

Lej. 11/20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios de Postgrado

Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán

“AZUL DE METILENO EN CHOQUE SEPTICO REFRACTARIO”

TESIS DE POSTGRADO
Que para obtener el título de:
MEDICO ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA
p r e s e n t a
DR. RAUL } CARRILLO ESPER



Asesor: Dr. José Manuel Portela

INNSZ

México, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

269070



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Indice	1
Hoja de firmas	2
Antecedentes	3
Planteamiento del problema	20
Objetivos	21
Hipótesis	22
Metodología	23
Caso clínico	25
Resultados	27
Discusión	35
Conclusiones	40
Bibliografía	42

DR DONATO ALRCÓN SEGOVA -----

DIRECTOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRAN"

DR EFRAÍN DÍAZ JOUANEN -----

JEFE DE ENSEÑANZA DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRAN"

DR LUIS USCANGA -----

PROFESOR DEL CRUSO DE MEDICINA INTERNA DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRAN"

DR JOSE MANUEL PORTELA -----

ASESOR DE TESIS

ANTECEDENTES

La incidencia de sepsis está en aumento. Cada año se reportan 400.000 nuevos casos en los Estados Unidos. En vista de esto, la Sociedad América de Terapia Intensiva y el Colegio Americano de Médicos especialistas en Cardiopulmonar se reunieron y dictaron las definiciones de sepsis y entidades relacionadas con la finalidad de unificar criterios. Las definiciones que resultaron del consenso son las siguientes:

- a) Infección: Fenómeno microbiano caracterizado por una respuesta inflamatoria a la presencia de microorganismos o a la invasión de tejidos normalmente estériles por estos microorganismos.
- b) Bacteremia: Presencia de bacterias viables en la sangre.
- c) Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica: Respuesta inflamatoria sistémica que se inicia después de la acción de varios disparadores como pueden ser: politrauma, quemaduras, infección, pancreatitis, etc. Esta respuesta se manifiesta por la presencia de dos o más de los siguientes puntos:
 - 1) Temperatura sistémica por arriba de 38 grados o por debajo e 36 grados centígrados.
 - 2) Frecuencia cardiaca arriba de 90 latidos por minuto.
 - 3) Frecuencia respiratoria por arriba de 20 por minuto.
 - 4) PaCO₂ por arriba de 32 mmHg.
 - 5) Leucocitos por arriba de 12,000 por ml o por debajo de 4,000 por ml con presencia de más de 10% de bandas.

- d) Sepsis grave: Sepsis asociada a disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión.
- e) Choque séptico: Sepsis con hipotensión a pesar de una adecuada reanimación con líquidos, asociada a alteraciones de la perfusión que incluyen: acidosis láctica, oliguria o una alteración aguda en el estado mental.
- f) Hipotensión: Presión sistólica por debajo de 90 mmHg o una reducción de más de 40 mmHg en relación a los niveles basales.
- g) Disfunción orgánica múltiple: Presencia de funciones orgánicas alteradas en un paciente grave que para mantener la homeostasis se requiere de intervención mecánica y farmacológica.

Dentro de los criterios de disfunción orgánica múltiple se tienen los siguientes:

Organo/ Sistema	Disfunción
Pulmonar	Hipoxia que requiere asistencia ventilatoria mecánica, FIO ₂ arriba del 50% y Qs/Qt arriba del 25%. PaCO ₂ arriba del 50 mmHg y FR arriba de 40%.
Hepática	Bilirrubina sérica arriba de 2 mgs y aminotransferasas dos veces arriba de lo normal

Renal	Oliguria con diuresis por debajo de 500 ml en 24 horas y/o incremento de la creatinina a más de 2 mgs.
Intestinal	Ileo persistente.
Hematológica	TTP Y TP con alargamiento de más de 25% y/o trombocitopenia por debajo de 20,000, leucopenia menos de 1000, hematócrito menos de 20%.
Sistema Nervioso Central	Depresión del estado de alerta, agitación psicomotriz. Glasgow menor de 6.
Hemodinámico	Hipotensión con sistólica por debajo de 90 mmHg, PAM por debajo de 50 mmHg. PH sérico por debajo de 7.24. Disfunción de bomba y síndrome de fuga capilar

El 40% de los pacientes con sepsis desarrollan choque séptico y disfunción orgánica múltiple, lo cual es ominoso, dado que el 80% de ellos fallecen. La sépsis es causada principalmente por infección por bacterias aeróbicas o anaeróbica, básicamente organismos gram negativos y gram positivos, siendo los gram negativos los más frecuentes y los que se asocian a cuadros más graves. Dentro de este grupo de gérmenes destacan: E. coli, Klebsiella, Pseudomonas y Enterobacterias, pero también hay que mencionar que otros microorganismos incluyendo micobacterias, hongos, virus, riketsias y protozoarios pueden producir un cuadro indistinguible a los de los gram negativos.

Los sitios más frecuentes de infección que pueden predisponer a sépsis y choque séptico son: tracto genito-urinario, gastrointestinal, respiratorio, heridas quirúrgicas y abdomen, así como sitios de acceso vascular (catéteres).

