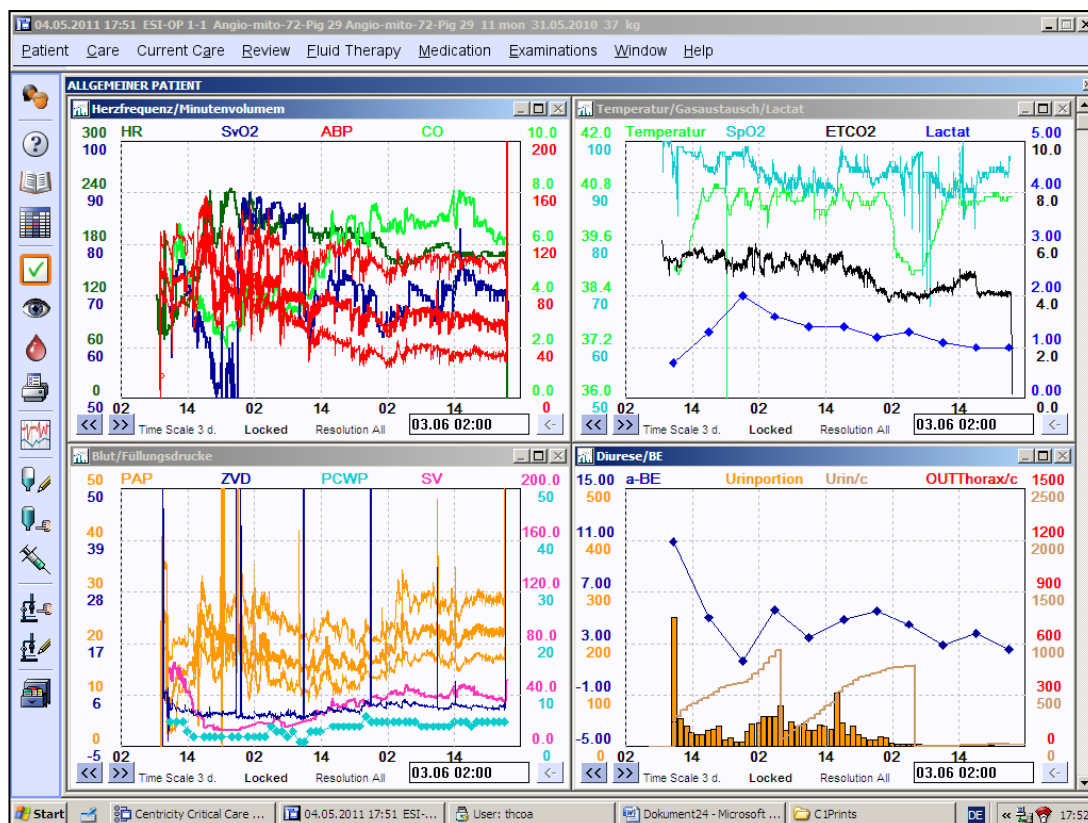
Início: 26/04/2010

Indução da peritonite: sadio, sem peritonite

Fim: 29/04/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 29



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-12h

Peso: 37,0 Kg, gênero: macho

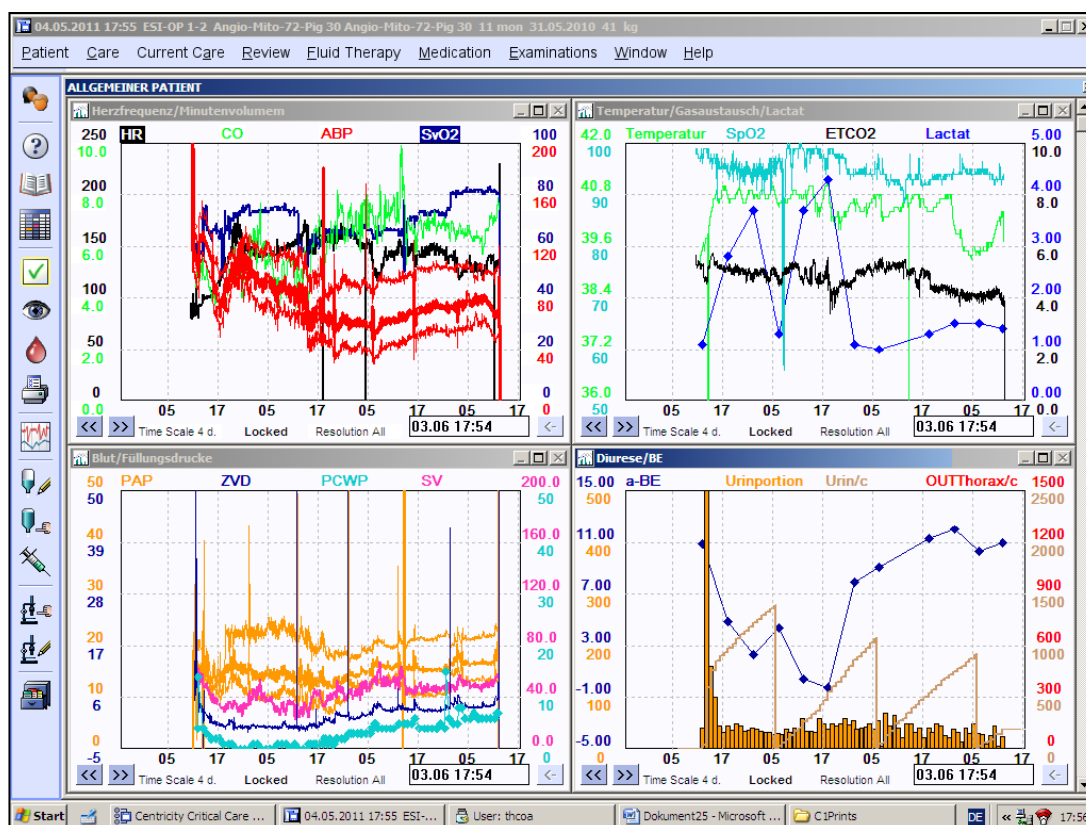
Início: 31/05/2010

Indução da peritonite: 11:00 h

Fim: 02/06/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 30



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-24h

Peso: 41,0 Kg, gênero: macho

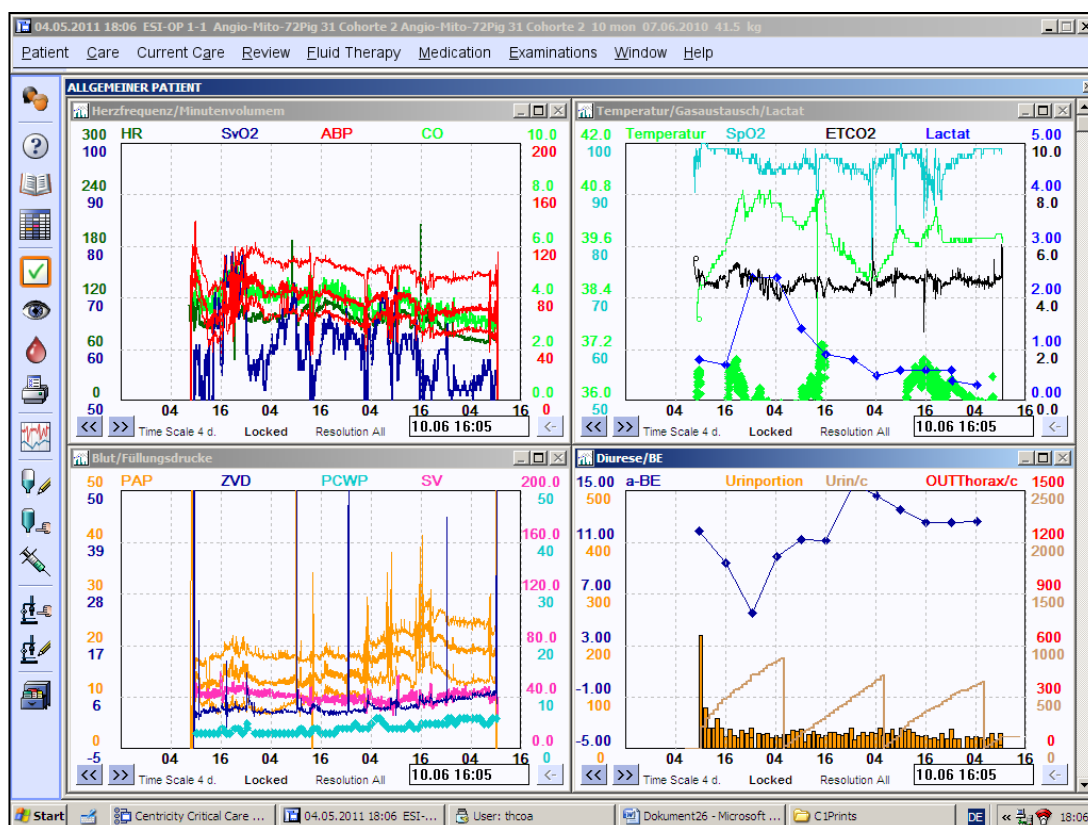
Início: 31/05/2010

Indução da peritonite: 12:30 h

Fim: 03/06/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 31



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: Grupo controle

Peso: 41,5 Kg, gênero: macho

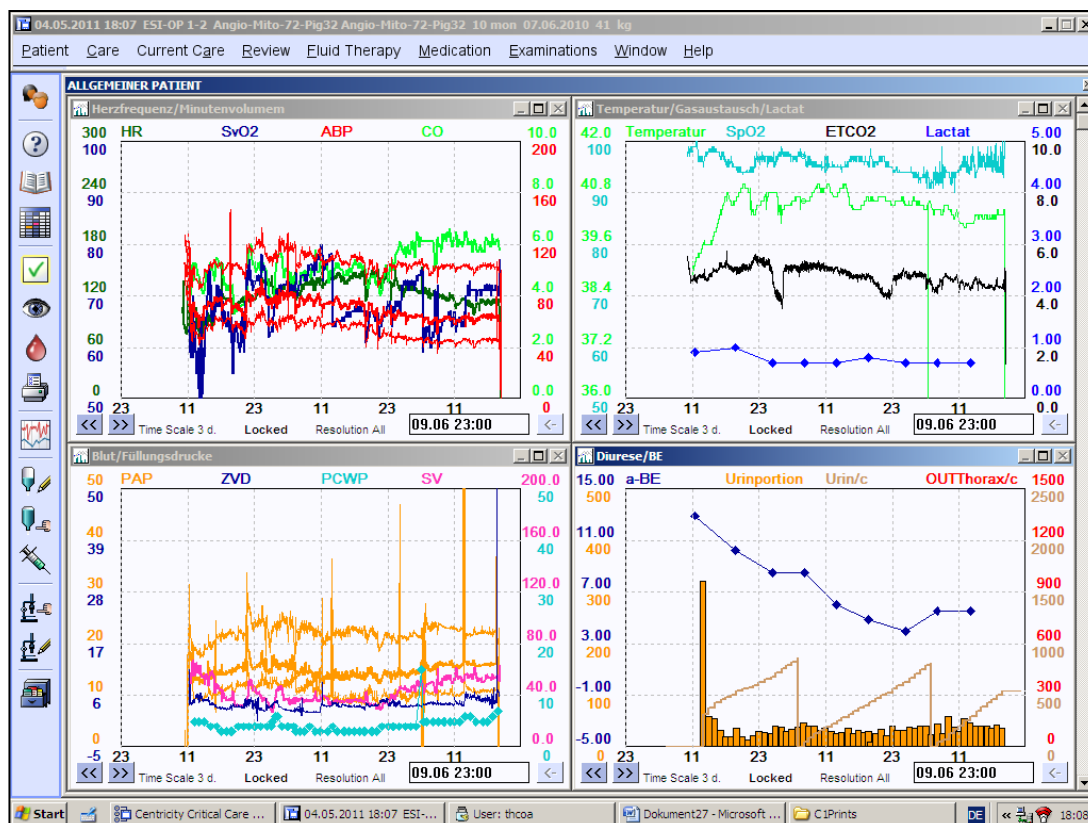
Início: 07/06/2010

Indução da peritonite: sadio, sem peritonite

Fim: 10/06/2010

Status: Sobreviveu até o fim do estudo

Experimento 32



HR = frequência cardíaca, SvO₂ = saturação venosa mista de oxigênio, ABPs = pressão arterial sistólica, ABPm = pressão arterial média, ABPd = pressão arterial diastólica, CO = débito cardíaco, PAP = pressão da artéria pulmonar, ZVD = pressão venosa central, PCWP = pressão de oclusão da artéria pulmonar, SV = volume sistólico, temperatur = temperatura central, SpO₂ = saturação periférica de oxigênio, EtCO₂ = pressão parcial de CO₂ ao final da expiração, Lactat = lactato arterial, a-BE = excesso de bases arterial, urinportion = débito urinário

Grupo: ΔT-6h

Peso: 41,0 Kg, gênero: macho

Início: 07/06/2010

Indução da peritonite: 13:00 h

Fim: 09/06/2010

Status: sobreviveu até o fim do experimento

ANEXO 3. Publicações e apresentações em congressos internacionais

- (1) **Corrêa TD**, Reintam A, Takala J, Djafarzadeh S, Dünser M, Jakob SM. Time to resuscitation in sepsis and outcome: a preliminary evaluation of clinical pattern, incidence of organ dysfunction and mortality in a porcine model of fecal peritonitis. *Intensive Care Medicine* 2010;36(Supplement 2):S291. Trabalho apresentado no 23th Annual Congress - ESICM, 2010, Barcelona, Espanha.
- (2) Reintam Blaser A, **Corrêa TD**, Takala J, Djafarzadeh S, Vuda M, Dünser M, et al. Fluid loss from intravascular space occurs early in sepsis: preliminary results in experimental porcine peritonitis. *Intensive Care Medicine* 2010;Supplement 2(36):S292. Trabalho apresentado no 23th Annual Congress - ESICM, 2010, Barcelona, Espanha.
- (3) Vuda M, **Corrêa TD**, Reintam A, Takala J, Jakob SM, Djafarzadeh S. Time to resuscitation: effects on mitochondrial function and outcome in experimental sepsis model. *Intensive Care Medicine* 2010;36(Supplement 2):S409. Trabalho apresentado no 23th Annual Congress - ESICM, 2010, Barcelona, Espanha.
- (4) **Corrêa T**, Blaser AR, Takala J, Djafarzadeh S, Vuda M, Dünser M, et al. Carotid blood flow is correlated with cardiac output but not with arterial blood pressure in porcine fecal peritonitis. *Critical Care* 2011;15(Suppl 1):70. Trabalho apresentado no 31th International Symposium On Intensive Care And Emergency Medicine, 2011, Bruxelas, Bélgica.
- (5) **Corrêa T**, Brander L, Djafarzadeh S, Schröder R, Takala J, Blaser AR, et al. Effect of bacterial load versus duration of exposure to bacteria on plasma TNF α concentrations in porcine fecal peritonitis. *Critical Care* 2011;15(Suppl 1):248. Trabalho apresentado no 31th International Symposium On Intensive Care And Emergency Medicine, 2011, Bruxelas, Bélgica.
- (6) Reintam Blaser A, **Corrêa T**, Djafarzadeh S, Vuda M, Takala J, Dünser M, et al. Positive central-mixed venous oxygen saturation gradients: high oxygen saturation in the inferior vena cava confirms high splanchnic oxygen extraction. *Critical Care* 2011;15(Suppl 1):42. Trabalho apresentado no 31th International Symposium On Intensive Care And Emergency Medicine, 2011, Bruxelas, Bélgica.

