

Avances terapéuticos en el shock séptico

J. Rodríguez Velayos¹, J. A. Lorente Balanza², M. A. Pavón Biedma¹,
J. Mateos Rodríguez³, M. A. Pérez Oviedo⁴, J. Medina Segovia⁵,
A. Fuentes Domínguez⁴

RESUMEN

Recientes avances en biología molecular e inmunología nos acercan cada vez más a un manejo y tratamiento más integral y fisiológico del shock séptico. El tratamiento con anticuerpos no ha demostrado la efectividad que se supuso inicialmente, en la actualidad se están estudiando otras terapias antiendotoxina como la polimixina B, la proteína incrementadora de la permeabilidad bacteriana, las lipoproteínas de alta densidad y derivados del lípido A. El tratamiento con citoquinas no se ha demostrado eficaz e incluso puede ser perjudicial, con lo que la supresión de la respuesta séptica puede ser un efecto indeseable en pacientes con sepsis. La inhibición de los neutrófilos en la sepsis puede limitar el daño tisular inflamatorio, pero también puede disminuir en exceso los mecanismos de defensa del paciente, la tendencia actual es modular la respuesta de los neutrófilos. La inhibición selectiva de la óxido nítrico sintetasa actualmente no es factible, pero el campo es muy prometedor. En la sepsis no se ha comprobado que haya déficit de oxígeno intracelular por lo que los niveles de lactato no son un indicador fiable.

PALABRAS CLAVE: shock séptico - sepsis - shock - tratamiento

Med Mil (Esp) 1996;52 (1): 29-34

INTRODUCCIÓN

Los avances en biología molecular e inmunología en la última década, así como los resultados de ensayos clínicos sobre la eficacia terapéutica de determinadas intervenciones en pacientes con sepsis, han aumentado nuestra comprensión de la fisiopatología del shock séptico. Estos estudios nos han ayudado a comprender: a) que la respuesta "séptica" puede ser producida igualmente por estímulos no infecciosos (traumatismos, hemorragia, isquemia prolongada, pancreatitis); b) el papel beneficioso de algunos mediadores inflamatorios; c) el papel de la hipoxia tisular en el desarrollo de daño orgánico en la sepsis; d) la visión del shock séptico como una alteración bioquímica caracterizada por la activación de diversos sistemas de proteasas; e) la depresión miocárdica característica de los pacientes con sepsis y shock séptico, independientemente del hecho de que el gasto cardíaco suele estar elevado; y f) los mecanismos que conducen a la vasodilatación en la sepsis. A continuación, se comentarán con cierto detalle algunos de estos aspectos.

FUNCIÓN DE LA ENDOTOXINA EN LA RESPUESTA SÉPTICA

Los productos tóxicos bacterianos producen una respuesta inflamatoria mediante la activación de diversos sistemas de proteasas, como la coagulación y la fibrinólisis, y estimulan diversos tipos celulares para la liberación de citoquinas, entre las que se encuentran las interleuquinas 1, 6 y 8 (IL-1, IL-6, IL-8) y el factor de necrosis tumoral (TNF), que amplifican la respuesta inflamatoria.

El tratamiento estándar de la sepsis consiste en la erradicación del foco infeccioso y el mantenimiento de la función de los órganos mediante ventilación mecánica, técnicas dialíticas extrarrenales, fármacos presores, etc. Pese a todo ello, la mortalidad por shock séptico sigue elevada (en el intervalo del 50-70%). Por eso, se han diseñado nuevos enfoques terapéuticos, basados en la neutralización de la endotoxina (figura 1) o de los mediadores de la inflamación.

La endotoxina induce una respuesta inflamatoria que puede proteger al huésped del agente agresor pero que también puede conducir al fracaso multiorgánico y a la muerte. La cadena de polisacárido-O de la endotoxina está expuesta en la cara externa de la membrana bacteriana, no es tóxica cuando se inyecta a animales de experimentación y su estructura varía entre las diversas especies. El componente de la endotoxina conocido como lípido A está embebido en la pared celular, posee una composición constante en todas las especies de bacterias gram negativas, y es tóxico cuando se administra a animales.

La inyección de endotoxina en animales y humanos sanos reproduce un cuadro hemodinámico y bioquímico característico del shock séptico (1, 2). Sin embargo, la tolerancia a la endotoxina inducida en humano (3) o la resistencia genética en ratones no confieren protección a la infección por gram negativos. Además, el aumento de la sensibilidad a la endotoxina en animales no cambia el curso de la infección por gram negativos en estos. Final-

¹ Cap. San. Med. Especialista en Medicina Intensiva

² Médico adjunto. Especialista en Medicina Intensiva

³ TCol. San. Med. Especialista en Medicina Intensiva

⁴ TCol. San. Med. Especialista en Medicina Intensiva. Jefe de Servicio

⁵ Cap. San. Med. Especialista en Medicina Intensiva. Jefe de Servicio

Servicios de Medicina Intensiva: Hospital Militar "del Rey".

Las Palmas (doctores Rodríguez y Fuentes); Hospital Universitario

de Getafe, Madrid (Dr. Lorente); Hospital Naval de "San Carlos",

Cádiz (Dr. Pavón); Hospital Militar Central "Gómez Ulla", Madrid

(doctores Mateos y Pérez); y Hospital Militar de Ceuta

(Dr. Medina).