PATOGENIA

Los eventos que inician la respuesta inflamatoria sistémica y que llevan al estado de choque, son una interacción compleja entre los elementos del sistema inmune y los constituyentes macromoleculares de los organismos infectantes. Una vez que los fagocitos mononucleares se ponen en contacto con las macromoléculas microbianas (endotoxinas y otras), sintetizan y liberan unas sustancias solubles llamadas citocinas dentro de las que destacan la interleucina 1, 6 y el factor de necrosis tumoral alfa,

las cuales además de sus acciones inmunológicas tienen importantes acciones metabólicas y hemodinámicas que producen cambios importantes a nivel del funcionamiento cardiopulmonar, endotelial y del metabolismo intermedio.

Dentro de las acciones de estas se tienen la inducción de fiebre, activación leucocitaria, activación de precursores celulares de médula ósea, cambios en las funciones sintéticas del hígado, cambios en el patrón de obtención de energía y alteraciones profundas en la función del endotelio vascular, así como en la distribución del volumen intravascular, dado que condiciona incremento de la permeabilidad del endotelio, con fuga de líquido al intersticio y caída significativa del volumen circulante efectivo.

Además de los efectos ya mencionados de las citocinas, las macromoléculas bacterianas interactúan directamente con otros componentes humorales y celulares del sistema inmune, de la cascada de la coagulación y de otros sistemas humorales corporales, dentro de los que destacan los siguientes:

MEDIADOR	EFECTO
Complemento	Agregación de polimorfonucleares, producción y activación de radicales libres.

Factor Hageman la coagulación.	Activación de la vía intrínseca de
Histamina	Vasodilatación y aumento de permeabilidad vascular.
Cininas	Vasodilatación y aumento de permeabilidad vascular.
Radicales libres de oxígeno	Disfunción miocárdica, endotelial, celular y vascular.
Oxido nítrico	Vasodilatación, depresión miocárdica.
Factor activador plaquetario	Hipotensión, daño pulmonar directo, daño endotelial generalizado.

De esta manera, en el paciente con sépsis que evoluciona al choque séptico se desencadenan una serie de cascadas que se resumen en lo siguiente:

- 1) Regulación inapropiada de los mecanismos inflamatorios endógenos.
- 2) Interacción de citocinas con otros mediadores.
- 3) Daño endotelial y celular generalizado.
- 4) Alteraciones en la relación aporte- consumo de oxígeno.
- 5) Mecanismo de isquemia- reperfusión.
- 6) Daño mediado por radicales libres de oxígeno.
- 7) Interacciones orgánicas anormales.

De lo anotado previamente, se desprende que los eventos que llevan al choque en un paciente séptico están en relación a: vasodilatación, depresión miocárdica y disminución del volumen circulante efectivo. En las fases iniciales del choque séptico, la vasodilatación y la depresión de volumen son los eventos fisiopatológicos predominantes, pero conforme se profundizan los cambios humorales ya mencionados, la depresión miocárdica juega también un papel muy importante, acentuando la hipoperfusión tisular y la caída en el aporte de oxígeno sistémico.

Aún con presión arterial sistémica y gasto cardíaco dentro de rangos clínicamente aceptables, la distribución de flujo en el paciente con choque séptico es anormal, lo cual, junto con la disfunción endotelial y celular conllevan a un gran déficit de oxígeno sistémico, lo cual de no ser revertido de forma adecuada y temprana lleva a la muerte celular, a la acidosis láctica y a la disfunción orgánica múltiple.

Los efectos cardiovasculares de la sépsis y del choque séptico, son variados y la respuesta individual depende de la reserva cardiovascular, de la gravedad de la infección, así como de una adecuada reanimación temprana. La sépsis usualmente se asocia a un estado hiperdinámico caracterizado por gasto cardiaco elevado, disminución de la resistencia vascular sistémica y presiones de llenado normales o disminuidas. La presencia de un estado de bajo gasto y de aumento de resistencia vascular sistémica se observa como evento preterminal y se asocia a depresión contractil importante o a una reanimación inicial inadecuada.

La depresión de la función miocárdica en la sépsis es común a pesar de que se presenten gastos cardiacos normales o elevados, de esta manera en estudios ecocardiográficos se ha observado disminución de la fracción de expulsión así como dilatación biventricular. Además de lo anterior se ha reportado disfunción diastólica significativa, lo cual limita el manejo con volumen. La fisiopatología de la disfunción miocárdica es compleja y está asociada a la presencia de sustancias depresoras del miocardio como son: citocinas, factor activador plaquetario y óxido nítrico.

OXIDO NITRICO

El óxido nítrico es una molécula gaseosa e inorgánica que juega un papel crucial en las funciones bioquímicas de los mamíferos como mediadora y citotóxica. Cada vez hay más evidencia de que el óxido nítrico es mediador importante en el

choque séptico, choque hemorrágico y daño intestinal debido a isquemia y reperfusión, pero también es fundamental para mantener la perfusión en los lechos capilares y como sustancia tóxica contra bacterias y células tumorales.