ANEXO 4. Artigo original publicado

Corrêa TD, Vuda M, Blaser AR, Takala J, Djafarzadeh S, Dunser MW, et al. Effect of treatment delay on disease severity and need for resuscitation in porcine fecal peritonitis. Crit Care Med 2012 Oct;40(10):2841-9.

Effect of treatment delay on disease severity and need for resuscitation in porcine fecal peritonitis

Thiago D. Corrêa, MD; Madhusudanarao Vuda, MSc; Annika Reintam Blaser, MD, PhD; Jukka Takala, MD, PhD; Siamak Djafarzadeh, PhD; Martin W. Dünser, MD; Eliézer Silva, MD, PhD; Michael Lensch, RN; Ludwig Wilkens, MD, PhD; Stephan M. Jakob, MD, PhD

Objective: Early treatment in sepsis may improve outcome. The aim of this study was to evaluate how the delay in starting resuscitation influences the severity of sepsis and the treatment needed to achieve hemodynamic stability.

Design: Prospective, randomized, controlled experimental study.

Setting: Experimental laboratory in a university hospital.

Subjects: Thirty-two anesthetized and mechanically ventilated pigs.

Interventions: Pigs were randomly assigned ($n = 8$ per group) to a nonseptic control group or one of three groups in which fecal peritonitis (peritoneal instillation of 2 g/kg autologous feces) was induced, and a 48-hr period of protocolized resuscitation started 6 (ΔT -6 hrs), 12 (ΔT -12 hrs), or 24 (ΔT -24 hrs) hrs later. The aim of this study was to evaluate the impact of delays in resuscitation on disease severity, need for resuscitation, and the development of sepsis-associated organ and mitochondrial dysfunction.

Measurements and Main Results: Any delay in starting resuscitation was associated with progressive signs of hypovolemia

and increased plasma levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α prior to resuscitation. Delaying resuscitation increased cumulative net fluid balances (2.1 ± 0.5 mL/kg/hr, 2.8 ± 0.7 mL/kg/hr, and 3.2 ± 1.5 mL/kg/hr, respectively, for groups ΔT -6 hrs, ΔT -12 hrs, and ΔT -24 hrs; $p < .01$) and norepinephrine requirements during the 48-hr resuscitation protocol (0.02 ± 0.04 μ g/kg/min, 0.06 ± 0.09 μ g/kg/min, and 0.13 ± 0.15 μ g/kg/min; $p = .059$), decreased maximal brain mitochondrial complex II respiration ($p = .048$), and tended to increase mortality ($p = .08$). Muscle tissue adenosine triphosphate decreased in all groups ($p < .01$), with lowest values at the end in groups ΔT -12 hrs and ΔT -24 hrs.

Conclusions: Increasing the delay between sepsis initiation and resuscitation increases disease severity, need for resuscitation, and sepsis-associated brain mitochondrial dysfunction. Our results support the concept of a critical window of opportunity in sepsis resuscitation. (Crit Care Med 2012; 40:2841–2849)

KEY WORDS: cytokines; fluid therapy; mitochondrial respiration; multiple organ failure; resuscitation; septic shock; severe sepsis; surviving sepsis campaign

Severe sepsis and septic shock are major causes of death in intensive care units (1, 2). In three large multicenter epidemiologic studies, the abdomen was the second most common site of infection in critically ill patients, accounting for 20% of all infections (3–5). Even though the management of sepsis has improved, its associated morbidity and mortality remain high (6, 7).

Most deaths in patients with severe sepsis and septic shock can be attributed to either cardiovascular or multiorgan failure (3, 8). The causes of sepsis-related organ dysfunction are unclear (9), but inadequate tissue perfusion (10, 11), mitochondrial dysfunction (12), systemic inflammation, and direct metabolic changes at the cellular level are all likely to contribute (13, 14). Additional therapeutic interventions administered to critically

ill patients, such as fluid resuscitation (15–19) and catecholamines (20–23), have been suspected to contribute to the development of organ failure as well.

Fluid resuscitation has a high priority in severe sepsis and septic shock patients (15). Both composition and volume of resuscitation fluids may have deleterious effects, mainly on kidneys (16, 17) and lungs (18, 19). Vasopressors may alter mitochondrial respiration (20, 21) and increase mortality (23).

Experimental sepsis research has largely focused on acute models (24–33), whereas clinical sepsis typically develops over hours or days (8). Furthermore, in the clinical setting, timing of resuscitation seems to have an important impact on systemic, organ-specific, and cellular effects of sepsis. Although some clinical studies suggest that the timing of resuscitation has a crucial impact on morbidity and mortality, the impact of the timing of resuscitation has not been well established.

From the Department of Intensive Care Medicine (TDC, MV, ARB, JT, SD, MWD, ML, SMJ), Inselspital, Bern University Hospital, and University of Bern, Bern, Switzerland; Intensive Care Unit (ES), Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil; Institute of Pathology (LW), Klinikum Nordstadt, Hannover, Germany.

Current address for Dr. Corrêa: Department of Anesthesiology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Drs. Corrêa and Vuda contributed equally.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (<http://journals.lww.com/ccmjournal>).

The work was performed in the Experimental Surgery Unit of the University of Bern.

This work was supported by the Swiss National Science Foundation (Grant no 32003B-127619) and the Stiftung für die Forschung in Anästhesiologie und Intensivmedizin, Bern, awarded to SD and SMJ.

The authors have not disclosed any potential conflicts of interest.

For further information regarding this article, E-mail: stephan.jakob@insel.ch

Copyright © 2012 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams and Wilkins

DOI: 10.1097/CCM.0b013e31825b916b

The aim of this experimental study was to evaluate the impact of delays in resuscitation on disease severity, need for resuscitation, and the development of sepsis-associated organ and mitochondrial dysfunction. We hypothesized that the amount of time between sepsis induction and start of treatment influences the severity of sepsis-induced organ and mitochondrial dysfunction.

MATERIALS AND METHODS

This study was performed in accordance with the National Institutes of Health guidelines for the care and use of experimental animals and with the approval of the Animal Care Committee of the Canton Bern, Switzerland.

Thirty-two domestic pigs of both sexes (weight: 40.3 ± 3.7 kg [mean \pm SD]) were fasted for 12 hrs prior to the experiment, with free access to water. The pigs were sedated with intramuscular ketamine (20 mg/kg) and xylazine (2 mg/kg). Then, a peripheral intravenous catheter was inserted in an ear vein for administration of fluids and drugs. Pigs were orally intubated following anesthesia induction with midazolam (0.5 mg/kg) and atropine (0.02 mg/kg). Anesthesia was maintained with propofol (4 mg/kg/hr) and fentanyl (5 μ g/kg/hr during surgery and 2 μ g/kg/hr afterward). When necessary, additional injections of fentanyl (50 μ g) or midazolam (5 mg) were administered. The stomach was kept empty by insertion of a large-bore orogastric tube.

Animals were ventilated with a volume-controlled ventilator with a positive end-expiratory pressure of 5 cm H₂O, F_{IO₂} of 30%, and a tidal volume of 8 mL/kg (Servo-i; Maquet Critical Care, Solna, Sweden). The respiratory rate was adjusted to maintain the P_{aCO₂} at 35–45 mm Hg. Throughout the study, Ringer's lactate and glucose 50% (G 50%) were infused (adding up to 3 mL/kg/hr) and adjusted to keep blood glucose in the range of 3.5–8.3 mmol/L.

Surgical Preparation. The jugular and femoral veins were cannulated, and pulmonary artery catheters were placed into the pulmonary artery and in the superior and the inferior vena cava, and a double lumen catheter into the left femoral vein. An arterial catheter for blood pressure measurement and blood sampling was placed into the right carotid artery. Four-millimeter ultrasound Doppler flow probes (Transonic Systems, Ithaca, NY) were placed around the left carotid artery and the left femoral artery. A midline minilaparotomy was performed and a large-bore intraperitoneal drain inserted. After preparation, the abdominal incision was closed. Finally, a Foley catheter was inserted transurethraly into the urinary bladder for drainage of urine. During surgery, all animals received 500 mL of Ringer's lactate over 30 mins to replace fluid losses. The correct position of each catheter was controlled by fluoroscopy in the first eight animals. Afterward landmarks were determined.

Study Protocol. After surgical preparation, animals were stabilized for 30 mins. Then baseline measurements were performed and pigs were randomly assigned (n = 8 per group) to a nonseptic control group (CG) or one of three groups in which resuscitation was initiated 6 (Δ T-6 hrs), 12 (Δ T-12 hrs), or 24 (Δ T-24 hrs) hrs after induction of fecal peritonitis. Accordingly, the CG was followed for 72 hrs, and the groups Δ T-6 hrs, Δ T-12 hrs, and Δ T-24 hrs for 54, 60, and 72 hrs, respectively (Fig. 1). Fecal peritonitis was induced by peritoneal instillation of 2 g/kg body weight of autologous feces dissolved in 200 mL warmed glucose 5% solution. Afterward, the intraperitoneal drain remained clamped throughout the experiment.

A protocolized resuscitation was conducted by trained intensivists in all study groups for 48 hrs (see details in Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/A514>). Alternating boli of 150 mL Ringer's lactate and 6% hydroxyethyl starch (130/0.4), norepinephrine, and dobutamine were administered when necessary to reach a mean arterial blood pressure \geq 60 mm Hg, a mixed venous oxygen saturation \geq 50%, urine output \geq 0.5 mL/kg/hr, and arterial lactate levels $<$ 2.0 mmol/L. All animals received piperacillin-tazobactam (Tazobac) 2.25 g, administered every 8 hrs IV during the resuscitation period. The first dose was administered after 6, 12, or 24 hrs of untreated sepsis for groups Δ T-6 hrs, Δ T-12 hrs, and Δ T-24 hrs, respectively. The CG received the first dose of antibiotics 24 hrs after the baseline collection and every 8 hrs for the following 48 hrs. After resuscitation was started, all animals received deep vein thrombosis prophylaxis (continuous IV infusion of 10,000 IU of nonfractionated heparin/24 hrs). See details in Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/A514>. Following 48 hrs of resuscitation, study animals were deeply sedated and euthanized with an overdose of potassium chloride.

Monitoring. Hemodynamics, temperature, and respiratory variables were monitored

throughout the study using a multimodal patient monitor (S/5 Critical Care Monitor; Datex-Ohmeda, GE Healthcare, Helsinki, Finland). Continuous thermodilution cardiac output (L/min), mixed venous oxygen saturation (Vigilance; Edwards Lifesciences LLC, Irvine, CA), and carotid and femoral artery blood flows (TS 420 double-channel flowmeters; Transonic Systems, Ithaca, NY) were measured continuously. Data were recorded in a software for data acquisition and signal analysis (Soleasy; National Instruments Corp, Austin, TX) and in an electronic patient data management system (Centricity Clinisoft; GE Healthcare).

Blood Sampling. Techniques and time points of blood sampling for determination of blood gases, arterial lactate, electrolytes, hemoglobin, platelets, and inflammatory markers are described in Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/A514>.

Mitochondrial Function Analysis. At baseline, before starting resuscitation, and at the end of the experiment, samples were taken from the right quadriceps muscle to assess mitochondrial function. Additional tissue samples were taken from the brain, liver, and heart at the end of the experiment (after 54 hrs in group Δ T-6 hrs, 60 hrs in Δ T-12 hrs, and 72 hrs in Δ T-24 hrs and controls). In animals that died earlier, the final samples were taken when the animals were still alive, receiving the maximal norepinephrine dose of 1000 μ g/hr, and when mean arterial blood pressure approached 30 mm Hg. Isolation of skeletal muscle and liver mitochondria was performed as described previously (24) (see details in Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/A514>). Preparation of permeabilized skeletal muscle and heart fibers and isolation of heart and brain mitochondria were performed immediately after tissue harvesting, as described in the Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/A514>. Oxygen consumption was measured using

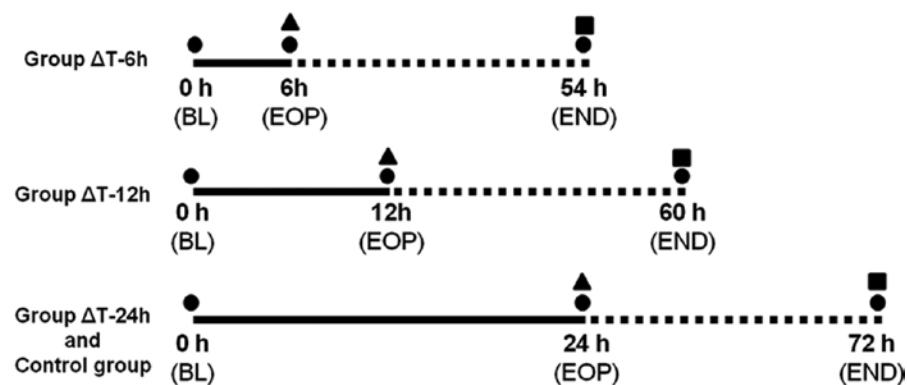


Figure 1. Study design. BL, baseline; EOP, end of observation period; End, end of the experiment (at 48 hrs of resuscitation or before death if earlier); black line, observation period, dotted line, resuscitation period of 48 hrs; black circles, samples from the right quadriceps muscle to assess mitochondrial function; black triangles, first dose of intravenous antibiotic (piperacillin/tazobactam, 2.25 g, 8-hrly); black square, additional tissue samples from the brain, liver and heart for mitochondrial function analysis at the end of the experiment (54, 60, or 72 hrs respectively for groups Δ T-6 hrs, Δ T-12 hrs, Δ T-24 hrs, and control group or before death, if earlier).

high-resolution respirometry (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) and is expressed as pmol/sec/mg mitochondrial protein. State 3 represents active respiration after addition of adenosine diphosphate and state 4 represents the respiration after depletion of adenosine diphosphate. The respiratory control ratio (s calculated by dividing the state 3 by the state 4 respiration rate.

Statistical Analysis. All data are presented as mean \pm SD or median values with interquartile ranges in case of non-normal distribution (tested by the Kolmogorov-Smirnov test). All baseline data, fluids, vasoactive drugs, sedation, fluid balance, skeletal muscle adenosine triphosphate (ATP) content at the end as well as liver, heart, and brain mitochondrial respiration were compared between groups using a one-way analysis of variance followed by the Tukey or independent *t* test. In case of non-normal distribution of study variables, the Kruskal-Wallis or Mann-Whitney *U* test was applied. Survival proportions between groups were analyzed with the log rank test. Proportions between groups were analyzed with chi-square for trends.

Time differences between groups were assessed by an analysis of variance for repeated measurements using *group* as the

between-subject factor and *time* as the within-subject factor. One-way analysis of variance was used at the end of the observation period if a time-group interaction was detected and at the end of the experiment (at 48 hrs of resuscitation or before death if earlier). In case of a significant time effect, significant differences were localized by *post hoc* paired parametric or nonparametric tests, as appropriate. To account for testing twice, the significance level was reduced from .05 to .025. Plasma interleukin-6 values were compared using log-transformed values. The Statistical Package for Social Sciences version 18.0 (SPSS, Chicago, IL) was used for statistical analysis.