Dirección para la correspondencia: Dr. D. Justino Rodríguez Velayos.
Hospital Militar del "Rey". Servicio de Medicina Intensiva. Calle Real del
Castillo, 152. 35014 Las Palmas de Gran Canaria

Fecha de recepción del manuscrito: 7 de febrero de 1995; en forma revisada:

12 de febrero de 1996

Fecha de aceptación del manuscrito: 15 de febrero de 1996

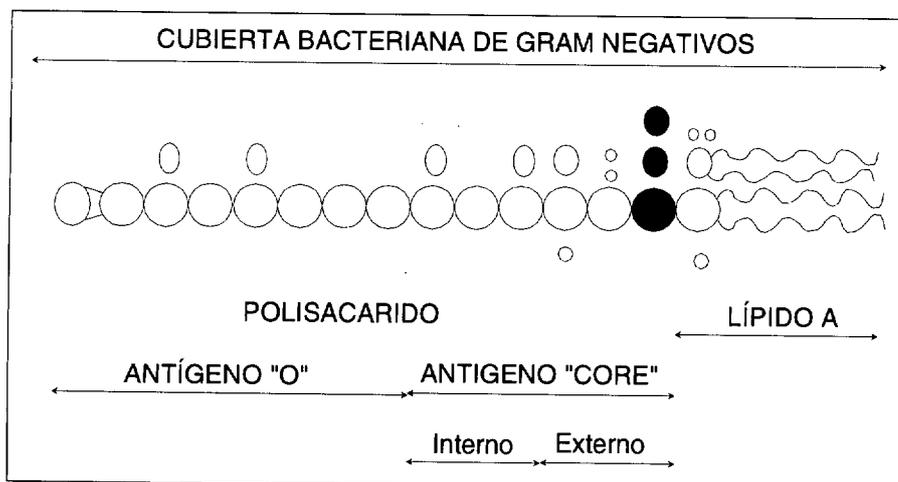


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de la endotoxina (LPS).

mente, la endotoxina no es necesaria para que se produzca shock séptico, siendo posiblemente sólo uno de los muchos productos bacterianos que pueden desencadenar la respuesta séptica (1).

Anticuerpos contra la cadena-O producen protección eficaz específica para cada serotipo, lo cual hace que este método no sea práctico clínicamente. Se han realizado ensayos clínicos para probar la eficacia de anticuerpos dirigidos contra el lípido A y la región "core" de la endotoxina.

Se ha utilizado antisero J5 (anticuerpo policlonal) que se mostró eficaz para reducir la mortalidad relacionada con la sepsis (4). Ensayos clínicos publicados posteriormente, no han podido demostrar su beneficio (ver referencia 4 para una revisión actualizada del problema).

El antisero monoclonal murino E4 no mostró reducción en la mortalidad en enfermos con sepsis por gram negativos (4), aunque un grupo identificado retrospectivamente de enfermos sin shock refractario sí mostraron una reducción en la mortalidad. En un segundo estudio realizado para confirmar este efecto beneficioso, el anticuerpo E5 no fue eficaz para reducir la mortalidad en pacientes con infecciones por gram negativos sin shock refractario. Un metaanálisis de los resultados de ambos ensayos ha demostrado que el anticuerpo E5 reduce el tiempo de recuperación del fracaso de órganos y mejora la supervivencia en el subgrupo de enfermos con infecciones por gram negativos y disfunción que no tienen shock refractario.

El anticuerpo monoclonal humano HA-1A ha sido probado en pacientes con sepsis, no pudiéndose demostrar ningún efecto sobre la mortalidad (4). Por otro lado, estudios en un modelo de shock séptico en perros demostraron que el HA-1A aumentó la mortalidad a los 28 días (5). Un segundo ensayo comenzado en abril de 1992 sobre la eficacia del HA-1A fue terminado precozmente al demostrarse en un análisis intermedio un exceso de mortalidad en el grupo tratado.

A pesar de los resultados negativos previamente expuestos, no se puede concluir que la terapia con anticuerpos sea necesariamente inefectiva. Es de notar que la afinidad de los anticuerpos utilizados por la endotoxina es muy pequeña. En la actualidad se están estudiando otras terapias antiendotoxinas, como la polimixina B, la proteína incrementadora de la permeabilidad bacteriana (BPI), las lipoproteínas de alta densidad y derivados del lípido A (como la endotoxina deacilada, el lípido X y el lípido A monofosforilado).

FUNCIÓN DE LAS CITOQUINAS EN LA RESPUESTA SÉPTICA

De entre los mediadores inflamatorios liberados en respuesta a la endotoxina, el TNF- α y la IL-1 han acaparado la mayor parte del interés. Cuando se administran a animales o a humanos, el TNF y la IL-1 producen muchas de las manifestaciones del shock séptico. La inhibición de su acción protege a los animales de los efectos de la endotoxina o de las bacterias.