La vida media del óxido nítrico en agua es de aproximadamente tres segundos, lo cual es debido a que se dimeriza rápidamente o por cinética de tercer orden da origen a radicales libres de oxígeno. Dentro de estos, el óxido nítrico reacciona con el anión superóxido para formar peroxinitrito, el cual es de sus metabolitos más estables.

En fase gaseosa el óxido nítrico reacciona con oxígeno para formar dióxido de nitrógeno (NO_2). En fase acuosa el óxido nítrico es metabolizado a nitritos y nitratos, los cuales a su vez pueden ser fácilmente eliminados por vía urinaria (mamíferos).

In vivo, el óxido nítrico, interacciona rápidamente con la oxihemoglobina dando origen a metahemoglobina y nitratos, de esta manera puede ser medido en plasma y en orina en forma de nitratos. También se ha demostrado que el óxido nítrico puede reaccionar con tioles y de esta manera puede circular a nivel sanguíneo y tener mayor estabilidad. Forma complejos con proteínas que contienen hierro como la hemoglobina, mioglobina, citocromo C y guanilato ciclasa.

El óxido nítrico se sintetiza a partir del grupo guanidino de la L-arginina por una serie de enzimas denominadas en forma genérica sintetetas del óxido nítrico. Dentro de estas se han descrito tres

isoformas: la endotelial constitutiva, la cerebral constitutiva y la inducible, esta última descrita a nivel de macrófagos, polimorfonucleares y endotelio. Aunque estas isoformas tienen diferentes pesos moleculares y diferentes requerimientos de cofactores, todas dependen de la presencia de NADPH. Además de que pueden ser inhibidas en un grado variable por análogos de la L-arginina como la N-metil-L-arginina. Todas las isoformas contienen cuatro grupos prostéticos que son: grupo flavina- adenina, grupo flavina- mononucleótido, tetrahidrobiopterina, y complejo M, además de depender de calmodulina, la cual es fundamental para la transferencia de electrones a partir del NADPH.

La isoforma constitutiva y la síntesis de óxido nítrico secundaria a esta, mantienen funciones fisiológicas fundamentales como son: flujo tisular, función plaquetaria, función de polimorfonucleares, acción bactericida, mantenimiento de la relación ventilación-perfusión, etc.

La isoforma inducible, no está activa en condiciones fisiológicas, sino que es inducida por una serie de estímulos proinflamatorios como son: el lipopolisacárido bacteriano, las citocinas o una combinación de estas. La isoforma constitutiva en su forma activa, es una estructura dimerica que tiene un peso molecular de 262 kD. A diferencia de la constitutiva una vez activada induce la producción de grandes cantidades de óxido nítrico, que en lugar de ser pulsátil como con las formas constitutivas, es continua. La inducción de esta sistetasa consiste de un complejo modelo transcripcional que incluye la activación de

nuevo RNAm para lo cual se requiere activar regiones promotoras a nivel del DNA, lo cual es inducido por lipopolisacárido o factor de necrosis tumoral.

Muchas de las acciones biológicas del óxido nítrico son mediadas a través del sistema de la guanilato-ciclasa. El óxido nítrico que es una pequeña molécula lipofílica difunde a las células y una vez en el citosol activa la guanilato-ciclasa soluble incrementando los niveles de GMPc. El incremento en los niveles del GMPc condiciona secuestro de calcio a nivel intracelular y de esta manera desencadena vasodilatación y disminución del inotropismo cardíaco.

Por otro lado, el óxido nítrico tiene funciones independientes de GMPc como es la actividad citotóxica.

Grandes cantidades de óxido nítrico como son vistas en pacientes en estado séptico y en choque séptico, además de los efectos anteriores producen autoribosilación de varios sistemas enzimáticos, lo cual explica el efecto neurotóxico y de toxicidad a nivel hepatocítico.

Estudios iniciales en relación al efecto del óxido nítrico sobre los cambios hemodinámicos vistos en el choque séptico demostraron una asociación entre estos, en investigaciones posteriores se observó que la hipotensión y la depresión miocárdica en respuesta al lipopolisacárido y el factor de necrosis tumoral eran prevenidos o revertidos con inhibidores de la sintetasa de óxido