RESULTS

Mortality. All animals in the control and the ΔT -6 hrs group survived, whereas two animals (25%) in the ΔT -12 hrs group and three animals (37.5%) in the ΔT -24 hrs group died during the resuscitation period ($p = .08$). Time to death after initiation of resuscitation was 48.0 (± 0.0), 42.8 (± 10.1), and 36.3 (± 16.5) hrs for groups ΔT -6 hrs, ΔT -12 hrs, and ΔT -24 hrs, respectively. Time to death after

peritonitis induction was 54.0 (± 0.0), 54.8 (± 10.1), and 60.3 (± 16.5) hrs, respectively, for groups ΔT -6 hrs, ΔT -12 hrs, and ΔT -24 hrs.

Inflammatory Response. Interleukin-6 plasma levels increased from baseline to the end of the observation period in all septic groups, and TNF- α concentrations increased in the ΔT -12 hrs and ΔT -24 hrs groups (Fig. 2). Cytokine plasma levels decreased during the resuscitation period in all septic groups (all $p < .01$).

Treatment Intensity. Animals assigned to the ΔT -24 hr group received significantly more fluid boli than animals in the ΔT -6 hr group ($p = .03$). The cumulative fluid balance was higher in the ΔT -12 hr and ΔT -24 hr groups ($p < .01$) (Table 1 and Fig. 3). During the resuscitation period, norepinephrine was administered to two animals (25%) of the CG, four (50%) in the ΔT -6 hr group, five (62.5%) in the ΔT -12 hr group, and six (75%) in the ΔT -24 hr group ($p = .04$). Doses of administered norepinephrine and dobutamine are shown in Table 1.

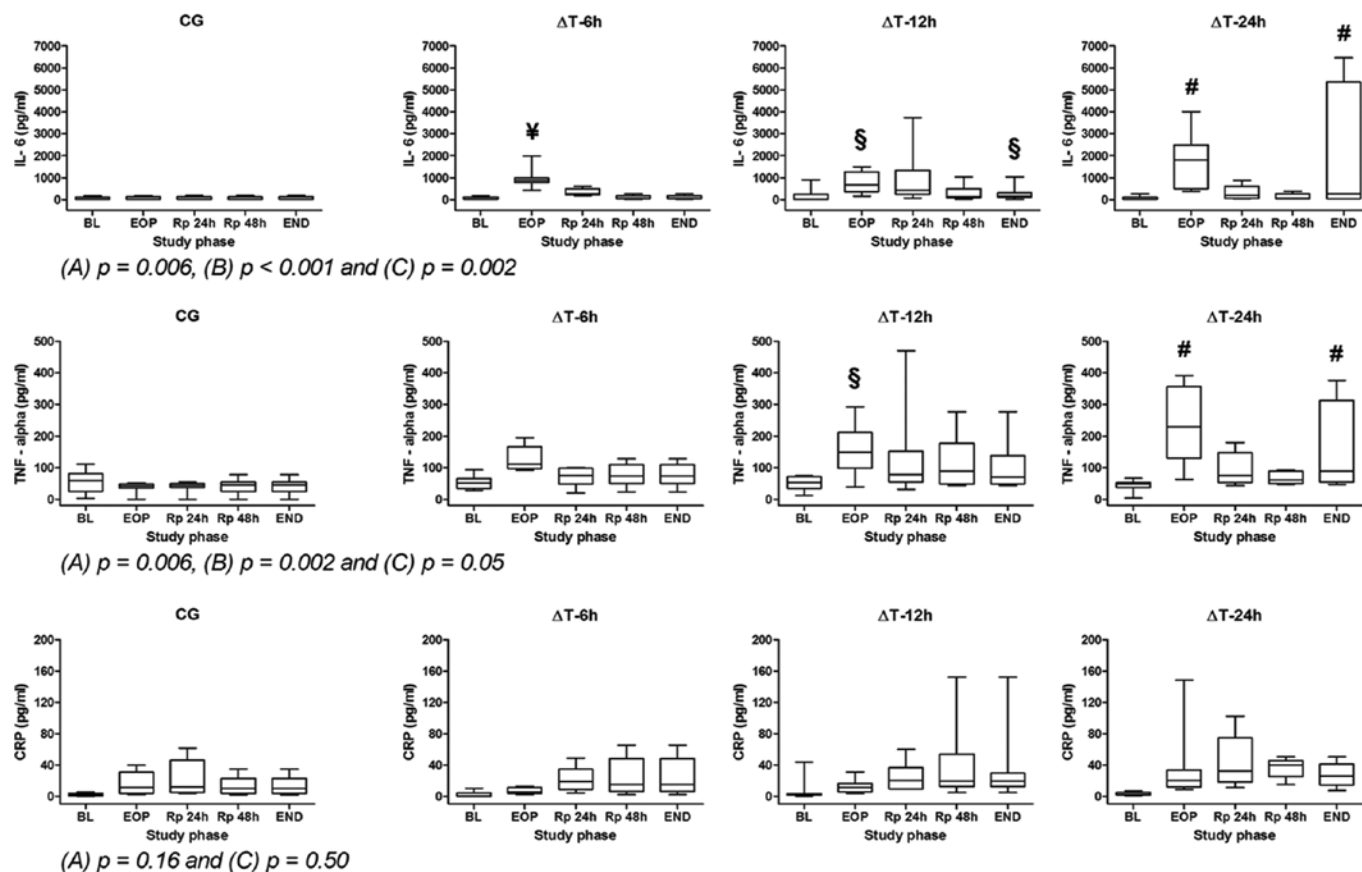


Figure 2. Box plots of inflammatory markers during the study period and at the end of the experiment. CG, control group; BL, baseline; EOP, end of the observation period; RP, resuscitation period; IL-6, plasma interleukin-6 levels; TNF- α , plasma tumor necrosis factor α level; CRP, plasma C-reactive protein level; *p* value: (A) time-group interaction with ANOVA (analysis of variance) for repeated measurements, including BL, EOP, RP 24 hrs and RP 48 hrs, (B) one-way ANOVA at EOP, and (C) one-way ANOVA at the end of the experiment. Tukey *post hoc* test after ANOVA: comparisons significant at the .05 level: ¥ ΔT -6 hrs vs. CG; \$ ΔT -12 hrs vs. CG; # ΔT -24 hrs vs. CG.

Table 1. Administered treatment, fluid output, and balance during the study

Variables/Study Group	Control Group	ΔT-6 hrs	ΔT-12 hrs	ΔT-24 hrs	<i>p</i>
Propofol (mg/kg/hr)	6.7 ± 0.3	6.0 ± 1.4	6.0 ± 0.9	5.3 ± 0.8	.06 ^a
Midazolam (mg/kg/hr)	0.09 ± 0.04	0.05 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.05 ± 0.01	.07 ^a
Fentanyl (μg/kg/hr) ^f	2.9 ± 1.0	5.2 ± 1.6 ^b	6.0 ± 1.3 ^c	6.0 ± 1.8 ^d	<.01 ^e
Fluid bolus (mL/kg/hr) ^f	0.35 ± 0.49	0.56 ± 0.38	1.60 ± 0.93	3.50 ± 3.61 ^{d,e}	.03 ^a
Ringer's lactate bolus	0.17 ± 0.23	0.30 ± 0.19	0.90 ± 0.57	2.43 ± 3.03	
Hydroxyethyl starch bolus	0.18 ± 0.26	0.26 ± 0.19	0.70 ± 0.37	1.07 ± 0.91	
Total volume received (mL/kg/hr)	3.2 ± 0.4	3.5 ± 0.2	4.2 ± 0.7	4.6 ± 1.4 ^{d,e}	.01 ^a
Urine output (mL/kg/hr)	1.7 ± 0.7	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.2 ^c	1.1 ± 0.2 ^d	.02 ^a
Gastric tube output (mL/kg/hr) ^g	0.4 ± 0.4	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.2	.31 ^a
Cumulative fluid balance (mL/kg/hr) ^h	1.1 ± 0.9	2.1 ± 0.5	2.8 ± 0.7 ^c	3.2 ± 1.5 ^d	<.01 ^a
Cumulative fluid balance (L) ^h	3.2 ± 2.5	4.8 ± 1.2	6.2 ± 2.2 ^c	6.7 ± 1.5 ^d	<.01 ^a
Norepinephrine (μg/kg/min) ⁱ	0.00 ± 0.01	0.02 ± 0.04	0.06 ± 0.09	0.13 ± 0.15	.06 ^j
Dobutamine (μg/kg/min) ⁱ	0.18 ± 0.50	0.0 ± 0.0	0.25 ± 0.28	0.53 ± 1.09	.13 ^j

^aOne-way analysis of variance. Tukey *post hoc* test after analysis of variance; comparisons significant at the .05 level: ^bΔT-6 hrs vs. control group (CG); ^cΔT-12 hrs vs. CG; ^dΔT-24 hrs vs. CG; ^eΔT-24 hrs vs. ΔT-6 hrs; ^fsum of basic infusion with additional bolus; ^gdata available for 28 pigs; ^hfinal balance = (Ringer's lactate basal infusion + G 50% basal infusion + Ringer's lactate bolus + hydroxyethyl starch bolus) - (urine output + gastric tube output); ⁱadministered during the resuscitation period; ^jKruskal-Wallis test.

Values are expressed as mean ± SD.

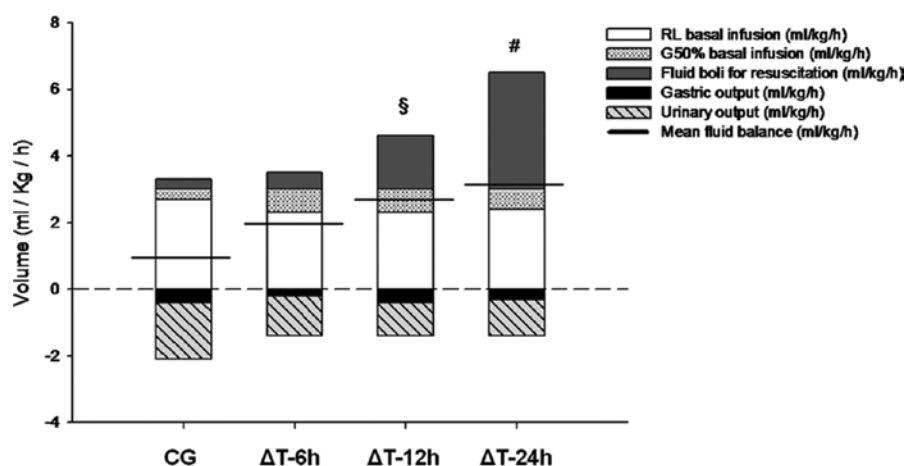


Figure 3. Continuous and bolus fluid administration, urinary and gastric output, and cumulative fluid balance in mL/kg/hr during the study period. *RL*, Ringer's lactate; *G 50%*, glucose 50%; Fluid balance $p < .05$ (Tukey *post hoc* test after analysis of variance) for [§]group ΔT-12 hrs vs. CG and [#]ΔT-24 hrs vs. CG.

Hemodynamic, Respiratory, and Renal Variables. All septic animals became hyperdynamic during the resuscitation period, with the highest cardiac index values observed in the ΔT-12 hr and ΔT-24 hr groups ($p < .001$, for time-group interaction; Table 2). There were no differences between the groups in mean arterial pressure ($p = .178$). Arterial blood gases and respiratory variables are displayed in Supplemental Tables S1 and S2, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/CCM/A516>. During the observation period, arterial lactate decreased in controls, whereas it increased in septic animals ($p = .002$ for time-group interaction). The highest lactate levels were observed in the ΔT-24 hr group at the end of the

observation period ($p = .002$). During the resuscitation period, arterial lactate levels decreased in all groups (Table 2).

Urine output was lower in the ΔT-12 hr and ΔT-24 hr groups than in the control and ΔT-6 hr groups throughout the study (Table 1 and Fig. 3). Group differences in serum creatinine levels at the end of the observation period ($98 \pm 14 \mu\text{mol/L}$, $94 \pm 13 \mu\text{mol/L}$, $99 \pm 42 \mu\text{mol/L}$, and $122 \pm 63 \mu\text{mol/L}$, respectively, for the control, ΔT-6 hr, ΔT-12 hr, and ΔT-24 hr groups; $p = .493$) and at the end of the experiment ($94 \pm 12 \mu\text{mol/L}$, $102 \pm 33 \mu\text{mol/L}$, $158 \pm 156 \mu\text{mol/L}$, and $169 \pm 130 \mu\text{mol/L}$, respectively; $p = .38$) did not reach statistical significance.

Mitochondrial Function. The only sepsis-associated alteration before resus-

citation was increased skeletal muscle complex I respiratory control ratio after 12 hrs (time effect, $p = .021$), but not after 6 or 24 hrs. This was mainly due to decreased state 4 respiration (see details in Supplemental Fig. S1, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/CCM/A516>). Skeletal muscle complex II state 4 ($p = .01$) and state 3 ($p = .008$) respiration decreased in all groups before resuscitation—also in controls (Table 3). During resuscitation, complex II state 4 and 3 respiration increased again in all groups. Similarly, complex IV state 3 respiration increased in all groups ($p = .001$; see details in Supplemental Table S3; Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/CCM/A516>). ATP concentrations tended to increase during the observation period ($p = .082$) and decreased thereafter in all groups ($p < .001$; Fig. 4). At the end, skeletal muscle ATP concentrations were lower in groups ΔT-12 hrs and ΔT-24 hrs compared to CG ($p < .04$; Fig. 4). At the same time, brain mitochondrial complex II state 3 respiration was decreased in ΔT-24 hrs ($p = .048$; Fig. 5). In contrast, skeletal muscle permeabilized fiber (see details in Supplemental Table S4, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/A516>) and hepatic and myocardial mitochondrial respiration (see details in Supplemental Figs. S2 and S3, Table S5; Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/CCM/A516>) did not differ between groups.

DISCUSSION

The main finding of our study was that delaying resuscitation in an experimental sepsis model increased the need for fluid resuscitation and vasopressor requirements, resulted in more severe organ dysfunction, reduced complex II-dependent state 3 brain mitochondrial respiration, and increased mortality. The lack of mortality difference between groups in which resuscitation was started later than 6 hrs following peritonitis induction emphasizes the narrow window of opportunity in sepsis treatment. Early goal-directed hemodynamic treatment is likely to improve outcome in clinical sepsis. Our results indicate that even when such treatment is given, a delay in initiating resuscitation after sepsis onset has a major impact on the clinical course and outcome of sepsis.