Hay que mencionar que los niveles plasmáticos de citoquinas no reflejan necesariamente la intensidad de la respuesta inflamatoria. En la sepsis y en el shock se ha

demostrado la presencia de IL-1 y TNF, asociados a la membrana de monocitos, en ausencia de niveles circulantes detectables. En pacientes con síndrome de distrés respiratorio del adulto (ARDS), el lavado broncoalveolar demuestra la presencia de IL-1 y TNF, mientras que el plasma obtenido simultáneamente de estos pacientes contiene niveles menores de estas citoquinas. Por otro lado, otra fuente de discrepancia procede de la medición de los niveles de citoquinas mediante métodos que demuestran la presencia del péptido (inmunoensayos) o su actividad (bioensayos). Las células endoteliales y los neutrófilos liberan receptores extracelulares para las citoquinas durante el curso de la inflamación aguda que modulan su acción modificando su degradación, cambiando su vida media y alterando su interacción con otras citoquinas o con sus receptores celulares. Antagonistas liberados en respuesta al estímulo inflamatorio también modulan la acción de las citoquinas, como el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra). Se han encontrado niveles séricos elevados de receptores solubles de TNF y de IL-1ra en pacientes con infecciones agudas y en voluntarios sanos tratados con endotoxina.

Estos péptidos tienen un papel protector beneficioso en la respuesta del huésped al estímulo infeccioso. Reclutan y activan macrófagos, linfocitos y neutrófilos, y aumentan la síntesis de reactantes de fase aguda y del factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF). En modelos animales de infección por patógenos intracelulares, como la *Candida* y la *Legionella*, la inhibición de la acción de TNF aumenta la mortalidad. Además, dosis bajas de TNF o de IL-1 protegen de los efectos letales de la endotoxina, el TNF o bacterias en algunos modelos animales.

Además de sus efectos proinflamatorios beneficiosos la IL-1 y el TNF poseen efectos antiinflamatorios beneficiosos, como la inducción de la manganeso-superóxido dismutasa y la ciclooxigenasa. La liberación de proteínas de fase aguda y de antiproteasas, la liberación de citoquinas antiinflamatorias, como la IL-4, IL-6, IL-10, IL-1ra y la disminución de la síntesis de receptores de IL-1 y del TNF.

Varios ensayos clínicos han investigado la utilidad de tratamientos dirigidos contra la acción de las citoquinas en pacientes con sepsis. Estudios con anticuerpos murinos monoclonales anti-TNF no demostraron su eficacia en cuanto a la mortalidad en pacientes con sepsis (6, 7). Un estudio sobre los efectos de la administración de receptores TNF demostró un aumento de

la mortalidad en aquellos pacientes que recibían dosis altas del receptor (8).

La administración de IL-1ra en pacientes con shock séptico, en un estudio no ciego, produjo disminución, dependiente de la dosis, en la mortalidad del enfermo con shock séptico (9). En un estudio subsiguiente en fase III, realizado de forma ciega en pacientes con sepsis o shock séptico, no se confirmó tal efecto (10). Sólo en aquellos pacientes identificados "a posteriori" con un riesgo de muerte mayor del 24%, hubo una reducción de la mortalidad.

En conclusión, el tratamiento con anti-toxinas no se ha demostrado eficaz en pacientes con sepsis o shock séptico y, de hecho, puede ser perjudicial. La supresión de la respuesta inflamatoria puede ser un objetivo indeseable en pacientes con sepsis.

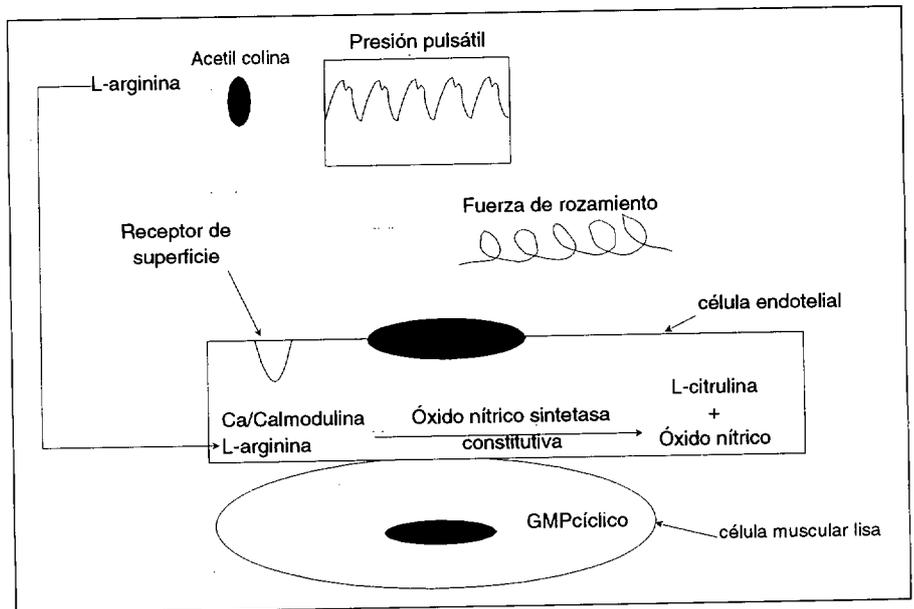


Figura 2. Óxido nítrico sintetasa constitutiva.

FUNCIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS

El papel de los neutrófilos en el daño celular mediado por la endotoxina o las bacterias ha sido claramente demostrado. Los neutrófilos y sus productos pueden producir lesión tisular y disfunción orgánica en la sepsis y en el shock séptico. La inhibición de la función de los neutrófilos mejora el pronóstico en algunos modelos animales. Por otro lado, el neutrófilo es un componente clave en la defensa del huésped ante la agresión inflamatoria. La leucopenia o la disminución de la función de los neutrófilos predispone a los enfermos a la infección. Además, tratamientos que aumentan el número o la función de los neutrófilos disminuyen el riesgo de infección en animales y humanos. El anticuerpo anti CD 11/18 (el receptor de los neutrófilos que regula su adhesión a la célula endotelial) se ha estudiado también en un modelo de sepsis en perros (11). El tratamiento produjo una tendencia (no significativa) a una mayor mortalidad, acompañada de un mayor deterioro en la hemodinámica y en parámetros de hipoxia tisular, y mayores niveles de endotoxina.

La estimulación de la función de los neutrófilos con G-CSF produce efectos beneficiosos en modelos experimentales de sepsis. En perros sépticos se ha demostrado que el pretratamiento con G-CSF atenúa el deterioro hemodinámico asociado con la sepsis, aumenta el número de neutrófilos en sangre y en el lavado broncoalveolar, aumenta el aclaramiento de endotoxina y mejora la supervivencia (12).

En resumen, la inhibición de la función de los neutrófilos en la sepsis puede limitar el daño tisular inflamatorio, pero también puede disminuir en exceso los mecanismos de defensa del huésped y conducir a un peor pronóstico.

MECANISMOS DE VASODILATACIÓN

La principal causa de muerte de los enfermos críticos no está en relación directa con la causa de ingreso sino con el desarrollo de fracaso multiorgánico e hipotensión refractaria a agentes presores. Por eso, el estudio de los mecanismos que

conducen a la vasodilatación e hiporreactividad vascular en el shock séptico tiene un gran interés tanto fisiopatológico como clínico (13).

El descubrimiento de la vía de la L-arginina/óxido nítrico (NO) ha cambiado nuestra comprensión de la fisiología cardiovascular (14-16). El NO es producido a partir de la L-arginina por un enzima constitutivo presente (figura 2), entre otros tipos celulares, en el endotelio vascular (5). Este enzima produce pequeñas cantidades de NO de forma continua, induciendo vasodilatación y antiagregación plaquetaria (en sinergismo con la prostaciclina). Su liberación está además estimulada por la acetilcolina, bradiquinina, sustancia P, histamina y productos derivados de las plaquetas (5).

El NO produce vasodilatación mediante la unión al grupo heme de la guanilato ciclasa y el consiguiente aumento de la concentración intracelular de GMP cíclico. En situaciones de estímulo inflamatorio se induce un nuevo enzima (figura 3) presente en las células del sistema fagocítico mononuclear y en el endotelio vascular (5). Este enzima produce grandes cantidades de NO y, a diferencia del constitutivo, es independiente de calcio y su actividad depende de la disponibilidad del sustrato L-arginina. El NO procedente de este enzima posee propiedades bactericidas, produciendo una disminución de la respiración mitocondrial, producción de radicales libres y daño del ADN (5).

La síntesis de NO puede inhibirse mediante análogos de la L-arginina, como la NG-monometil-L-arginina (LNMA), Nw-nitro-L-arginina (LNNA), Ngnitro Larginametilester (LNAME) y Nw-mino-L-arginina (LNM), que compiten por la unión del enzima NO sintetasa con su sustrato natural. La inducción de la isoforma inducible de la NO sintetasa puede inhibirse mediante corticoides, antagonistas del calcio e inhibidores de la síntesis de proteínas.

El papel del NO en la regulación del tono vascular en condiciones normales se ha demostrado por la observación de que la inhibición de la síntesis de NO en varias especies animales y en el hombre conduce a un aumento de la resistencia vascular (17-19). La función del NO en los cambios hemodinámicos del shock séptico viene apoyada por las observaciones experimen-

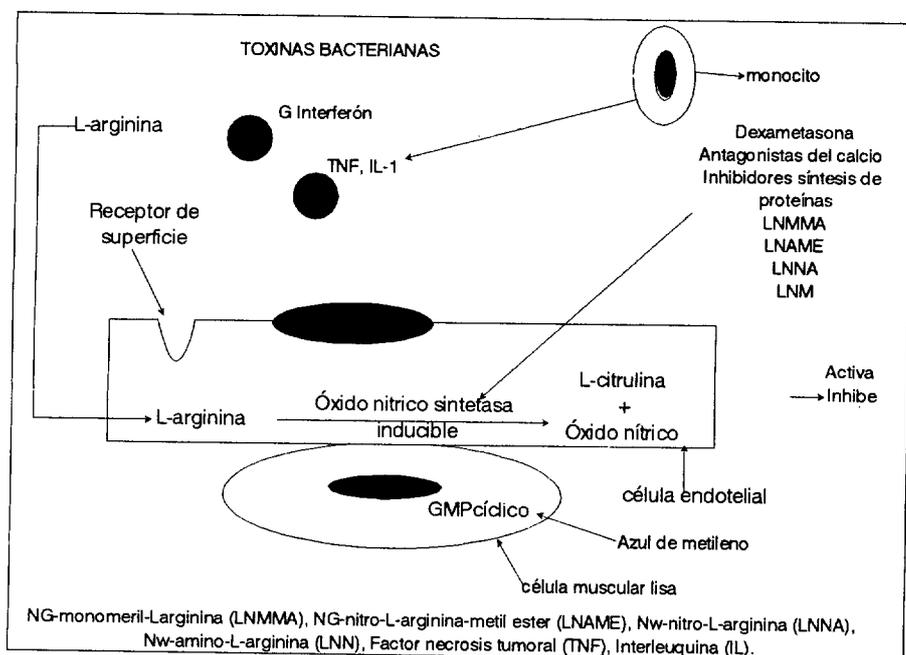


Figura 3. Óxido nítrico sintetasa inducible.

tales y clínicas. Desde el punto de vista experimental, es conocido que la endotoxina y diversos mediadores inflamatorios (por ejemplo, TNF, IL-1 y IL-2) inducen la producción de NO en células del sistema fagocítico mononuclear (20, 21).