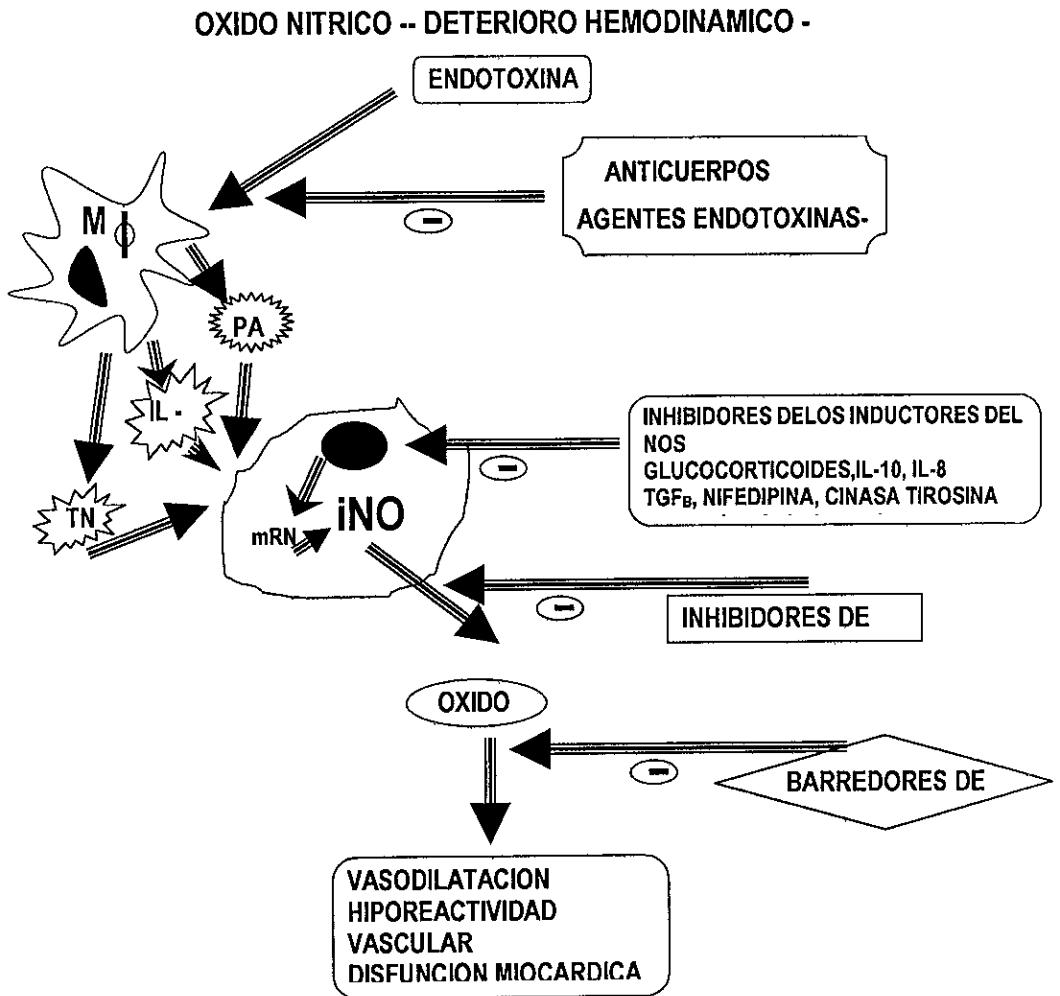
nítrico. En ratas anestesiadas la administración intravenosa de *E. coli* induce una rápida caída de la presión arterial, así como una pobre respuesta a la infusión de norepinefrina para el incremento del tono vascular. En este modelo la administración de L-NAME, un inhibidor de la sintetasa del óxido nítrico produjo un rápido incremento en la presión arterial y una buena respuesta a la norepinefrina. Este y otros estudios semejantes han mostrado de manera repetitiva que la hipotensión, la hiporreactividad vascular y la pobre respuesta a la norepinefrina en el choque séptico están en relación al incremento en los niveles del óxido nítrico y a la activación de la sintetasa inducible en el endotelio vascular. Para apoyar lo anterior, se demostró en modelos animales de que la activación de la sintetasa inducible por lipopolisacárido incrementaba a la hora de la inyección de este los niveles de nitratos en sangre y en orina y que el pretratamiento con inhibidores de la sintetasa, bloqueaba el incremento de los nitratos, los cuales son reflejo como ya comentamos de los niveles de óxido nítrico en sangre.

Estudios recientes han mostrado que el exceso de producción de óxido nítrico bloquea la respiración mitocondrial y la extracción de oxígeno a nivel tisular, lo cual es precursor de disfunción orgánica múltiple.

A nivel cardíaco el óxido nítrico se produce a nivel del endotelio vascular, del endotelio endocárdico y de los miocitos cardíacos. La exposición de estos a interleucina 1, 2, 6 y factor de necrosis tumoral incrementa la producción de óxido nítrico y reduce de

manera significativa la contractilidad miocárdica. Evidencia experimental ha mostrado que la activación de la sintetasa inducible cardiaca conduce a depresión miocárdica ex- vivo, proceso que es revertido con inhibidores del óxido nítrico.

En la figura 1 se muestra esquemáticamente la activación del sistema de sintetasa inducible de óxido nítrico en el choque séptico.



MANEJO HEMODINAMICO

La mitad de los pacientes que mueren de sépsis lo hacen de hipotensión refractaria al manejo habitual y la otra mitad de disfunción orgánica múltiple.

El manejo hemodinámico del paciente séptico es fundamental, dado que de la optimización de este dependerá el mantener la presión de perfusión sistémica y el aporte de oxígeno a los tejidos periféricos. La reanimación con volumen es la fase inicial de manejo, esta se da con una mezcla racional de coloide y cristaloiide. Cuando la reanimación con volumen es insuficiente para restaurar la inestabilidad hemodinámica, deberá iniciarse con medicamentos vasoactivos. La dopamina es comunmente empleada como el medicamento inicial en el paciente séptico hipotenso. Su efecto adrenérgico beta aumenta la función inotrópica cardiaca y su efecto alfa incrementa la resistencia vascular. La dobutamina como agente inotrópico puro ha sido usada sola o en combinación con aminas presoras como la dopamina, norepinefrina y fenilefrina.