Application of results from experimental sepsis to clinical sepsis must be done with caution, particularly when they differ

Table 2. Systemic and regional hemodynamics and arterial lactate level

Variables	Group	Baseline	End of Observation					End	p
			Period	RP 12 hrs	RP 24 hrs	RP 36 hrs	RP 48 hrs		
Heart rate (beats/min)	CG	108 ± 29	94 ± 12	86 ± 18	85 ± 15	80 ± 12	79 ± 12	79 ± 12	
	ΔT-6 hrs	102 ± 25	135 ± 26 ^b	144 ± 11	157 ± 22	142 ± 24	123 ± 22	123 ± 22 ^b	<.001 ^a
	ΔT-12 hrs	94 ± 12	165 ± 31 ^c	171 ± 22	161 ± 26	143 ± 30	142 ± 22	153 ± 29 ^c	<.001 ^h
	ΔT-24 hrs	90 ± 15	190 ± 27 ^{d,e}	188 ± 34	153 ± 21	128 ± 17	119 ± 17	150 ± 45 ^d	<.001 ⁱ
Mean arterial pressure (mm Hg)	CG	96 ± 15	78 ± 21	77 ± 12	82 ± 21	71 ± 11	65 ± 15	65 ± 15	
	ΔT-6 hrs	81 ± 15	76 ± 9	82 ± 7	73 ± 12	66 ± 7	67 ± 7	67 ± 7	.178 ^a
	ΔT-12 hrs	87 ± 10	85 ± 17	82 ± 19	73 ± 12	70 ± 17	68 ± 9	59 ± 18	.509 ⁱ
	ΔT-24 hrs	92 ± 8	67 ± 13	66 ± 13	70 ± 5	71 ± 3	70 ± 4	56 ± 19	
Mean pulmonary artery pressure (mm Hg)	CG	15 ± 3	15 ± 3	15 ± 3	16 ± 3	16 ± 4	19 ± 4	19 ± 4	
	ΔT-6 hrs	13 ± 1	16 ± 2	16 ± 3	16 ± 5	17 ± 4	18 ± 5	18 ± 5	.004 ^a
	ΔT-12 hrs	15 ± 5	20 ± 4 ^c	19 ± 3	22 ± 5	25 ± 4	25 ± 3	24 ± 3 ^{c,f}	.014 ^h
	ΔT-24 hrs	16 ± 6	16 ± 3	20 ± 5	20 ± 3	20 ± 4	21 ± 4	22 ± 4	.012 ⁱ
Central venous pressure (mm Hg)	CG	3 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	5 ± 2	5 ± 2	
	ΔT-6 hrs	4 ± 1	3 ± 2	3 ± 2	4 ± 3	6 ± 3	8 ± 3	8 ± 3	.006 ^a
	ΔT-12 hrs	4 ± 1	2 ± 2	4 ± 3	4 ± 2	6 ± 3	7 ± 3	8 ± 3	.026 ^h
	ΔT-24 hrs	5 ± 4	2 ± 1 ^d	2 ± 2	5 ± 1	6 ± 2	7 ± 2	6 ± 2	.160 ⁱ
Systemic vascular resistance index (mm Hg L/kg/min)	CG	731 ± 132	583 ± 146	589 ± 124	633 ± 181	566 ± 145	561 ± 129	561 ± 129	
	ΔT-6 hrs	620 ± 150	638 ± 147	689 ± 134	561 ± 131	402 ± 120	398 ± 81	398 ± 81 ^b	<.001 ^a
	ΔT-12 hrs	623 ± 109	749 ± 169	633 ± 175	478 ± 166	409 ± 119	397 ± 79	356 ± 103 ^c	.183 ^h
	ΔT-24 hrs	679 ± 164	641 ± 132	486 ± 123	386 ± 64	448 ± 62	372 ± 73	332 ± 79 ^e	<.001 ⁱ
Cardiac index (mL/kg/min)	CG	128 ± 15	126 ± 18	127 ± 22	124 ± 15	122 ± 26	107 ± 20	107 ± 20	
	ΔT-6 hrs	126 ± 12	119 ± 34	119 ± 21	125 ± 24	157 ± 35	151 ± 28	151 ± 28	<.001 ^a
	ΔT-12 hrs	135 ± 15	113 ± 25	125 ± 16	152 ± 33	161 ± 44	158 ± 43	142 ± 48	.297 ^h
	ΔT-24 hrs	133 ± 24	104 ± 15	134 ± 29	173 ± 27	147 ± 19	173 ± 29	150 ± 40	.075 ⁱ
Mixed venous oxygen saturation (%)	CG	58 ± 7	56 ± 9	58 ± 6	59 ± 6	58 ± 8	60 ± 10	60 ± 10	
	ΔT-6 hrs	55 ± 6	57 ± 6	67 ± 4	60 ± 5	61 ± 5	62 ± 6	62 ± 6	.003 ^a
	ΔT-12 hrs	56 ± 11	63 ± 10	63 ± 6	63 ± 6	61 ± 10	61 ± 10	55 ± 15	.242 ^h
	ΔT-24 hrs	51 ± 8	55 ± 7	57 ± 10	63 ± 5	70 ± 8	71 ± 10	57 ± 23	.801 ⁱ
Carotid artery flow index (mL/kg/min)	CG	8.6 ± 1.7	9.9 ± 3.0	9.4 ± 2.4	9.3 ± 4.1	8.5 ± 3.9	8.6 ± 4.3	8.6 ± 4.3	
	ΔT-6 hrs	6.8 ± 3.0	4.7 ± 2.0 ^b	5.1 ± 1.8	5.5 ± 1.6	6.9 ± 2.1	6.4 ± 2.1	6.4 ± 2.1	.051 ^a
	ΔT-12 hrs	8.1 ± 1.2	6.4 ± 1.8 ^c	7.6 ± 2.2	7.8 ± 3.7	8.8 ± 5.0	8.8 ± 3.4	7.8 ± 3.4	<.001 ^h
	ΔT-24 hrs	8.1 ± 1.9	5.5 ± 1.2 ^d	6.7 ± 1.3	8.2 ± 1.4	7.3 ± 1.7	6.6 ± 1.4	6.0 ± 1.9	.313 ⁱ
Femoral artery flow index (mL/kg/min)	CG	5.1 ± 1.4	4.5 ± 2.2	4.3 ± 2.6	4.4 ± 2.7	4.1 ± 2.3	4.0 ± 2.5	4.0 ± 2.5	
	ΔT-6 hrs	4.3 ± 1.5	2.6 ± 0.9	2.4 ± 1.3	2.3 ± 0.8	3.4 ± 1.2	3.3 ± 1.0	3.3 ± 1.0	.085 ^a
	ΔT-12 hrs	4.0 ± 1.0	2.3 ± 0.5	2.6 ± 0.4	2.9 ± 1.3	3.5 ± 1.7	3.3 ± 1.2	3.0 ± 1.1	.280 ⁱ
	ΔT-24 hrs	4.9 ± 2.0	1.9 ± 0.5	2.0 ± 0.3	3.0 ± 0.5	2.8 ± 0.6	2.6 ± 0.7	2.5 ± 1.0	
Arterial lactate (mmol/L)	CG	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	
	ΔT-6 hrs	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.3	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2	.002 ^a
	ΔT-12 hrs	0.8 ± 0.2	1.2 ± 0.4	0.9 ± 0.3	1.1 ± 0.4	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.6 ± 1.7	.002 ^h
	ΔT-24 hrs	0.9 ± 0.2	2.4 ± 1.2 ^{d,e,g}	1.9 ± 1.0	1.3 ± 0.5	1.3 ± 0.4	0.9 ± 0.3	2.4 ± 2.7	.123 ⁱ

CG, control group; RP, resuscitation period.

^aTime-group interaction with ANOVA for repeated measurements, including baseline, end of observation period, RP 12 hrs, RP 24 hrs, RP 36 hrs, and RP 48 hrs; Tukey post hoc test after analysis of variance (ANOVA): comparisons significant at the .05 level: ^bΔT-6 hrs vs. CG; ^cΔT-12 hrs vs. CG; ^dΔT-24 hrs vs. CG; ^eΔT-24 hrs vs. ΔT-6 hrs; ^fΔT-12 hrs vs. ΔT-6 hrs; ^gΔT-24 hrs vs. ΔT-12 hrs; ^hone-way ANOVA at end of observation period; ⁱone-way ANOVA at the end.

Values are expressed as mean ± sd.

from common clinical scenarios. Examples include studies with brief exposure to peritonitis (25–27), those starting supportive care immediately after peritonitis induction (24, 28–32), and variable use of catecholamines (28, 30, 33). With the exception of needing to maintain anesthesia while peritonitis developed, we attempted to reproduce the typical clinical scenario of sepsis in this experimental model. We used an experimental intensive care unit setting, with trained intensivists performing the resuscitation, using a protocolized resuscitation including administration of antibiotics in the first hour of resuscitation, fluids, catecholamines, respiratory care, tight glucose control, and prophylaxis against deep vein thrombosis.

Both animal (34, 35) and human (36, 37) data suggest that early, adequate antibiotic treatment improves survival in sepsis and septic shock. In these studies, timing of antibiotics was separately addressed, while we started all “bundles” of resuscitation at the same time. Therefore, in our study, we are not able to evaluate specific effects of single interventions such as antibiotics, fluids, or vasoactive drugs. The early administration of the aforementioned “bundles” of interventions rather than every single intervention alone had a positive impact on the outcome.

The ranges of administered amounts of fluids and vasopressors in our model were similar to those reported in large randomized controlled trials with septic

patients being treated with a goal-directed protocol for early resuscitation (38, 39). However, the exposure to catecholamines and fluids in our study varied according to the delay between sepsis onset and initiation of resuscitation. Persisting oliguria despite and together with more fluids in ΔT-12 hrs and ΔT-24 hrs groups resulted in enhanced positive fluid balances. Experimental (24) and clinical studies (18, 40, 41) have shown that positive fluid balance is associated with worse outcomes in severe sepsis, septic shock, and acute lung injury. Hypotension refractory to fluids and maximal doses of vasopressors developed only in study animals whose treatment was started with >6 hrs delay. The attempts to restore

Table 3. Complex II-dependent isolated muscle mitochondrial respiration

Variables	Group	BL	EOP	End	<i>p</i>	Paired <i>t</i> test ^a
Succinate State 3	CG	2241 ± 598	1975 ± 748	2266 ± 866		
	ΔT-6 hrs	2222 ± 629	1900 ± 734	1889 ± 782	.31 ^b	BL vs. EOP: <i>p</i> = .002
	ΔT-12 hrs	1996 ± 656	1736 ± 363	1969 ± 1180	.008 ^c	EOP vs. End: <i>p</i> = .039
State 4	CG	2464 ± 809	1259 ± 861	2053 ± 856	.8 ^d	
	ΔT-6 hrs	363 ± 148	329 ± 112	450 ± 200		
	ΔT-12 hrs	317 ± 84	329 ± 192	296 ± 144	.22 ^b	BL vs. EOP: <i>p</i> = .010
Respiratory control ratio	CG	356 ± 163	260 ± 84	364 ± 212	.01 ^c	EOP vs. End: <i>p</i> = .012
	ΔT-24 hrs	355 ± 150	188 ± 109	347 ± 202	.56 ^d	
	CG	6.7 ± 2.1	6.1 ± 1.3	5.4 ± 2.0		
Respiratory control ratio	ΔT-6 hrs	7.2 ± 1.2	6.5 ± 1.8	6.7 ± 1.3	.74 ^b	
	ΔT-12 hrs	6.2 ± 2.2	6.9 ± 1.1	5.8 ± 1.8	.22 ^c	
	ΔT-24 hrs	7.4 ± 1.5	6.5 ± 1.5	6.7 ± 1.7	.35 ^d	

CG, control group, BL, baseline, EOP, end of observation period.

^aPaired *t* test: because there was no time-group interaction, paired *t* tests were conducted on the pooled data from all groups and BL was compared to the EOP and EOP to the end; ^btime-group interaction with analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements; ^ctime effect with repeated measures ANOVA; ^dgroup effect with ANOVA for repeated measurements.

Values are expressed as mean ± SD. State 3 represents active respiration after addition of adenosine diphosphate and state 4 represents the respiration after depletion of adenosine diphosphate. The respiratory control ratio is calculated by dividing the state 3 by the state 4 respiration rate.

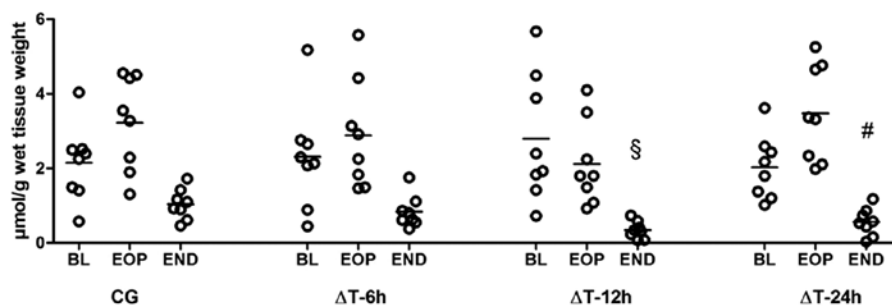


Figure 4. Skeletal muscle adenosine triphosphate content. Skeletal muscle tissue adenosine triphosphate concentrations in septic and control animals. Time effect: *p* < .001. One-way analysis of variance for end samples: *p* = .002. Tukey *post hoc* test after analysis of variance: [§]ΔT-12 hrs vs. control group (CG) (*p* = .001) and [#]ΔT-24 hrs vs. CG (*p* = .034). BL, baseline; EOP, end of observation period; End, end of the experiment.

hemodynamic stability in these animals resulted in a higher cumulative fluid balance and lower Pao₂/Fio₂ ratios, suggesting that, aside from progression of sepsis severity, greater treatment intensity could have contributed to the progression of lung dysfunction. It is possible that the increased amounts of vasopressors and inotropes administered to these animals further contributed to the development of myocardial dysfunction (23).

Mitochondrial dysfunction has been observed both in experimental and in clinical sepsis, although its relevance to organ dysfunction and death remains controversial (24, 29, 42–45). The only sepsis-associated alteration before resuscitation was increased skeletal muscle complex I respiratory control ratio after 12 hrs, suggesting transiently increased efficiency of mitochondrial complex I respiration, because it was neither (not yet) present after 6 hrs nor (not any more) after 24 hrs

in this study period. Other mitochondrial abnormalities before resuscitation were similar in septic and control animals, suggesting an effect of surgery and/or anesthesia rather than of sepsis. However, after resuscitation, maximal respiration of brain complex II was reduced in the study group with 24-hr delay in resuscitation. Impaired brain mitochondrial respiration has been described after 24 hrs of cecal ligation and perforation in mice (42), and evidence of proton leakage through the inner mitochondrial membrane, and reduction in content and activity of cytochromes provided (42). In similar models in rats, brain mitochondrial respiratory chain activity of complex I was reduced and activity of succinate dehydrogenase decreased (46) and apoptosis increased (47). Because we did not measure further aspects of mitochondrial functions, we are not in the position to propose mechanistic explanations for our findings. We

found decreased skeletal muscle ATP levels in all groups after resuscitation; these levels were lowest in groups with 12- and 24-hr resuscitation delays. As we related ATP content to wet rather than to dry weight, the significant weight gain in all animal groups as a result of resuscitation and maintenance fluids along with fluids for drug infusions may have confounded our results. A decrease in ATP content of roughly 15% has also been described during long-term anesthesia in healthy animals (48), possibly related to decreased perfusion of skeletal muscle (49). Nevertheless, decreased tissue ATP concentrations in septic rodents and pigs have been described, and arguments for substrate deficiency, exaggerated ATP hydrolysis, and decreased mitochondrial mass presented (50–52). In critically ill patients with sepsis and multiple organ failure, skeletal muscle mitochondrial enzyme activities were reduced and concentrations of ATP and creatine phosphate decreased (53). Interestingly, the changes in enzyme activities were only present when the activities were expressed per muscle weight and not when expressed per citrate synthase activity, suggesting decreased mitochondrial density rather than specific inhibition of the measured enzymes. Reduced mitochondrial density would explain our findings of maintained skeletal muscle mitochondrial respiration but decreased tissue ATP concentrations in groups with late-onset resuscitation compared to controls.