La implicación de una excesiva liberación de NO en la vasodilatación del shock séptico fue sugerida inicialmente por observaciones *in vitro* por el grupo de Moncada (22). Subsiguientes estudios *in vivo* demostraron, en modelos experimentales de sepsis, que la inhibición de la síntesis de NO revierte la hipotensión asociada con el estímulo séptico (8, 23, 24). Lorente *et al.*, han demostrado que la administración de LNNA en ovejas se asocia con un efecto vasoconstrictor, tanto sistémico como pulmonar, y con una disminución del gasto cardíaco (25).

La disminución de la respuesta vasoconstrictora en la sepsis ha sido observada en experimentos *in vitro* (26, 27), *ex vivo* (28) e *in vivo* (29). Varias pruebas apoyan el concepto de que una excesiva liberación de NO es la responsable. Estudios *in vitro*, han demostrado que la hiporrespuesta vascular a la fenilefrina, tras exposición a la endotoxina, mejora mediante inhibidores de la síntesis de NO (11, 12, 16, 20).

La función del NO en los cambios hemodinámicos de la sepsis viene también apoyada por el hallazgo de que no sólo la endotoxina, sino también varias citoquinas consideradas importantes en la fisiopatología del shock séptico, como la IL-1 y el TNF, inducen la síntesis de NO en anillos vasculares y producen hiporreactividad vascular a agentes vasoconstrictores (12, 18, 30, 31).

Es importante destacar que en la sepsis no sólo existe una disminución de la respuesta vasoconstrictora a agentes presores, sino que la respuesta a algunos vasodilatadores también está disminuida (18, 25, 26, 32-34). Existen datos experimentales que sugieren que la capacidad de liberar NO ante determinados estímulos está conservada, sugiriendo que es el mecanismo de transducción de determinados vasodilatadores (como la acetilcolina) la función que está deteriorada, y no la función del enzima constitutivo "per se" (35).

La excesiva liberación de NO además de intervenir en la vasodilatación del shock séptico experimental y en la hiporreactividad vascular a agentes adrenérgicos, también está implicada en la disminución de la contractilidad miocárdica asociada a la sepsis, que es revertida mediante inhibidores de la síntesis de NO o azul de metileno (36, 37).

Por tanto existen pruebas procedentes de estudios *in vitro* e *in vivo*, y en modelos de sepsis en animales pequeños, que sugieren que la excesiva liberación de NO es responsable de la hiporreactividad vascular a agentes presores en la sepsis. Sin embargo, esto no se ha demostrado en animales grandes. Con el fin de probar la hipótesis de que la inhibición de la síntesis de NO puede mejorar la reactividad vascular a agentes vasoconstrictores en un modelo de sepsis en animal grande, Landín *et al.*, ha realizado un estudio en ovejas (38), con lo que quedó probada esta hipótesis.

Hay dos tipos de pruebas que apoyan el papel del NO en los cambios hemodinámicos del shock séptico humano. En primer lugar, algunos estudios han demostrado que los niveles de nitritos, nitratos y los metabolitos del NO, están elevados en pacientes con shock séptico, y que aquellos pacientes con mayores elevaciones presentan una resistencia vascular sistémica menor (39). Por otro lado, se han detectado concentraciones elevadas de GMP cíclico en pacientes con shock séptico, en comparación con enfermos sin shock o sujetos sanos (40). Existía una correlación entre los niveles de GMP cíclico y la resistencia vascular sistémica, pero no con la concentración de péptido natriurético atrial, otra posible fuente de GMP cíclico. Asimismo, se ha demostrado que enfermos con cáncer tratados con IL-2 presentan niveles elevados de nitritos, indicando la activación de la síntesis de NO por IL-2 en estos pacientes (41).

El segundo tipo de pruebas indicativas de que el NO tiene una importante función en los cambios hemodinámicos del shock séptico procede de estudios que analizan los cambios hemodinámicos producidos por inhibidores de NO sintetasa. Petros *et al.*, publicaron que la situación de hipotensión refractaria era revertida mediante la administración de análogos de la L-arginina (42). Landín *et al.*, han analizado los cambios producidos por la LNNA en una serie de 8 pacientes con sepsis severa, en los que encontramos que la LNNA producía una marcada vasoconstricción sistémica y pulmonar que era revertida mediante la administración de L-arginina (43). El azul de metileno que inhibe la guanilato ciclasa, también produce un efecto vasoconstrictor en pacientes con shock refractario (44). Haynes *et al.*, sugiere que en el shock séptico existe un aumento de la liberación de NO (45).