En base a lo anterior, las metas hemodinámicas en el manejo del paciente en choque séptico son las siguientes:

- 1) PCP arriba de 10, pero debajo de 20 mmHg.
- 2) PAM por arriba de 70 mmHg.
- 3) Indice cardíaco arriba de 3lts/m²/min.
- 4) Aporte de oxígeno arriba de 600 ml/min.
- 5) Consumo de oxígeno arriba de 250 ml/min
- 6) Lactato en sangre por debajo de 2 mmol/lit.

7) Diuresis por arriba de 1ml/kg/hr.

En los pacientes en los que falla la terapéutica convencional, se engloban dentro del concepto de choque séptico refractario y habitualmente se asocian a un mal pronóstico. En estos enfermos se han intentado una gran variedad de abordajes terapéuticos como son: infusión de anticuerpos en contra endotoxina gram negativa, infusión de gamaglobulina, anticuerpos monoclonales en contra de interleucina 1, factor de necrosis tumoral y receptor de factor de necrosis tumoral, bloqueo de la producción de prostaglandinas, hemofiltración y plasmaféresis con la finalidad de depurar no solamente citocinas, sino también, otros mediadores del choque séptico. Todos estos intentos terapéuticos han fracasado tanto en modelos animales como en ensayos clínicos.

En vista de que la activación de la sintetasa inducible de óxido nítrico y el óxido nítrico resultante juegan un papel fundamental en la fisiopatología del deterioro hemodinámico en el choque séptico, el uso de inhibidores ya sea de la sintetasa o de la guanilato-ciclasa pudiesen tener efecto positivo en el manejo de los enfermos en choque séptico refractario. Los inhibidores de la sintetasa en los diferentes ensayos clínicos publicados no han mostrado resultados positivos, pero el uso de azul de metileno que es un potente inhibidor de la guanilato- ciclasa, ha mejorado de manera significativa a corto plazo y durante corto tiempo el estado hemodinámico de los pacientes con choque séptico refractario.

El choque séptico se caracteriza por vasodilatación arterial, gasto cardíaco elevado y disminución en la respuesta del corazón y vasos periféricos a las aminas simpaticomiméticas^{1, 2}.

Hay evidencia que sugiere que la desensibilización de los vasos sanguíneos a los agonistas adrenérgicos en la respuesta inflamatoria sistémica y choque séptico es mediada no solamente por disminución en el número de receptores o su baja afinidad a los agonistas, sino que de manera preponderante es debida a una excesiva producción de óxido nítrico. Por otro lado, en modelos in vitro se ha demostrado que el óxido nítrico es un depresor potente de la función miocárdica en el choque endotóxico^{3, 4, 5}.

Por lo anterior, se ha postulado que el bloqueo en la síntesis o en la acción del óxido nítrico pudiese beneficiar a los enfermos en choque séptico refractario a las medidas terapéuticas convencionales^{6, 7}.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

El paciente en choque séptico refractario al uso de volumen, inotrópicos y aminas presoras que cursa con altos niveles de óxido nítrico responde al uso del azul de metileno que es un potente inhibidor de la guanilato-ciclasa.

OBJETIVOS

- 1) Estudiar el efecto del azul de metileno en una paciente con choque séptico refractario
- 2) Hacer recomendaciones en relación al uso de los bloqueadores de la sintetasa del óxido nítrico y de la guanilato-ciclasa en los pacientes en choque séptico.
- 3) Revisar la literatura al respecto.

HIPOTESIS

El paciente en choque séptico refractario responde hemodinamicamente a la infusión de azul de metileno

METODOLOGIA

- 1) Descripción de un caso de choque séptico refractario en el cual se usó azul de metileno.
- 2) La dosis de azul de metileno fue de 2 mgs/kg de peso diluido en 100 ml de solución salina al 0.9%, infundiéndose en 30 minutos.
- 3) Se practicó monitoreo hemodinámico avanzado mediante la colocación de cateter de flotación pulmonar, línea arterial y realización de ecocardiograma bidimencional.
- 4) Se monitorizaron parámetros hemodinámicos, respiratorios y metabólicos a los 0,15,30,45,60,120 y 180 minutos posterior a la infusión del azul de metileno.
- 5) Los parámetros ecocardiográficos se tomaron a los 0,15 y 30 minutos posteriores a la infusión de azul de metileno.
- 6) De los parámetros hemodinámicos se determinaron mediante un programa computarizado: Frecuencia cardiaca, presión arterial media, presión pulmonar sistólica, presión pulmonar media, presión pulmonar diastólica, PCP, PVC, índice cardiaco, índice de resistencia vascular pulmonar, índice de resistencias vasculares sistémicas.
- 7) De los parámetros metabólicos se determinaron: índice de aporte de oxígeno, índice de consumo de oxígeno, porcentaje de extracción, niveles de nitratos en orina, pH, bicarbonato en sangre y diferencia arteriovenosa de oxígeno

- 8) De los parámetros respiratorios se determinaron: PaO_2 , disensibilidad estática y dinámica, cortocircuito intrapulmonar y saturación arterial de oxígeno.
- 9) Del estudio ecocardiográfico bidimensional, se monitorizó la fracción de expulsión como índice de fracción contractil y la función diastólica mediante la relación de las curvas E-A que son indicadoras del llenado diastólico.