In contrast to the brain, hepatic and myocardial mitochondrial respiration appeared unchanged. Other experimental studies have reported organ-specific differences in mitochondrial function in sepsis (44, 54–56), e.g., impaired respiration in the heart but not in the kidney (55), in the liver but not in the heart (52), in the liver but neither in the kidney nor in skeletal muscle (44), or in small bowel mucosa but not in the muscular layer (56). Changes in mitochondrial function vary between sepsis models and according to duration of insult, and reports have often been contradictory (24, 56, 57). Nevertheless, taken together, the available experimental data suggest that tissue ATP concentrations decrease in sepsis, probably dependent on the severity of the insult and the type of treatment, and with significant variability among species.

Our study has important limitations. Because of the different time intervals for nonresuscitated sepsis, and the subsequently varying time points for blood

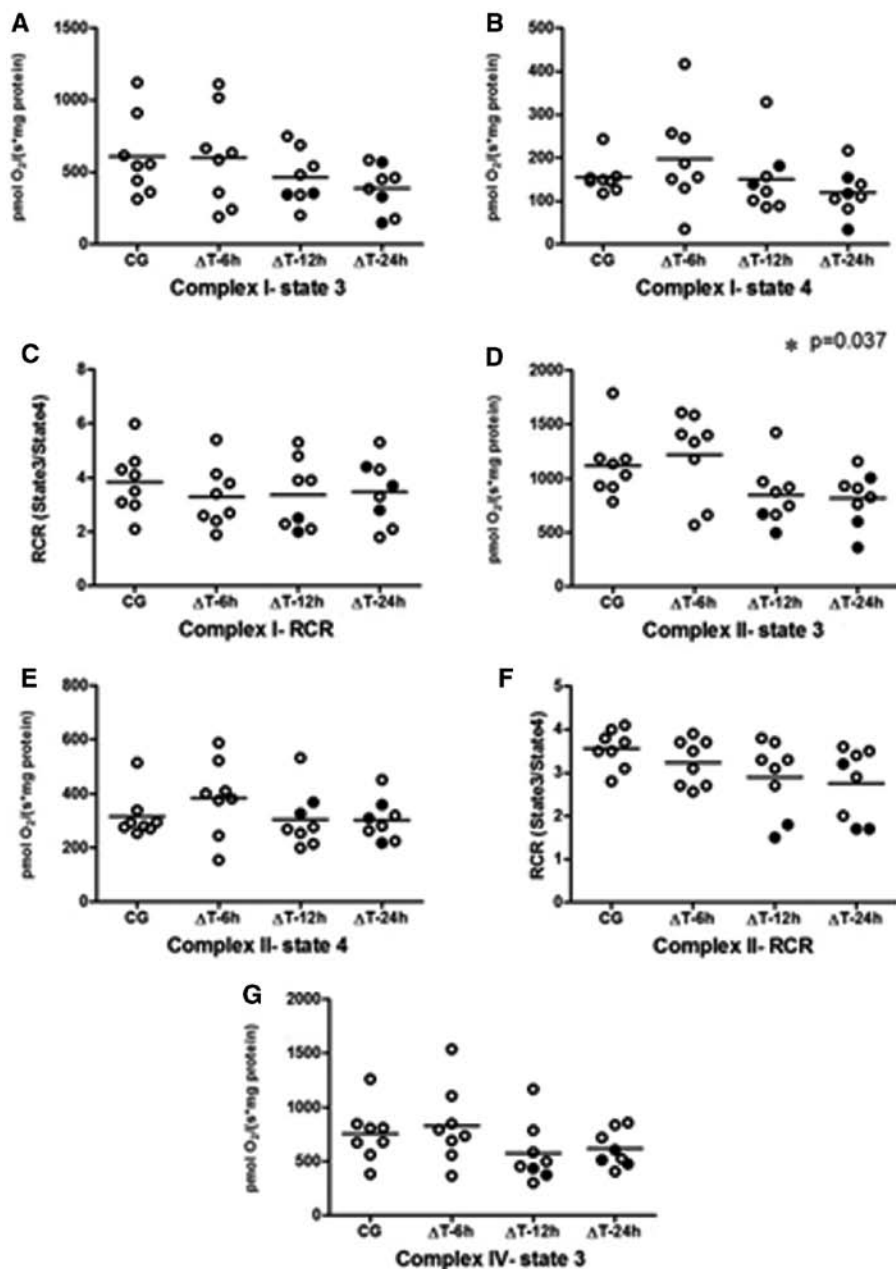


Figure 5. Comparison of isolated brain mitochondrial respiration in (a–g) control and septic animals resuscitated at 6, 12, and 24 hrs after fecal peritonitis induction. State 3 represents active respiration after addition of adenosine diphosphate and State 4 represents the respiration after depletion of adenosine diphosphate. The respiratory control ratio (RCR) is calculated by dividing the state 3 by the state 4 respiration rate. State 3 and 4 oxygen consumption is expressed as pmol/sec/mg protein. RCR = oxygen consumption of state 3/state 4; *one-way analysis of variance; §independent *t* test; *p* = .048 for control group (CG) vs. ΔT-24 hrs. The black horizontal bars represent the mean values. Filled circles represent animals that died early.

and tissue sampling, it was not possible to blind the investigators with respect to the different experimental groups. As the same strict monitoring and treatment protocol was used in all groups, we believe that this had only minimal consequences, if any. One important difference between the present study and clinical practice is the precise control of the time span between sepsis initiation and start of resuscitation.

In clinical practice (and human research), the point at which sepsis begins is usually less precisely known, and treatment (study inclusion) starts only on arrival in the hospital or intensive care unit. Thus, extrapolation of our results to clinical practice has to be tempered by this fact. Furthermore, we used an adapted lower limit for mixed venous oxygen saturation, accounting for the relatively low hemoglobin values in

young pigs. Therefore, our hemodynamic protocol differed from protocols described for clinical purposes (38, 39). The support of ventilation and basal supply of fluids during development of peritonitis may have ameliorated the sepsis-induced changes. Surgery and prolonged anesthesia *per se* induces hemodynamic changes and may interfere with organ and mitochondrial function. We measured only mitochondrial respiration and not other aspects of mitochondrial function, and assessed ATP only in the skeletal muscle and in relation to wet rather than to dry weight. We chose this approach for practical reasons, including the feasibility of repeated sampling. Furthermore, most of the clinical data are based on muscle samples. Finally, there are no standards for how to measure and present organ dysfunction in animal research, which makes it difficult to compare our results to data reported by others (58).

CONCLUSIONS

In our porcine model of fecal peritonitis, a time interval <12 hrs from onset of sepsis to start of resuscitation was critical for prevention of organ dysfunction and mortality. The time elapsed between sepsis onset and start of resuscitation had important effects on treatment intensity—with increasing amounts of fluids and catecholamines needed to stabilize hemodynamic function—and on the intensity of the inflammatory response after resuscitation. Whether more intense treatment was beneficial or rather induced mitochondrial or organ dysfunction must be evaluated in future studies.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Olgica Beslac, Daniel Mettler, Daniel Zalokar, Natalie Araya Araya, Torsten Konrad, Colette Boillat, Sandra Nansoz, Matthias Hänggi, Tobias Merz, Stephan Bloechlinger, Christian Schmittinger, Christian Torgensen, Stepani Bendel, Reto Etter, Jan Wiegand, Fritz Daudel, David Berger, and Lukas Brander for their assistance during the experiments.

REFERENCES

1. Weycker D, Akhras KS, Edelsberg J, et al: Long-term mortality and medical care charges in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2003; 31:2316–2323
2. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, et al: Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 2007; 35:1244–1250

3. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al; 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
4. Vincent JL, Rello J, Marshall J, et al; EPIC II Group of Investigators: International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 2009; 302:2323–2329
5. Beale R, Reinhart K, Brunkhorst FM, et al; PROGRESS Advisory Board: Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): Lessons from an international sepsis registry. *Infection* 2009; 37:222–232
6. Solomkin JS, Mazuski JE, Bradley JS, et al: Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: Guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. *Surg Infect (Larchmt)* 2010; 11:79–109
7. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al; International Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee; American Association of Critical-Care Nurses; American College of Chest Physicians; American College of Emergency Physicians; Canadian Critical Care Society; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; European Society of Intensive Care Medicine; European Respiratory Society; International Sepsis Forum; Japanese Association for Acute Medicine; Japanese Society of Intensive Care Medicine; Society of Critical Care Medicine; Society of Hospital Medicine; Surgical Infection Society; World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine: Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 2008; 36:296–327
8. Russell JA, Singer J, Bernard GR, et al: Changing pattern of organ dysfunction in early human sepsis is related to mortality. *Crit Care Med* 2000; 28:3405–3411
9. Abraham E, Singer M: Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med* 2007; 35:2408–2416
10. Vincent JL, De Backer D: Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. *Crit Care* 2005; 9 Suppl 4:S9–12
11. Ospina-Tascon G, Neves AP, Occhipinti G, et al: Effects of fluids on microvascular perfusion in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 2010; 36:949–955
12. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, et al: Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 2002; 360:219–223
13. Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420:885–891
14. Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348:138–150
15. Rivers EP, Jaehne AK, Eichhorn-Wharry L, et al: Fluid therapy in septic shock. *Curr Opin Crit Care* 2010; 16:297–308
16. Dart AB, Mutter TC, Ruth CA, et al: Hydroxyethyl starch (HES) versus other fluid therapies: Effects on kidney function. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 1:CD007594
17. Prowle JR, Bellomo R: Fluid administration and the kidney. *Curr Opin Crit Care* 2010; 16:332–336
18. Wiedemann HP, Wheeler AP, Bernard GR, et al; National Heart, Lung, and Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) Clinical Trials Network: Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. *N Engl J Med* 2006; 354:2564–2575
19. Murphy CV, Schramm GE, Doherty JA, et al: The importance of fluid management in acute lung injury secondary to septic shock. *Chest* 2009; 136:102–109
20. Porta F, Bracht H, Weikert C, et al: Effects of endotoxin and catecholamines on hepatic mitochondrial respiration. *Inflammation* 2009; 32:315–321
21. Regueira T, Bänziger B, Djafarzadeh S, et al: Norepinephrine to increase blood pressure in endotoxaemic pigs is associated with improved hepatic mitochondrial respiration. *Crit Care* 2008; 12:R88
22. De Backer D, Biston P, Devriendt J, et al; SOAP II Investigators: Comparison of dopamine and norepinephrine in the treatment of shock. *N Engl J Med* 2010; 362:779–789
23. Dünser MW, Ruokonen E, Pettilä V, et al: Association of arterial blood pressure and vasopressor load with septic shock mortality: A post hoc analysis of a multicenter trial. *Crit Care* 2009; 13:R181
24. Brandt S, Regueira T, Bracht H, et al: Effect of fluid resuscitation on mortality and organ function in experimental sepsis models. *Crit Care* 2009; 13:R186
25. Hildebrand LB, Krejci V, Banic A, et al: Dynamic study of the distribution of microcirculatory blood flow in multiple splanchnic organs in septic shock. *Crit Care Med* 2000; 28:3233–3241
26. Hildebrand LB, Krejci V, tenHoevel ME, et al: Redistribution of microcirculatory blood flow within the intestinal wall during sepsis and general anesthesia. *Anesthesiology* 2003; 98:658–669
27. Krejci V, Hildebrand LB, Erni D, et al: Endothelin receptor antagonist bosentan improves microcirculatory blood flow in splanchnic organs in septic shock. *Crit Care Med* 2003; 31:203–210
28. Chvojka J, Sykora R, Krouzecky A, et al: Renal haemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathological responses to peritonitis-induced septic shock in pigs. *Crit Care* 2008; 12:R164
29. Kozlov AV, van Griensven M, Haindl S, et al: Peritoneal inflammation in pigs is associated with early mitochondrial dysfunction in liver and kidney. *Inflammation* 2010; 33:295–305
30. Simon F, Giudici R, Scheuerle A, et al: Comparison of cardiac, hepatic, and renal effects of arginine vasopressin and noradrenaline during porcine fecal peritonitis: A randomized controlled trial. *Crit Care* 2009; 13:R113
31. Taccone FS, Su F, Pierrakos C, et al: Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: An experimental study. *Crit Care* 2010; 14:R140
32. Hauser B, Barth E, Bassi G, et al: Hemodynamic, metabolic, and organ function effects of pure oxygen ventilation during established fecal peritonitis-induced septic shock. *Crit Care Med* 2009; 37:2465–2469
33. Barth E, Bassi G, Maybauer DM, et al: Effects of ventilation with 100% oxygen during early hyperdynamic porcine fecal peritonitis. *Crit Care Med* 2008; 36:495–503
34. Turnbull IR, Javadi P, Buchman TG, et al: Antibiotics improve survival in sepsis independent of injury severity but do not change mortality in mice with markedly elevated interleukin 6 levels. *Shock* 2004; 21:121–125
35. Kumar A, Haery C, Paladugu B, et al: The duration of hypotension before the initiation of antibiotic treatment is a critical determinant of survival in a murine model of Escherichia coli septic shock: Association with serum lactate and inflammatory cytokine levels. *J Infect Dis* 2006; 193:251–258
36. Larché J, Azoulay E, Fieux F, et al: Improved survival of critically ill cancer patients with septic shock. *Intensive Care Med* 2003; 29:1688–1695
37. Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al: Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34:1589–1596
38. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al; Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001; 345:1368–1377
39. Lin SM, Huang CD, Lin HC, et al: A modified goal-directed protocol improves clinical outcomes in intensive care unit patients with septic shock: A randomized controlled trial. *Shock* 2006; 26:551–557
40. Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, et al; PAC/PiCCO Use and Likelihood of Success Evaluation [PULSE] Study Group: Pulmonary artery catheter versus pulse contour analysis: A prospective epidemiological study. *Crit Care* 2006; 10:R174
41. Boyd JH, Forbes J, Nakada TA, et al: Fluid resuscitation in septic shock: A positive fluid balance and elevated central venous pressure are associated with increased mortality. *Crit Care Med* 2011; 39:259–265
42. d'Avila JC, Santiago AP, Amâncio RT, et al: Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction. *Crit Care Med* 2008; 36:1925–1932
43. Kozlov AV, van GM, Haindl S, et al: Organ specific relationship between mitochondrial function and tissue damage in a model of peritonitis in pigs. *Shock* 2006; 26:31
44. Porta F, Takala J, Weikert C, et al: Effects of prolonged endotoxemia on liver, skeletal muscle and kidney mitochondrial function. *Crit Care* 2006; 10:R118
45. Singer M: Mitochondrial function in sepsis: Acute phase versus multiple organ failure. *Crit Care Med* 2007; 35(Suppl 9):S441–S448