Los posibles efectos indeseables de la inhibición de la síntesis de NO están en relación con: 1) efectos hemodinámicos adversos observados tras la administración de análogos de la L-arginina, como la disminución del gasto cardíaco; 2) posibles efectos adversos relacionados con la supresión de funciones conocidas del NO (como el mantenimiento de un tono vasodi-

latador basal para mantener la perfusión de los órganos; su efecto antiagregante; y el efecto bactericida); y 3) el efecto beneficioso producido en algunos modelos de shock por agentes donadores de NO o por la L-arginina.

Existen pruebas indicativas de que la excesiva inhibición de la síntesis de NO con LNMMA, puede originar efectos deletéreos (46). Estos efectos adversos, asociados con la administración de altas dosis de LNMMA no se producía si se administraba de forma concomitante S-nitroso-N-acetilpenicilamina, un donante de NO. Estos resultados sugieren que cierta cantidad de NO es necesaria para mantener un cierto tono vasodilatador que mantenga la perfusión de los órganos (47, 48). Mientras que la inhibición inespecífica de su síntesis puede dar lugar a efectos hemodinámicos deletéreos, la inhibición de la NO sintetasa inducible produce efectos beneficiosos.

J. A. Lorente *et al.* y L. Landin *et al.*, (datos no publicados, 1994) apoyan el concepto de que la inhibición de la NO sintetasa constitutiva puede producir efectos hemodinámicos adversos, aunque la vasodilatación sistémica tras la inducción de la sepsis sea menor que en el grupo control, así mismo, se ha descrito que la alteración de la función hepática inducida por la endotoxina en ratones aumentaba importantemente si se administraba a continuación LNMMA (49). En animales la inhibición de la síntesis de NO potencia la vasoconstricción yeyunal producida por la endotoxina e induce hemorragia en la pared intestinal (50), este efecto podría dar lugar a un aumento de la translocación bacteriana con un empeoramiento del cuadro séptico.

La inhibición de la síntesis de NO puede también originar agregación plaquetaria, dando lugar a estasis microvascular, trombosis y coagulación intravascular diseminada (51-56).

¿HAY HIPOXIA TISULAR EN EL SHOCK SÉPTICO?

Algunos estudios recientes han puesto de manifiesto que los cambios celulares asociados con la sepsis no son el resultado de hipoxia, y que la hiperlactacidemia es un mal marcador de hipoxia tisular en la sepsis. Hurtado *et al.*, (57) compararon los cambios hemodinámicos y metabólicos encontrados en un grupo de ratas que recibían endotoxina, lo cual daba lugar a cambios hipodinámicos, o sometidas a disminuciones comparables en el gasto cardíaco inflando un balón situado en el ventrículo derecho. Aunque ambos grupos mostraron cambios similares en el transporte y consumo de oxígeno, el grupo con sepsis presentó mayores aumentos de la lactacidemia y disminución de la fuerza muscular generada cuando se aplicaban estímulos eléctricos. Por tanto, la hiperlactacidemia depende de los cambios metabólicos asociados con la administración de endotoxina y no con la disminución del transporte de oxígeno.

Otros estudios han demostrado que la concentración de compuestos de alta energía no varía, indicando que la bioenergética celular es normal, y que no existe hipoxia. Tresadem *et al.* (58) no encontraron cambios en la concentración de creatinín fosfato en biopsias musculares de 31 pacientes con sepsis. Hotchkiss *et al.* (59), utilizaron técnicas isotópicas, no encontrando signos de hipoxia en diversos tejidos estudiados procedentes de ratas con peritonitis. A similares conclusiones han llegado otros estudios midiendo compuestos de alta energía en diversos modelos de sepsis (60).

La sepsis produce unos cambios metabólicos caracterizados por un aumento en la utilización de la glucosa y producción de lactato. Estos cambios ocurren en condiciones de un aparente adecuado transporte de oxígeno a las células, en ausencia de hipoxia celular que ponga en marcha los mecanismos que llevan a estas anomalías. Alternativamente, la liberación de citoquinas asociadas a la endotoxemia puede iniciar los eventos intracelulares que llevan a la reacción celular al estrés.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Natanson C; Eichenholz PV; Danner RL; Eichacker PQ; Hoffman, W.D.; Kuo, G.C., et al. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J Exp Med* 1989; 169:823-832.
- 2 Suffredini AF; Fromm, RE; Parker MM; Brenner M; Kovacs JA; Wesley RA, et al. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med* 1989; 321:280-287.
- 3 Greisman, SE; Homick, RB; Wagner, HN Jr; Woodward, WE; Woodward TE. The role of endotoxin during typhoid fever and tularemia man. IV. The integrity of the endotoxin tolerance mechanisms during infection. *J Clin Invest* 1992; 89: 1603-1609.
- 4 Hoffman WD. Antiendotoxin therapies in septic shock, p. 772-5. In: Natanson, C. (moderator). Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann. Intern Med.* 1994; 120:771-783.
- 5 Quezado ZM; Natanson C; Alling DW; Banks SM; Koev CA; Elin RJ et al. A controlled trial of HA1A in a canine model of gram-negative septic shock. *JAMA* 1993; 269:2221-2227.
- 6 Fisher CJ Jr; Opal SM; Dhainaut JF; Stephens S; Zimmerman JL; Nightingale P. et al. Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. *Crit Care Med* 1993; 21: 318-327.
- 7 Wherry J; Wenzel R; Wunderink R; Silverman H; Perl T; Nasraway S et al. Monoclonal antibody to human tumor necrosis factor (TNF MAb): multicenter efficacy and safety study in patients with the sepsis syndrome. Presented at the 33 Interience Conference on antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, New Orleans, LA, 1993; abstrac no. 696:246.
- 8 Sadoff J; Solublo TNF receptors. Presented at the 3rd International Congress on the Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis: Mecanisms and Therapeutic Approaches. Munich, 1994.
- 9 Fisher CJ Jr; Slotner GJ; Opal SM; Pribble JP; Bone RC; Emmanuel, G et al. Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. *Crit Care Med.* 1994; 22:12-21.
- 10 Fisher CJ; Dhainaut JF; Opal SM; Pribble JP; Balk RA; Slotman GJ et al. Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. *JAMA* 1994, 271:1836-1843.
- 11 Eichacker PQ; Hollman WD; Farese A; Danner RL; Suffredini AF; Waisman Y et al. Leukocyte CD18 monoclonal antibody worsens endotoxemia and cardiovascular injury in canines with septic shock. *J Appl Physiol* 1993; 74:1885-1892.
- 12 Eichacker PQ; Waisman Y; Natanson C; Farese A; Hoffman WD; Bansk SM et al. Recombinant granulocyte colony stimulating factor reduces endotoxemia and improves cardiovascular function an survival during bacterial sepsis in nonneutropenic canines (abstract). *Clin Sci.* 1993; 41:240.
- 13 Parkor MM; Shelhamer JH; Natanson C; Alling D; Parrillo JE. Serial hemodynamic patterns in survivors and non-survivors of septic shock in humans. *Crit Care Med* 1987; 15:923-929.
- 14 Moncada S; Radomski MW; Palmer RMJ. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol.* 1988; 37:2495-2501.