CASO CLINICO

Enferma de 75 años, que fue sometida a resección parcial de glioblastoma multiforme parieto-temporal derecho. En el postoperatorio la enferma presentó crisis convulsivas y aspiración de contenido gástrico, con desarrollo de neumonía derecha. Posterior a esto, inicio con fiebre de hasta 39 grados centígrados, calosfríos, taquicardia, datos de insuficiencia respiratoria y leucocitosis de 20 000 cel/mm³. Por deterioro neurológico progresivo, hipotensión e incremento de la falla respiratoria la enferma ingreso a la Unidad de Terapia Intensiva del Hospital Central Sur de Alta Especialidad PEMEX. A su ingreso se intubó y se inicio apoyo ventilatorio mecánico con ventilador volumétrico en CMV, con fracción inspirada del 60% y PEEP de 6 Cm de H₂O con lo que se mantuvieron saturaciones arteriales por arriba del 90%. La presión arterial a su ingreso en 60/40 mmHg motivo por el cuál se inició manejo a base de cristaloides y coloide para expandir volumen intravascular y al no haber respuesta se inició con dobutamina y norepinefrina.

A pesar de lo anterior y de que se elevó la dosis de dobutamina a 15 mcg/kg/min y norepinefrina a 10 mcg/kg/min, la paciente continuaba en estado de choque profundo con presión arterial media entre 40 y 45 mmHg, pero presentando pulso periférico amplio e incremento en la temperatura distal, oligúrica, y con acidosis metabólica. En los hemocultivos y en cultivo de secreción bronquial con desarrollo de E. coli. Y el manejo antimicrobiano fue a base de Meropenem y netilmicina.

Se procedió al monitoreo hemodinámico invasivo mediante la colocación de catéter de flotación pulmonar y línea arterial. En base a éstos que mostraron disminución de la resistencia vascular sistémica, índice cardiaco dentro de lo normal y caída importante de la presión arterial media, se continuó la precarga con volumen y se incrementó aun más la dosis de norepinefrina sin que se presentara mejoría en la presión arterial

media, motivo por el cuál se catalogó a la enferma en estadio de choque séptico refractario. Se practicó ecocardiograma en el cual se encontró disfunción diastólica tipo I, con fracción de expulsión del 69%, sin evidencia de dilatación ventricular. Por lo anterior y en vista de la nula respuesta hemodinámica, se decidió iniciar manejo, con azul de metileno con la finalidad de observar la respuesta hemodinámica aguda y ver si era posible modificar la evolución de la enferma hacia el deterioro.

La dosis utilizada de azul de metileno fue de 2 mg/kg diluido en 100 ml de solución salina al 0.9%, infundiéndolo en 30 minutos. Se tomaron parámetros hemodinámicos y metabólicos convencionales basales y a los 15, 30,45,60, 120 y 180 minutos después de terminada ésta, así como ecocardiograma basal y a los 15 y 30 minutos de la infusión. Se midieron los niveles de nitritos en orina en cada una de las determinaciones. Durante la infusión de azul de metileno, así como en las diferentes determinaciones, no se hicieron modificaciones con relación a la dosis de aminos y volumen infundido

EVOLUCION FINAL

A pesar de la mejoría hemodinámica que se observó en los primeros 180 minutos de la infusión de azul de metileno, la enferma presentó en forma progresiva hipotensión con vasodilatación sistémica y caída del gasto cardiaco, el bloqueo metabólico se hizo mas pronunciado y la enferma evolucionó a Disfunción Orgánica Múltiple.

RESULTADOS

En las figuras 2, 3 y 4 se anotan las respuestas hemodinámicas, metabólicas y respiratorias respectivamente a la infusión de azul de metileno.

RESPUESTA HEMODINAMICA:

Dentro de los resultados más importantes tenemos el incremento de la presión arterial media de 46 mmHg a 62 mmHg a los 15 minutos de la infusión, llegando a presentar a los 180 minutos 75 mmHg. El índice cardiaco de 3 L/m² presento incremento hasta de 4.1 l/m² a los 60 minutos con disminución posterior de ésta a los 120 y 180 minutos pero siempre por arriba del gasto cardiaco basal. El índice de resistencia vascular sistémica de 773 Dinas/cm⁻⁵ se incrementó a los 15 minutos a 1162 Dinas /cm⁻⁵ presentando posteriormente descenso progresivo pero con un nuevo repunte a los 120 y 180 minutos.

La presión pulmonar media descendió progresivamente. La PVC y la PCP presentaron modificaciones con relación a la disfunción diastólica ventricular.