46. Comim CM, Rezin GT, Scaini G, et al: Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Mitochondrion* 2008; 8:313–318
47. Messaris E, Memos N, Chatzigianni E, et al: Time-dependent mitochondrial-mediated programmed neuronal cell death prolongs survival in sepsis. *Crit Care Med* 2004; 32:1764–1770
48. Edner A, Essén-Gustavsson B, Nyman G: Muscle metabolic changes associated with long-term inhalation anaesthesia in the horse analysed by muscle biopsy and microdialysis techniques. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2005; 52:99–107
49. Goetz TE, Manohar M, Nganwa D, et al: A study of the effect of isoflurane anaesthesia on equine skeletal muscle perfusion. *Equine Vet J Suppl* 1989; 7:133–137
50. Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, et al: Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286:R491–R497
51. Huang LJ, Hsu C, Tsai TN, et al: Suppression of mitochondrial ATPase inhibitor protein (IF1) in the liver of late septic rats. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1767:888–896
52. Hart DW, Gore DC, Rinehart AJ, et al: Sepsis-induced failure of hepatic energy metabolism. *J Surg Res* 2003; 115:139–147
53. Fredriksson K, Hammarqvist F, Strigård K, et al: Derangements in mitochondrial metabolism in intercostal and leg muscle of critically ill patients with sepsis-induced multiple organ failure. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291:E1044–E1050
54. Kozlov AV, Staniek K, Haindl S, et al: 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
55. Fukumoto K, Pierro A, Spitz L, et al: Neonatal endotoxemia affects heart but not kidney bioenergetics. *J Pediatr Surg* 2003; 38:690–693
56. Revelly JP, Liaudet L, Frascarolo P, et al: Effects of norepinephrine on the distribution of intestinal blood flow and tissue adenosine triphosphate content in endotoxic shock. *Crit Care Med* 2000; 28:2500–2506
57. Nagelschmidt M, Holthausen U, Goost H, et al: Evaluation of the effects of a pneumoperitoneum with carbon dioxide or helium in a porcine model of endotoxemia. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385:199–206
58. Lamontagne F, Briel M, Duffett M, et al: Systematic review of reviews including animal studies addressing therapeutic interventions for sepsis. *Crit Care Med* 2010; 38:2401–2408

**EFFECT OF TREATMENT DELAY ON DISEASE SEVERITY AND NEED FOR
RESUSCITATION IN PORCINE FECAL PERITONITIS**

Supplemental Digital Content 1/Methods

Authors:

Thiago D Corrêa, Madhusudanarao Vuda, Annika R Blaser, Jukka Takala, Siamak Djafarzadeh, Martin W Dünser, Eliézer Silva, Michael Lensch, Ludwig Wilkens and Stephan M Jakob

MATERIALS AND METHODS

BLOOD SAMPLING

Blood from the carotid artery was withdrawn at baseline and every six hours from the indwelling catheter and immediately analyzed in a blood gas analyzer (GEM Premier 3000 analyzer; Bedford, MA, USA) for PaO₂, PaCO₂ (adjusted to central body temperature), pH, lactate (mmol/L), base excess (BE), sodium and potassium. Arterial oxygen saturation and total hemoglobin concentration (Hb) were measured at baseline and every six hours using a separate analyzer (OSM 3; Radiometer, Copenhagen, Denmark, porcine mode). Blood samples were taken from the carotid artery for platelet count at baseline and every 24 hours (ADVIA[®] 120 analyzer; Siemens, Zürich, Switzerland).

Plasma interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) were determined using a porcine immunoassay kit (R&D Systems Europe Ltd; Abingdon, Oxon, UK). C-reactive protein (CRP) levels were measured using a porcine ELISA Test Kit (Life Diagnostics; West Chester, PA, USA). All inflammatory markers, serum creatinine, and total bilirubin were measured with blood samples from the carotid artery at baseline, the end of the observation period, after 24 hours of resuscitation, and at the end of the study (48 hours of resuscitation or before death, for animals that died before completion of the study).

Blood from the pulmonary artery and from superior and inferior vena cava was withdrawn at baseline and every 12 hours for oxygen saturation measurement using a Radiometer OSM 3 blood gas analyzer (OSM 3; Radiometer, Copenhagen, Denmark, porcine mode).

HEMODYNAMIC SUPPORT

Throughout the resuscitation period the volume status was evaluated clinically every hour. If signs of hypovolemia became evident, alternating boluses of 150 mL Ringer's lactate (RL) and 6% hydroxyethyl starch (HES 130/0.4) were given (Figure T1). Fluid boluses were repeated as long as the stroke volume was increased by 10% or more after fluid administration. The maximum dose of HES administered was 30 ml/kg/day. After this maximal dose was reached, only boluses of Ringer's lactate were given.

If the mixed venous oxygen saturation (SvO_2) was less than 50%, dobutamine administration was started at a dose of 5.0 mg per hour. This dose was increased by 5.0 mg per hour every 30 minutes until the SvO_2 was 50% or higher or until a maximal dose of 20 mg per hour was given. If the mean arterial pressure (MAP) was less than 60 mm Hg, norepinephrine was given to maintain a MAP of at least 60 mm Hg.

VENTILATORY SUPPORT

The animals were ventilated using a volume-controlled ventilator with a positive end-expiratory pressure (PEEP) of 5 cm H_2O , a fraction of inspired oxygen (FiO_2) of 30%, and a tidal volume of 8 mL/kg (Servo-i; Maquet Critical Care, Solna, Sweden). The respiratory rate was adjusted (20 to 35 breaths/min) to maintain a partial pressure of arterial carbon dioxide ($PaCO_2$) at 35 - 45 mm Hg.

Since prolonged septic state is a typical risk factor for acute lung injury, tidal volume (VT), PEEP and FiO_2 were adjusted following a standardized protocol with

the aim of keeping the arterial oxygen partial pressure (PaO_2) level between 100 and 150 mm Hg, the arterial oxyhemoglobin saturation (SpO_2) (measured by pulse oximetry) level above 90%, and the plateau pressure below 30 cm H_2O . All animals were intra-tracheally suctioned every 12 hours.

When there was a sustained (> 10 minutes) decrease in oxygenation ($\text{SpO}_2 < 90\%$ and/or $\text{PaO}_2 < 100$ mm Hg, if available), the following stepwise procedures were performed: tracheal suctioning, a recruitment maneuver, and setting of a new FiO_2 or PEEP according to a standardized protocol.

Tracheal Suctioning

Tracheal suctioning was carried out every 12 hours and when any one of the following situations occurred: visible airway secretion into the endotracheal tube, noisy breathing, increased inspiratory peak pressure, decreased VT during ventilation attributed to airway secretion, and decreased SpO_2 during ventilation attributed to airway secretion.

Before aspirations, the animals were preoxygenated at 100% oxygen for 2 minutes. Aspirations were performed using an open tracheal suctioning system, at a negative pressure, for 20 seconds, during which the catheter was gently rotated and withdrawn. After an aspiration procedure, a recruitment maneuver was performed if there were no contraindications.

Lung Recruitment Maneuver (RM)

A recruitment maneuver (RM) was performed as follows: FiO_2 was increased to 100% for 2 minutes before a RM. The PEEP level was increased over

30 seconds to reach a plateau pressure of 40 cmH₂O. Then, a 30-second inspiratory hold was performed at this new PEEP level. Afterwards, PEEP was decreased over 30 seconds to the pre-RM level. No more than four recruitment maneuvers were performed in any 24-hour period.

The RM was terminated immediately and PEEP restored to its pre-RM level if there was any sign of hemodynamic instability and/or the mean arterial blood pressure decreased by 10 mmHg or more.

Combination of PEEP and FIO₂

If arterial oxygenation was not within the target range after the two procedures described above, then either FiO₂ or PEEP was adjusted according to Table T1.

When arterial oxygenation was higher than the target range (PaO₂ ≥ 150 mmHg), either the FiO₂ or the PEEP was decreased (by 10% or 2.0 cm H₂O, respectively), depending on which was farther (number of changes in value) from the beginning of the target scale shown in Table T1. If PEEP and FiO₂ were equidistant from the scale, then FiO₂ was decreased first. If arterial oxygenation was lower than the target range (PaO₂ < 100 mmHg or SpO₂ < 90%), either FiO₂ or PEEP was increased (by 10% or 2.0 cm H₂O, respectively), depending on which was farther from the end of the target scale. If PEEP and FiO₂ were equidistant from the scale, then PEEP was increased first (Table T1). If FiO₂ = 100%, PEEP was increased in 2 cmH₂O increments up to 24 cm H₂O.

ISOLATION OF SKELETAL MUSCLE AND LIVER MITOCHONDRIA

The muscle specimens were rapidly immersed in ice-cold isolation buffer (KCl 100 mmol/l, MgSO₄ 10 mmol/l, morpholinopropane sulfonic acid 50 mmol/l, ethylenedinitrilotetraacetic acid 1.0 mmol/l, ATP 1.1 mmol/l, pH 7.4), and weighed. After several rinses with isolation buffer, the skeletal muscle was minced using scissors and was suspended in 10 volumes (wt/vol) of the same medium and treated with a protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 5 mg/g tissue for 10 minutes at 4°C with constant stirring. The suspension was diluted with an equal volume of isolation medium supplemented to 0.2% (wt/vol) with defatted bovine serum albumin (BSA) and homogenized in a Potter Elvehjem homogenizer with a loose-fitting Teflon pestle (10 strokes). The supernatant was separated by centrifugation (10 min at 10,000 × *g*), and the pellet was resuspended in BSA-supplemented isolation medium (10 ml/g tissue). The suspension was centrifuged for 10 minutes at 350 × *g*, the supernatant was filtered through two layers of gauze, and the mitochondria were sedimented at 7,700 *g* for 10 min. The mitochondria were subjected to two additional washes using 5 ml BSA-supplemented muscle isolation buffer/g tissue and 2.5 ml of 100 mmol/L KCl, 50 mmol/L morpholinopropane sulfonic acid, and 0.5 mmol/L EGTA, pH 7.4, buffer/g muscle, and finally resuspended in ~1.0 mL of 100 mmol/L KCl, 50 mmol/L morpholinopropane sulfonic acid and 0.5 mmol/L EGTA, pH 7.4.

Isolation of liver mitochondria was performed immediately after tissue harvesting at 4°C using a standard procedure based on differential centrifugation. The samples of liver (15 g) excised at the end of the experiment were rapidly immersed in ice-cold liver isolation buffer (mannitol 220 mmol/l, sucrose 70 mmol/l,

morpholinopropane sulfonic acid 5 mmol/l, pH 7.4), minced with scissors, and homogenized with an additional 10 ml/g of homogenization media (liver isolation buffer plus EDTA 2 mmol/l) in a Potter Elvehjem homogenizer with a loose-fitting Teflon pestle (four strokes). The homogenate was then centrifuged for 10 minutes at 700 g. The supernatant was collected and centrifuged again for 10 minutes at 7,000 g. The supernatant was discarded at this time; the pellet was then resuspended in isolation buffer and centrifuged twice for 10 minutes at 7,000 g for further purification of the mitochondria. The pellets were then suspended in buffer at a final concentration of 50–100 mg mitochondrial protein per milliliter.

PREPARATION OF PERMEABILIZED SKELETAL MUSCLE AND HEART FIBERS

Skeletal muscle and heart fibers were isolated by dissection of the muscle tissue in relaxing solution (in mM: 2.77 CaK₂EGTA, 7.23 K₂EGTA [free Ca²⁺ concentration 0.1 μM], 20 imidazole, 20 taurine, 6.56 MgCl₂, 5.77 ATP, 15 phosphocreatine, 0.5 dithiothreitol, and 50 K-MES, pH 7.1) on ice and permeabilized by gentle agitation for 30 min on ice in the relaxing solution supplemented with 50 μg/ml saponin (1). Fibers were washed in ice-cold respiration medium (110 mM sucrose, 60 mM K-lactobionate, 0.5 mM EGTA, 1 g/L bovine serum albumin essentially fatty acid-free, 3 mM MgCl₂, 20 mM taurine, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, pH 7.1) (2) by agitation for 20 min and were kept in this medium until respirometric assay.

CARDIAC MUSCLE MITOCHONDRIAL ISOLATION

Mitochondria were isolated from left ventricular heart muscle using a trypsin digestion procedure (3,4). Tissue (4-5 g) was minced, washed, and suspended in 30 ml of isolation medium (0.3 M sucrose, 10 mM sodium HEPES, pH 7.2, and 0.2 mM EDTA). The tissue was subjected to mild trypsin digestion (1.25 mg) for 15 min at 4°C and then diluted with 10 ml of isolation medium (pH 7.4) containing 1 mg/ml BSA and 6.5 mg of trypsin inhibitor. The suspension was stirred, and the supernatant was discarded. The partially digested tissue was resuspended in 10 ml of isolation medium containing 1 mg/ml albumin and homogenized briefly with a Teflon-glass homogenizer. The homogenate was centrifuged for 10 min at 600 *g* (4°C). The resulting supernatant was centrifuged for 15 min at 8,000 *g* (4°C). The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended twice in 10 ml of isolation medium containing 1 mg/ml albumin and centrifuged each time for 15 min at 8,000 *g* (4°C). The final washed pellet was suspended in 1 ml of isolation medium without albumin.

ISOLATION OF BRAIN MITOCHONDRIA

Brain mitochondria were isolated as described by Vilela et al. (5), with slight modifications. The brain cortex was removed, minced, washed, and suspended (3-5 g) in 20 ml of isolation medium (225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 5 mM HEPES, 1 mM EGTA, pH 7.4). The tissue was subjected to bacterial protease (5 mg) and then diluted with 30 ml of isolation medium containing 1 mg/ml BSA and homogenized briefly with a Teflon-glass homogenizer. The homogenate was centrifuged for 5 min at 2000 *g* (4°C). Supernatant was passed through

cheesecloth and centrifuged at 12,000 *g* for 10 min. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended along with the fluffy synaptosomal layer in 10 ml isolation medium with BSA containing 0.02% digitonin and centrifuged at 12,000 *g* for 10 minutes. Supernatant was discarded and the brown mitochondrial pellet was resuspended in 10 ml of isolation medium containing 1 mg/ml albumin and centrifuged for 10 min at 12,000 *g* (4°C). The final washed pellet was suspended in 1 ml of isolation medium without albumin.