- 15 Moncada S; Palmer RMJ; Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Eur J Clin Invest* 1991; 21:361-374.
- 16 Lorent JA; Landin L; Esteban A. Role of nitric oxide in the regulation of vascular tone in septic shock. In: Vicent, J.L. (ed.). *Update in Intensive Care and Emergency Medicine*. Springer-Verlag, Berlin, 1994, pp. 75-89.
- 17 Aisaka K; Gross SS; Griffith OW; Levi R. NG-Methylarginine, an inhibitor of endothelium derived nitric oxide synthesis is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo? *Biochem. Biophys. Res Commun* 1989; 160:881-886.
- 18 Kilbourn RG; Gross SS; Jubran A; Adams A; Griffith OW; Levi R. *et al.* NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc Natl. Acad Sci USA* 1990; 8:3639.
- 19 Vallance P; Collier J; Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide arteriolar tone in man. *Lancet* 1989; ii:997-1000.
- 20 Stuerh DJ; Kwon NS; Gross SS; Thiel BA; Leve R; Nathan CF. Synthesis of nitrogen oxides from L-arginine by macrophage cytosol: requirement for inducible and constitutive components. *Biochem, Biophys Res Commun*. 1989; 161:420-426.
- 21 Salvemini D; Korb R; Anggard E; Vane J. Immediate release of nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl AcadSci USA* 1990; 87:2593-2597.
- 22 Rees DD; Cellet S; Palmer, RMJ; Moncada S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1990; 173:541-547.
- 23 Kilbourn RG; Jubran A; Gross SS; Griffith OW; Levi R; Adams J *et al.* Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172:1132-1138.
- 24 Meyer J; Traber LD; Nelson S; Lentz CW; Nakazawa H; Herndon D *et al.* Reversal of hyperdynamic response to continuous endotoxin administration by inhibition of NO synthesis. *J Clin Invest* 1992; 73:324-3228.
- 25 Lorent JA; Landin L; Renes E; de Pablo R; Jorge P; Ródena E. *et al.* Role of nitric oxide in the hemodynamic changes of sepsis. *Crit Care Med*. 1993; 21:759-767.
- 26 Fleming I; Gray GA; Julou-Schaeffer G; Parrat JR; Stoclet JC. Incubation with endotoxin activates the L-arginine pathway in vascular tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 171:562-568.
- 27 McKenna TM. Prolonged exposure of rat aorta to low levels of endotoxin in vitro results in impaired contractility. *J Clin Invest*. 1990; 86:160-168.
- 28 Julou-Schaeffer G; Gray GA; Fleming I; Schott CC; Parrat JR; Stoclet JC. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. *Am J Physiol* 1990; 259:H1038-H1043.
- 29 Fink MP; Homer LD; Fletcher JR. Diminished pressor response to exogenous norepinephrine and angiotensin II in septic, unanesthetized rats: evidence for a prostaglandin-mediated effect. *J Surg Res* 1985; 38:335-342.
- 30 McKenna TM; Titus WAW. Role of monokines in altering receptor and non-receptor mediated vascular contraction in sepsis. In: B Roth, T. Nielsen and A. McKee (eds.). *Molecular and cellular mechanisms of septic shock*. Alan R Liss Inc, New York, 1989; 83:331-335.
- 31 Beasley D; Cohen RA; Levinski NG. Interleukin-1 inhibits contraction of vascular smooth muscle. *J Clin Invest* 1989; 83:331-335.
- 32 Lorent JA; Landin L; de Pablo R; Rene SE; Jorge P; Lister. DL-arginine improves endothelium-mediated vasodilation in sepsis. *Chest* 1992c; 102:S157.
- 33 Beasley D; Cohen RA; Levinski SA. Endotoxin inhibits contraction of vascular smooth muscle in vitro. *Am J. Physiol*. 1990; 258:H1187-H1192.
- 34 Wylam ME; Samsel RW; Umans JG; Mithcell RW; Leff AR; Shumacker PT. Endotoxin in vivo impairs endothelium-dependent relaxation of canine arteries in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis*. 1990; 142:1263-1267.
- 35 Parket JL; Adams HR. Selective inhibition of endothelium-dependent vasodilator capacity by *E. coli* endotoxemia. *Circ Res* 1993; 72:539-551.
- 36 Kumar A; Thota V; Kosuri R. Nitric oxide and cyclic GMP generation mediates human septic serum-induced in vitro cardiomyocyte depression. *Chest* 1993; 104:12S.