En el ecocardiograma se observó incremento de la fracción de expulsión hasta del 75%, con mejoría de la relajación diastólica, lo cual se manifestó por una inversión de la relación de las ondas E/A. Además de lo anterior se observó a partir de los 45 minutos un incremento del volumen latido. Esto en forma global demuestra mejoría en la eficiencia cardiaca.

RESPUESTA METABOLICA

A pesar del incremento significativo en el índice de aporte de oxígeno, el consumo y el porcentaje de extracción no se modificaron, persistiendo la acidosis metabólica. Lo anterior traduce la grave disfunción celular en la que se encontraba esta paciente.

Por otro lado los niveles de nitritos en orina se negativizaron a partir de los 30 minutos de la infusión de azul de metileno.

RESPUESTA RESPIRATORIA:

La saturación arterial de oxígeno presentó un descenso en los primeros 15 minutos de 93 a 83%, lo cuál se asoció a un incremento en el corto circuito intrapulmonar del 20 al 30%. Posteriormente y a pesar del incremento del corto circuito tanto la oxemia como la saturación arterial se incrementaron progresivamente, esto sin modificar los parámetros ventilatorios. Como ya se comentó, la presión pulmonar media descendió progresivamente en los primeros 60 minutos para posteriormente incrementarse a los 120 y 180 minutos, con el consecuente incremento del índice de resistencia vascular pulmonar.

Cuadro 1. PARAMETROS HEMODINAMICOS

Parámetros	0'	15'	30'	45'	60'	120'	180'
F.C.	135	144	144	149	144	148	149
PAM	46	62	60	64	61	77	75
PPS	33	26	31	25	42	34	33
PPD	23	18	18	15	22	20	15
PPM	27	23	25	20	20	26	22
PCP	16	17	19	23	22	19	15
PVC	17	15	16	21	19	14	11
IC	3	3.1	3.2	3.9	4.1	3.1	3.5
VL	36	35	36	42	45	20	23
IRVP	293	154	150	160	118	178	162
IRVS	773	1161	1097	885	825	1601	1481

F.C. Frecuencia cardiaca, PAM: presión arterial media, PPS: presión pulmonar sistólica, PPD: presión pulmonar diastólica, PPM: presión pulmonar media, PCP: presión capilar pulmonar, PVC: presión venosa central, IC: índice cardiaco, IRVS: índice de resistencias vasculares sistémicas, IRVP: índice de resistencias vasculares pulmonares, VL: volumen latido.

Cuadro 2. PARAMETROS METABOLICOS

Parámetros	0'	15'	30'	45'	60'	120'	180'
IDO2 (mL/min/m ²)	360	368	387	471	500	489	478
IVO2 (mL/min/m ²)	111	114	115	140	151	100	104
E02 (%)	30	31	29	29	30	20	21
PH	7.37	7.34	7.33	7.32	7.33	7.30	7.30
HCO3 (mmol/L)	18	18.2	18.4	17.5	13.6	15	15.7
D (a-v)O2 (mmHg)	3.7	3.7	3.6	3.6	3.7	2.8	2.9

IDO2: índice de aporte de oxígeno, IVO2: índice de consumo de oxígeno, %E02: porcentaje de extracción de oxígeno; pH, HCO3a: bicarbonato arterial; D(a-v)O2: diferencia arterio-venosa de oxígeno

Cuadro 3. PARAMETROS RESPIRATORIOS

Parámetros	0'	15'	30'	45'	60'	120'	180'
PaO ₂ (mmHg)	74	72	79	84	79	83	76
SaO ₂ (%)	93	83	94	94	96	97	92
Qs/Qt (%)	20	30	28	28	26	36	35
Dist. Est (CmH ₂ O).	34	32	35	30	33	32	33
Dist. Din (CmH ₂ O)	37	37	33	34	28	29	30
PPM (mmHg)	27	23	25	20	20	26	22

PaO₂: presión arterial de oxígeno; SaO₂: saturación arterial de oxígeno; Qs/Qt: circuitos intrapulmonares; Dist Est: distensibilidades estáticas, Dist Dinam: distensibilidades dinámicas; PPM: presión arterial pulmonar medio