MITOCHONDRIAL FUNCTION ANALYSIS

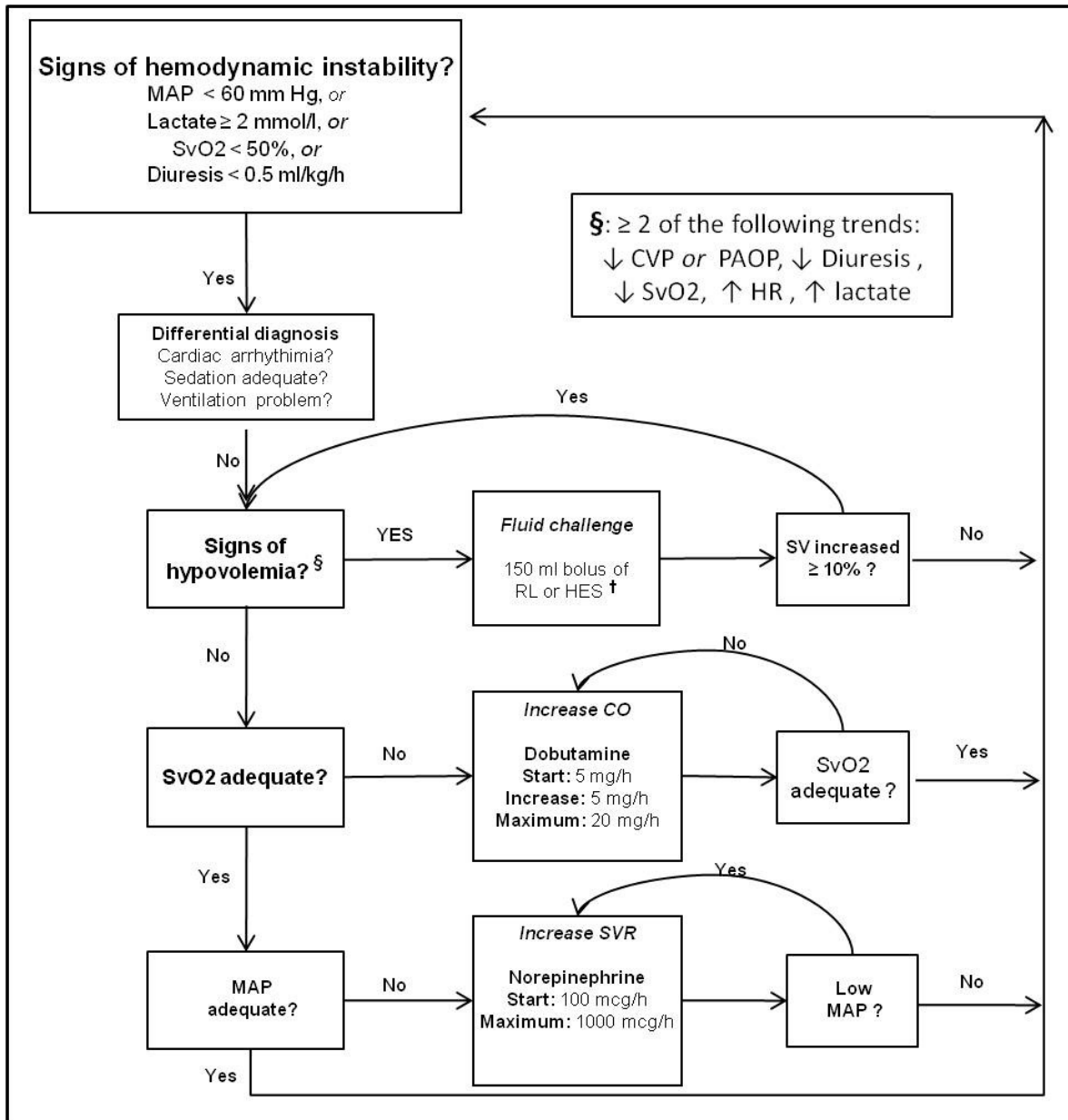
Isolated skeletal muscle and permeabilized skeletal muscle fiber respiration were measured at baseline, at the end of the observation period, and at the end of the experiment (48 hours of resuscitation or before death, for animals that died before completion of the study). Complex I-, II- and IV-dependent respiration rates were measured as described previously using high-resolution respirometry (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) (6,7).

For skeletal muscle and heart fibers, state 3 respiration was measured using glutamate/malate, succinate and ascorbate/TMPD as substrates for complex I, II and IV, respectively. Maximal electron transport system capacity was also measured in the presence of substrates for both complex I and complex II. Skeletal muscle ATP content was quantified at the end of the experiment using a luciferase-based ATP determination kit (Molecular Probes; Eugene, OR, USA) according to the manufacturer's instructions.

REFERENCES

1. Kuznetsov AV, Mayboroda O, Kunz D, et al: Functional imaging of mitochondria in saponin-permeabilized mice muscle fibers. *J Cell Biol* 1998; 140:1091-1099
2. Gnaiger E, Kuznetsov AV, Schneeberger S, et al: Mitochondria in the cold. In: *Life in the Cold*, eds. G. Heldmaier, M Klingenspor. Berlin Heidelberg, New York: Springer, 2000;431-442
3. Saks VA, Kuznetsov AV, Kupriyanov VV, et al: Creatine kinase of rat heart mitochondria. The demonstration of functional coupling to oxidative phosphorylation in an inner membrane-matrix preparation. *J Biol Chem* 1985; 260:7757-7764
4. Boehm EA, Jones BE, Radda GK, et al: Increased uncoupling proteins and decreased efficiency in palmitate-perfused hyperthyroid rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H977-H983
5. Vilela SM, Santos DJ, Felix L, et al: Are fentanyl and remifentanyl safe opioids for rat brain mitochondrial bioenergetics? *Mitochondrion* 2009; 9:247-253
6. Regueira T, Banziger B, Djafarzadeh S, et al: Norepinephrine to increase blood pressure in endotoxaemic pigs is associated with improved hepatic mitochondrial respiration. *Crit Care* 2008; 12:R88
7. Vuda M, Brander L, Schroeder R, et al: Effects of catecholamines on hepatic and skeletal muscle mitochondrial respiration after prolonged exposure to faecal peritonitis in pigs. *Innate Immun* Apr 27, 2011 [Epub ahead of print]

Figure T1: Hemodynamic protocol



Legend: MAP = mean arterial blood pressure, SvO₂ = mixed venous oxygen saturation, SV = stroke volume, CVP = central venous pressure, PAOP = pulmonary artery occlusion pressure, SVR = systemic vascular resistance, RL =

Ringer's lactate, HES = 6% hydroxyethyl starch (130/0.4), ↑ = increasing, ↓ = decreasing, † = alternating boluses of 150 mL Ringer's lactate and 6% hydroxyethyl starch (HES 130/0.4) until the maximum dose of 30 ml/Kg/day of HES is reached. Then, only give boli of Ringer's lactate.

Table T1. Combinations of PEEP and FiO₂

FiO₂ (%)	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
PEEP (cm H₂O)	6	8	10	12	14	16	18-24

Legend: FiO₂= fraction of inspired oxygen and PEEP = positive end-expiratory pressure

**EFFECT OF TREATMENT DELAY ON DISEASE SEVERITY AND NEED FOR
RESUSCITATION IN PORCINE FECAL PERITONITIS**

Supplemental Digital Content 2/Results

Authors:

Thiago D Corrêa, Madhusudanarao Vuda, Annika R Blaser, Jukka Takala, Siamak Djafarzadeh, Martin W Dünser, Eliézer Silva, Michael Lensch, Ludwig Wilkens and Stephan M Jakob.

Table S1. Arterial blood gases and hemoglobin analysis. Values are mean \pm SD.

Variables	Group	BL	EOP	RP 12h	RP 24h	RP 36h	RP 48h	End	P value ¶
pH	CG	7.53 \pm 0.04	7.50 \pm 0.03	7.52 \pm 0.05	7.52 \pm 0.03	7.51 \pm 0.02	7.51 \pm 0.04	7.51 \pm 0.04	
	Δ T-6h	7.55 \pm 0.01	7.48 \pm 0.04	7.47 \pm 0.03	7.45 \pm 0.04	7.49 \pm 0.04	7.49 \pm 0.03	7.49 \pm 0.03	< 0.001 ^a
	Δ T-12h	7.52 \pm 0.03	7.44 \pm 0.03 [§]	7.42 \pm 0.06	7.47 \pm 0.05	7.41 \pm 0.07	7.44 \pm 0.07	7.40 \pm 0.09	0.001 ^b
	Δ T-24h	7.52 \pm 0.04	7.39 \pm 0.07 ^{#&}	7.44 \pm 0.09	7.49 \pm 0.02	7.52 \pm 0.02	7.51 \pm 0.06	7.39 \pm 0.17	0.069 ^c
Bicarbonate (mmol/L)	CG	33.2 \pm 1.0	30.3 \pm 1.4	30.6 \pm 2.5	30.1 \pm 2.8	29.9 \pm 2.7	30.1 \pm 3.0	30.1 \pm 3.0	
	Δ T-6h	33.1 \pm 1.4	30.7 \pm 1.6	29.6 \pm 1.4	30.0 \pm 2.0	30.6 \pm 2.2	30.6 \pm 1.3	30.6 \pm 1.3	0.002 ^a
	Δ T-12h	32.7 \pm 1.7	27.8 \pm 1.9 ^z	29.4 \pm 2.3	30.0 \pm 1.6	29.3 \pm 1.4	29.9 \pm 1.9	29.2 \pm 2.1	< 0.001 ^b
	Δ T-24h	32.4 \pm 1.2	25.5 \pm 3.1 ^{#&}	28.8 \pm 4.0	32.1 \pm 1.3	32.4 \pm 1.4	32.4 \pm 1.8	27.7 \pm 6.5	0.527 ^c
BE (mmol/L)	CG	10.2 \pm 1.1	7.5 \pm 1.6	6.7 \pm 0.7	7.3 \pm 2.8	6.8 \pm 2.6	7.0 \pm 3.2	7.0 \pm 3.2	
	Δ T-6h	10.6 \pm 1.3	7.7 \pm 2.1	6.7 \pm 1.6	6.4 \pm 2.4	7.6 \pm 2.5	7.4 \pm 1.4	7.4 \pm 1.4	< 0.001 ^a
	Δ T-12h	9.7 \pm 1.5	4.6 \pm 2.2	5.3 \pm 2.5	6.8 \pm 2.0	5.1 \pm 1.4	5.8 \pm 1.8	4.6 \pm 2.8	< 0.001 ^b
	Δ T-24h	9.3 \pm 1.8	1.7 \pm 3.7 ^{#&}	5.2 \pm 5.2	8.9 \pm 1.3	9.7 \pm 1.6	9.3 \pm 2.0	3.3 \pm 8.5	0.318 ^c
PCO ₂ (mm Hg)	CG	41.1 \pm 3.6	39.6 \pm 2.2	38.1 \pm 2.7	37.4 \pm 3.7	38.1 \pm 3.4	38.0 \pm 3.5	38.0 \pm 3.5	
	Δ T-6h	38.3 \pm 1.7	42.5 \pm 2.3	41.5 \pm 2.5	44.6 \pm 3.0	41.4 \pm 3.2	41.1 \pm 2.6	41.1 \pm 2.6	0.006 ^a
	Δ T-12h	40.8 \pm 3.7	42.4 \pm 2.4	46.4 \pm 6.7	42.3 \pm 4.5	48.3 \pm 10.0	45.4 \pm 8.8	48.7 \pm 9.6 [§]	0.190 ^b
	Δ T-24h	40.3 \pm 3.5	43.6 \pm 5.9	43.1 \pm 3.1	43.6 \pm 2.5	40.2 \pm 1.9	42.0 \pm 5.9	47.0 \pm 10.1	0.032 ^c
Hb (mg/dL)	CG	9.3 \pm 1.1	7.8 \pm 1.0	7.4 \pm 1.0	6.7 \pm 0.7	6.4 \pm 0.8	5.9 \pm 0.8	5.9 \pm 0.8	
	Δ T-6h	8.7 \pm 0.5	10.9 \pm 1.7 [¥]	11.1 \pm 1.2	11.1 \pm 0.9	9.1 \pm 1.1	8.4 \pm 1.0	8.4 \pm 1.0 [¥]	< 0.001 ^a
	Δ T-12h	9.0 \pm 1.1	12.5 \pm 1.6 [§]	11.6 \pm 1.0	10.2 \pm 0.8	8.9 \pm 0.7	8.6 \pm 0.9	9.2 \pm 1.3 [§]	< 0.001 ^b
	Δ T-24h	9.0 \pm 0.8	12.9 \pm 1.3 ^{#&}	10.9 \pm 0.7	9.0 \pm 0.6	8.5 \pm 0.9	7.7 \pm 0.8	8.4 \pm 1.5 [#]	< 0.001 ^c

Legend: BL = baseline, EOP = end of observation period, RP = resuscitation period, pH = arterial pH, PCO₂ = arterial carbon dioxide partial pressure, BE = arterial base excess, Hb = arterial hemoglobin, ¶ = p value: a = time-group interaction with repeated measures ANOVA, including BL, EOP, RP 12h, RP 24h, RP 36h and RP 48h, b = one-way ANOVA at EOP and c = one-way ANOVA at the end. Tukey post-hoc test after ANOVA: comparisons significant at the 0.05 level: ¥ = Δ T-6h vs. CG, § = Δ T-12h vs. CG, z = Δ T-12h vs. Δ T-6h, # = Δ T-24h vs. CG and & = Δ T-24h vs. Δ T-6h.

Table S2: Respiratory system variables. Values are mean \pm SD.

Variables	Group	BL	EOP	RP 12 h	RP 24 h	RP 36 h	RP 48 h	End	P value ¶
MV (L/min)	CG	6.7 \pm 0.5	6.5 \pm 0.7	6.3 \pm 0.8	6.3 \pm 0.9	6.4 \pm 0.9	6.1 \pm 1.0	6.1 \pm 1.0	
	Δ T-6h	6.8 \pm 0.5	7.3 \pm 0.6	7.5 \pm 0.9	7.5 \pm 0.8	8.4 \pm 1.3	8.1 \pm 0.8	8.1 \pm 0.8 ¥	< 0.001 ^a
	Δ T-12h	7.1 \pm 1.1	8.2 \pm 1.3 §	7.6 \pm 1.0	9.4 \pm 1.8	9.6 \pm 1.5	10.8 \pm 1.8	10.6 \pm 1.7 §z	0.015 ^b
	Δ T-24h	6.8 \pm 1.0	7.7 \pm 1.3	8.6 \pm 0.9	8.2 \pm 1.3	8.7 \pm 1.6	8.7 \pm 1.4	9.5 \pm 1.5 #	< 0.001 ^c
PaO ₂ / FiO ₂	CG	482 \pm 36	394 \pm 63	346 \pm 84	331 \pm 96	253 \pm 82	237 \pm 74	237 \pm 74	
	Δ T-6h	459 \pm 40	400 \pm 39	377 \pm 48	289 \pm 91	289 \pm 73	257 \pm 62	257 \pm 62	0.430 ^a
	Δ T-12h	476 \pm 64	408 \pm 56	340 \pm 139	260 \pm 86	208 \pm 65	194 \pm 93	183 \pm 83	0.211 ^c
	Δ T-24h	459 \pm 63	406 \pm 60	287 \pm 77	279 \pm 38	254 \pm 42	240 \pm 59	205 \pm 69	
PEEP (cm H ₂ O)	CG	5 \pm 0	5 \pm 1	5 \pm 1	6 \pm 2	7 \pm 2	9 \pm 3	9 \pm 3	
	Δ T-6h	5 \pm 0	5 \pm 0	5 \pm 1	6 \pm 2	7 \pm 2	8 \pm 3	8 \pm 3	0.818 ^a
	Δ T-12h	5 \pm 0	5 \pm 0	6 \pm 2	8 \pm 4	9 \pm 5	10 \pm 4	9 \pm 4	0.836 ^c
	Δ T-24h	5 \pm 0	5 \pm 0	5 \pm 0	6 \pm 1	7 \pm 1	9 \pm 3	8 \pm 3	

Legend: BL = baseline, EOP = end of observation period, RP = resuscitation period, MV = expired minute volume, PaO₂/FiO₂ = relationship between arterial oxygen partial pressure and fraction of inspired oxygen, PEEP = positive end-expiratory pressure, ¶ = p value: a = time-group interaction with repeated measures ANOVA, including BL, EOP, RP 12h, RP 24h, RP 36h and RP 48h, b = one-way ANOVA at EOP and c = one-way ANOVA at the end. Tukey post-hoc test after ANOVA: comparisons significant at the 0.05 level: ¥ = Δ T-6h vs. CG, § = Δ T-12h vs. CG, z = Δ T-12h vs. Δ T-6h and # = Δ T-24h vs. CG.