- 37 Kumar A; Kosuri R; Kandula P. Tumor necrosis factor-induced myocardial cell depression in vitro is mediated by nitric oxide generation. *Crit Care Med* 1993; 21:S278.
- 38 Landin L; Lorent JA; Renes E; Canas P; Pablo J. Inhibition of nitric oxide synthesis improves vascular reactivity in sepsis. *Chest* (1994, in press).
- 39 Ochoa JB; Udekwu AO; Billiar TR; Curran RD; Cerra FB; Simmons RL *et al.* Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann. Surg.* 1991; 214:621-626.
- 40 Schneider F; Lutun Ph; Couchot A; Bilbault P; Tempe JD. Plasma cyclic guanosine 3'-5' monophosphate concentrations and low vascular resistance in human septic shock. *Int. Care Med*. 1993; 19:99-104.
- 41 Hibbs JB Jr; Westenfelder C; Taintor R; Vavrin Z; Kablitz C; Baranowski RL *et al.* Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* 1992; 89:867-877.
- 42 Petros A; Bennet D; Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991; 338:1557-1558.
- 43 Lorente JA; Landin L; de Pablo R; Renes E; Lister D. The L-arginine pathway in the sepsis syndrome. *Crit Care Med* 1993; 21:759-767.
- 44 Lejeune P; Carlier E. Methylene blue increases systemic and pulmonary vascular tones in refractory septic shock. *Chest* 1993; 104:55S.
- 45 Haynes WG; Noon JP; Walker BR; Webb DJ. L-NMMA increases blood pressure in man. *Lancet* 1993; 342: 931-932.
- 46 Nava E; Palmer RM; Moncada S. The role of nitric oxide in endotoxic shock: effects of NG-monomethyl-L-arginine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20 Suppl 12:S132-S134.
- 47 Nava E; Palmer RMJ; Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock. How much is beneficial? *Lancet* 1991; 338: 1555-1557.
- 48 Wright CE; Rees DD; Moncada S. The protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Res*. 1992; 26:48-57.
- 49 Harbrecht BG; Billiar TR; Stadler J; Demetri AJ; Ochoa JB; Curran RD *et al.* Nitric oxide synthesis serves to reduce hepatic damage during acute murine endotoxemia. *Crit Care Med* 1992; 20: 1568-1574.
- 50 Hutcheson IR; Whittle BJR; Boughton-Smith NK. Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *Br J Pharmacol* 1990; 101:815-820.
- 51 Durante W; Schini VB; Scott-Burden T; Junquero DC; Kroll Mh; Vanhouette PM *et al.* Platelet inhibition by and L-arginine derived substance released by IL-1b treated vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1991; 261:H2024-H2030.
- 52 Shult PJ; Raji L. Endogenously synthesized nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis. *J Clin Invest* 1992; 90:1718-1725.
- 53 Lefroy DC; Tousoulis D; Crake T. Inhibition of nitric oxide synthesis. *Lancet* 1993; 342:1487-1488.
- 54 Madden HP; Breslin RJ; Wasserkrung HL; Efron BAG; Barbul A. Stimulation of T cell immunity by arginine enhances survival in peritonitis. *J Surg Res* 1988; 44:658-663.
- 55 Carey C; Siegfried MR; Ma XL; Wyrich AS; Lefer AM. Antishock and endothelial protective actions of a NO donor in mesenteric ischemia and reperfusion. *Circ Shock* 1992; 38:209-216.
- 56 Symington, PA; Ma XL; Lefer AM. Protective actions of S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) in a rat model, of hemorrhagic shock. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol*. 1992; 14:789-797.
- 57 Hurtado FJ; Gutiérrez AM; Silva N; Fernández E; Edward Khan A; Guillerrez G. Role of tissue hypoxia as the mechanism of lactate acidosis during *E. coli* endotoxemia. *J. Appl Physiol* 1992; 72:1985-1901.
- 58 Tresadern JC; Threlfall CJ; Wilford K; Irving MH. Muscle adenosine 5 triphosphate and creatinine phosphate concentrations in relation to nutritional status in sepsis in man. *Clin Sci* 1988; 75:233-42.
- 59 Hotchkiss RS; Rust RS; Dence CS. Evaluation of the role of cellular hypoxia in sepsis by the hypoxic marker [18F] fluoromisonidazole. *Am J. Physiol* 1991; 261:R956-R972.
- 60 Gutiérrez G. Sepsis and Cellular Metabolism. In: Reinhart, K.; Eyrich, K.; Sprung, C. (eds.) *Sepsis. Current perspectives in pathophysiology and therapy*. Springer Berlin-Heidelberg New York, pp. 180-190.