Table S3: Complex IV-dependent isolated muscle mitochondrial respiration.

Variable	Group	BL	EOP	End	P value [¶]	Paired t-test [*]
Ascorbate /TMPD	CG	1453 ± 569	1361 ± 619	1955 ± 1036		
State 3	ΔT-6h	1406 ± 615	1345 ± 605	1503 ± 827	0.44 ^a	BL vs. EOP: p=0.147
	ΔT-12h	1120 ± 341	1198 ± 391	1827 ± 1252	0.002 ^b	EOP vs. End: p=0.001
	ΔT-24h	1444 ± 425	827 ± 710	1919 ± 1337	0.89 ^c	

Values are expressed as mean values ± SD. BL = baseline, EOP = end of observation period, ¶ = p value: a = time-group interaction with ANOVA for repeated measurements, b = time effect with ANOVA for repeated measurements, c = group effect with ANOVA for repeated measurements, * = paired t-test: since there was no time-group interaction, paired t-tests were conducted on the pooled data from all groups and BL was compared to the EOP and EOP at the end.

Table S4: Permeabilized skeletal muscle fiber maximal mitochondrial respiration (state 3) expressed as pmole/(sec* mg dry weight). Values are mean \pm SD.

Variables	Group	BL	EOP	End	P value η
Complex I	CG	85 \pm 33	98 \pm 39	91 \pm 49	0.708 ^a
	Δ T-6h	83 \pm 55	90 \pm 42	95 \pm 13	0.654 ^b
	Δ T-12h	96 \pm 45	88 \pm 23	125 \pm 62	0.703 ^c
	Δ T-24h	109 \pm 44	102 \pm 71	97 \pm 30	
Complex I + II (ETS Capacity)	CG	131 \pm 73	130 \pm 51	128 \pm 68	0.789 ^a
	Δ T-6h	115 \pm 53	117 \pm 58	121 \pm 24	0.621 ^b
	Δ T-12h	144 \pm 71	123 \pm 22	178 \pm 69	0.437 ^c
	Δ T-24h	155 \pm 76	139 \pm 103	138 \pm 44	
Complex II	CG	90 \pm 40	99 \pm 35	93 \pm 45	0.889 ^a
	Δ T-6h	92 \pm 39	87 \pm 37	94 \pm 23	0.616 ^b
	Δ T-12h	105 \pm 64	93 \pm 13	127 \pm 50	0.505 ^c
	Δ T-24h	102 \pm 43	102 \pm 56	104 \pm 28	
Complex IV	CG	72 \pm 64	64 \pm 27	86 \pm 54	0.731 ^a
	Δ T-6h	80 \pm 97	50 \pm 26	45 \pm 22	0.079 ^b
	Δ T-12h	102 \pm 64	53 \pm 20	76 \pm 45	0.696 ^c
	Δ T-24h	91 \pm 65	73 \pm 79	80 \pm 31	

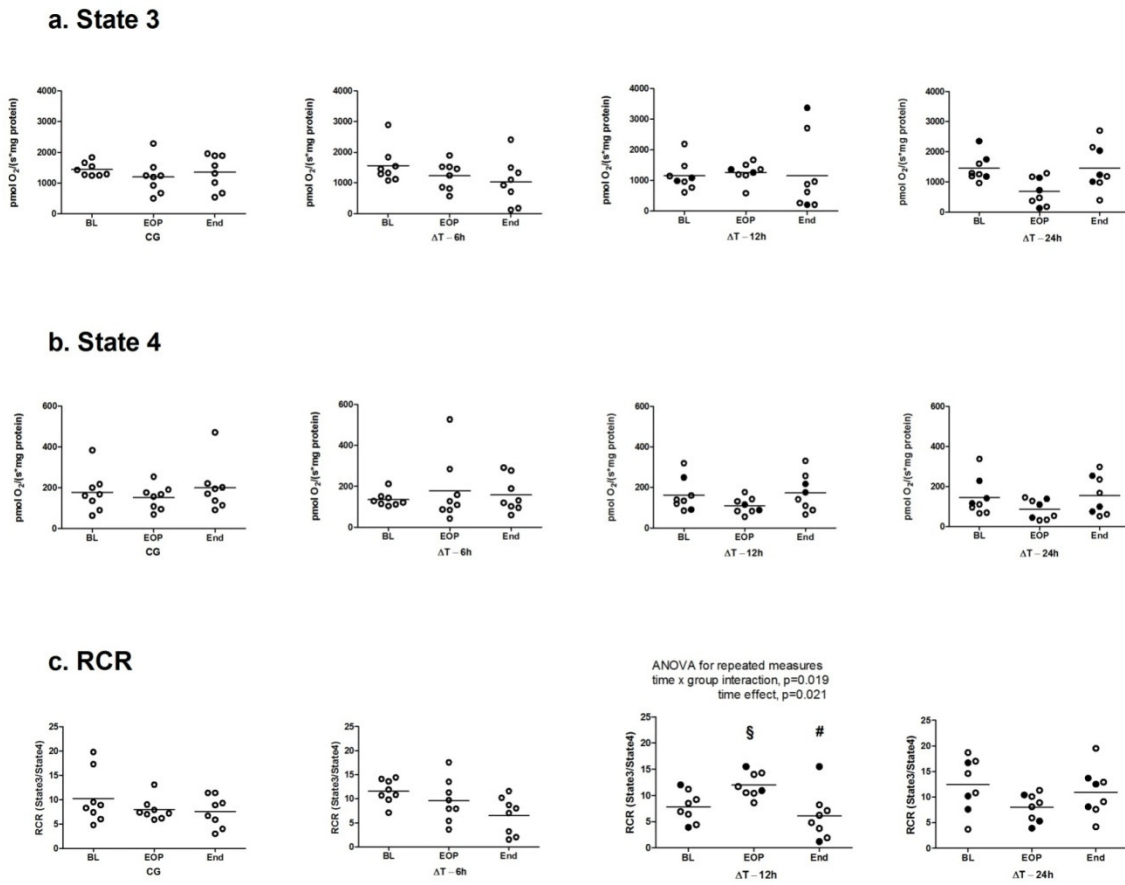
Legend: BL = baseline, EOP = end of observation period, η = p value: a = time-group interaction with repeated measures ANOVA, b = time effect with repeated measures ANOVA, c = group effect with repeated measures ANOVA.

Table S5: Permeabilized heart fiber maximal mitochondrial respiration (state 3) expressed as pmole/(sec* mg dry weight). Values are mean \pm SD.

Variables	CG	ΔT-6h	ΔT-12h	ΔT-24h	P value ¶
Complex I	184 \pm 130	212 \pm 112	187 \pm 66	221 \pm 67	0.458
Complex I +II (ETS Capacity)	253 \pm 184	300 \pm 179	274 \pm 106	302 \pm 84	0.890
Complex II	179 \pm 113	187 \pm 75	194 \pm 60	205 \pm 55	0.925
Complex IV	124 \pm 115	125 \pm 71	98 \pm 53	145 \pm 48	0.691

Legend: ¶ = p value for one-way ANOVA.

Figure S1: Complex I-dependent isolated skeletal muscle mitochondrial respiration



Legend: Complex I-dependent isolated skeletal muscle mitochondrial respiration

State 3 and 4 oxygen consumption is expressed as pmol/second/mg protein. BL =

Baseline. EOP = end of observation period. RCR = respiratory control ratio

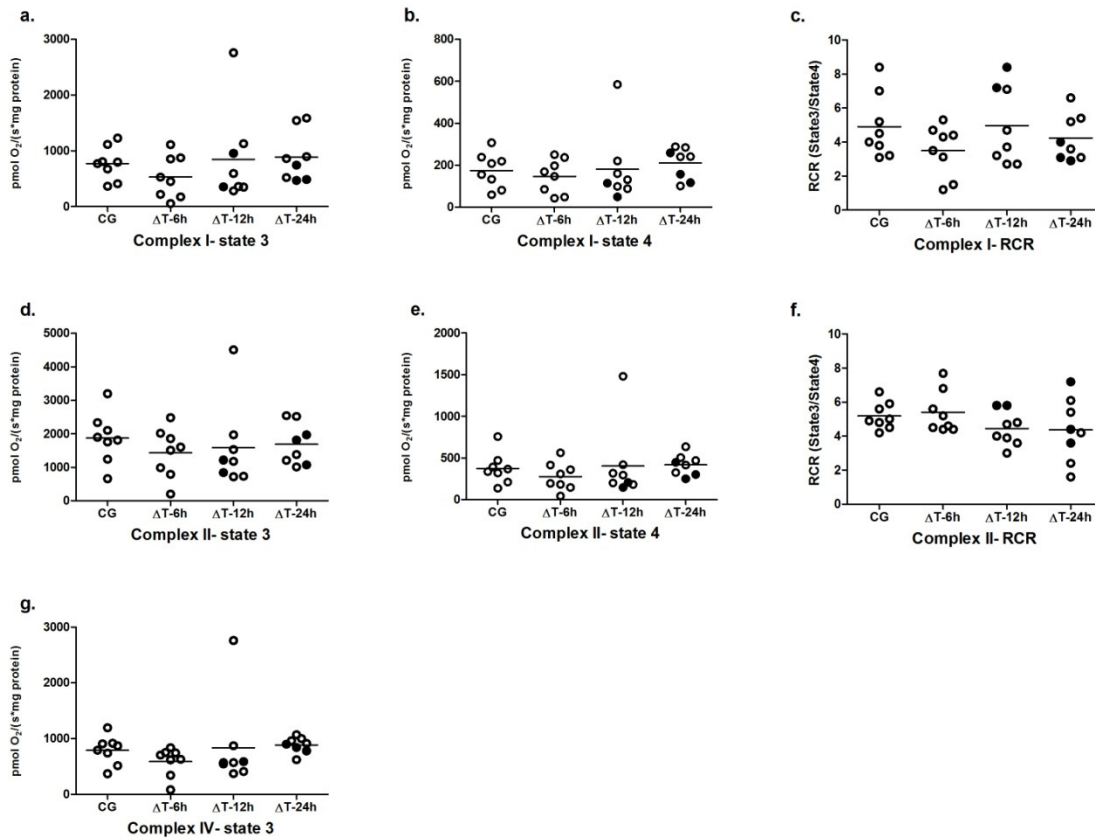
(oxygen consumption of state 3/state 4). 4a = State 3 respiration, 4b = State 4

respiration, 4c = RCR, § = paired t-test EOP vs. BL ($p=0.001$) and # = paired t-test

EOP vs. End ($p=0.025$). The black horizontal bars represent the mean values.

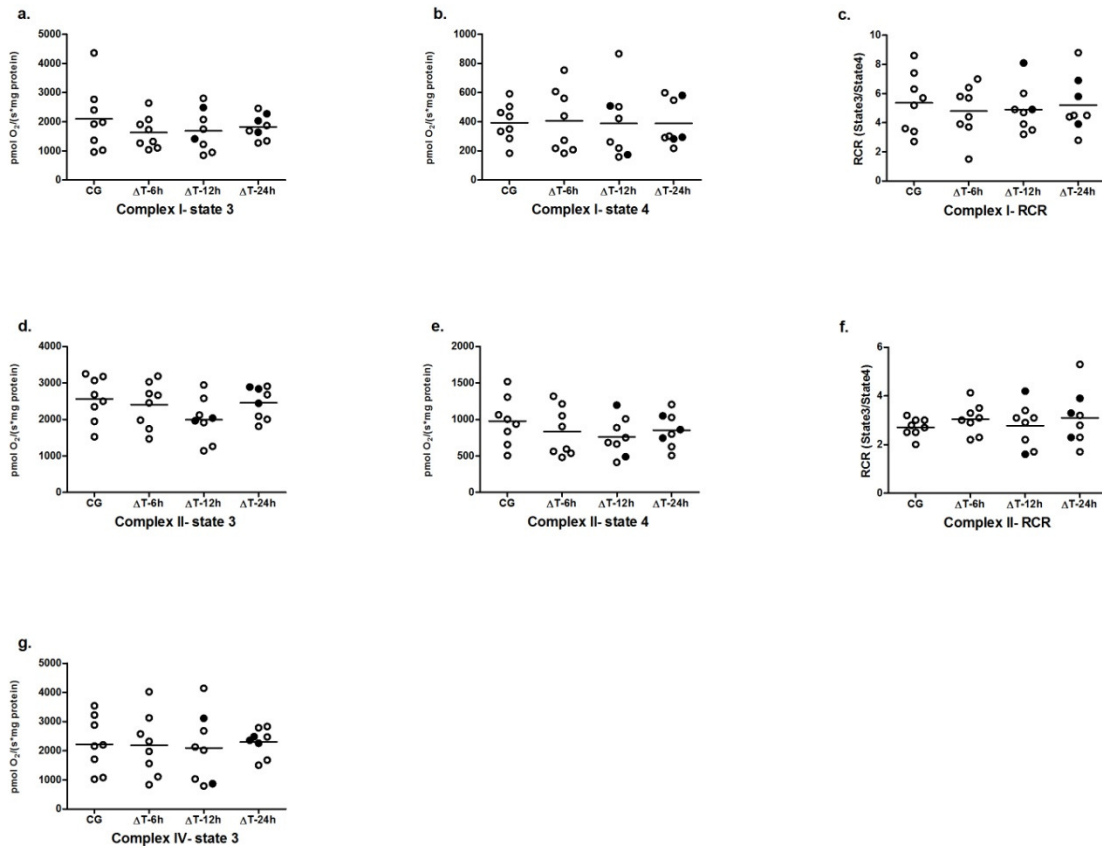
Filled circles represent animals that died early.

Figure S2: Isolated liver mitochondrial respiration.



Legend: Comparison of isolated liver mitochondrial respiration in (a-g) control and septic animals resuscitated at 6, 12 and 24 hours after fecal peritonitis induction. State 3 and 4 oxygen consumption is expressed as pmol/second/mg protein. RCR = respiratory control ratio (oxygen consumption of state 3/state 4). The black horizontal bars represent the mean values. Filled circles represent animals that died early.

Figure S3: Isolated heart mitochondrial respiration.



Legend: Comparison of isolated heart mitochondrial respiration in (a-g) control and septic animals resuscitated at 6, 12 and 24 hours after fecal peritonitis induction. State 3 and 4 oxygen consumption is expressed as pmol/second/mg protein. RCR = respiratory control ratio (oxygen consumption of state 3/state 4). The black horizontal bars represent the mean values. Filled circles represent animals that died early.