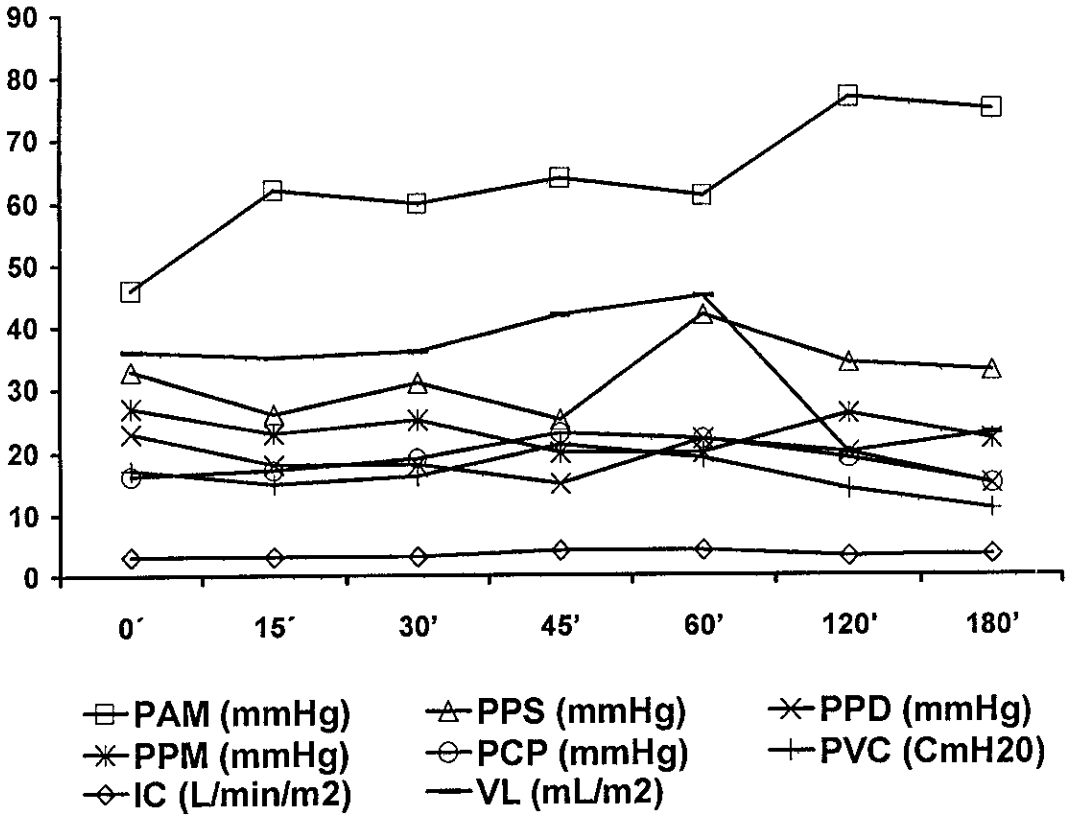


Fig 1. Cambios hemodinámicos posterior a la infusión de azul de metileno

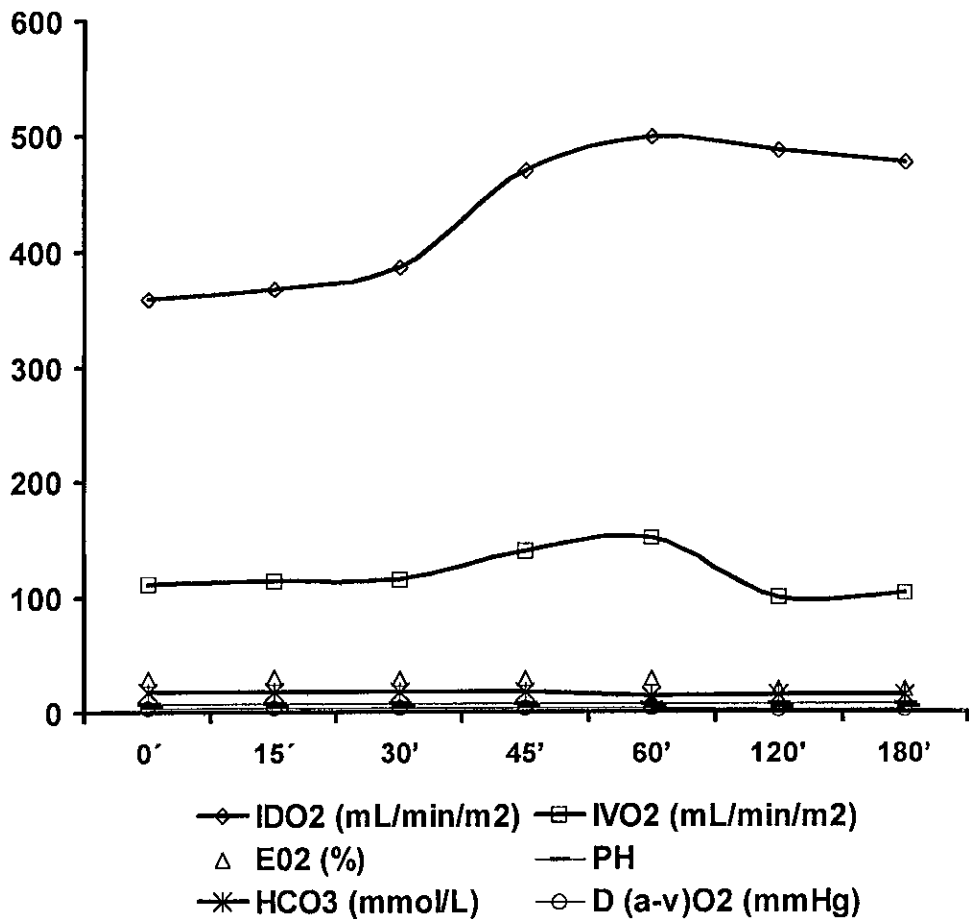


Fig 2. Relacion de aporte y consumo de oxigeno posterior a la infusion de azul de metileno

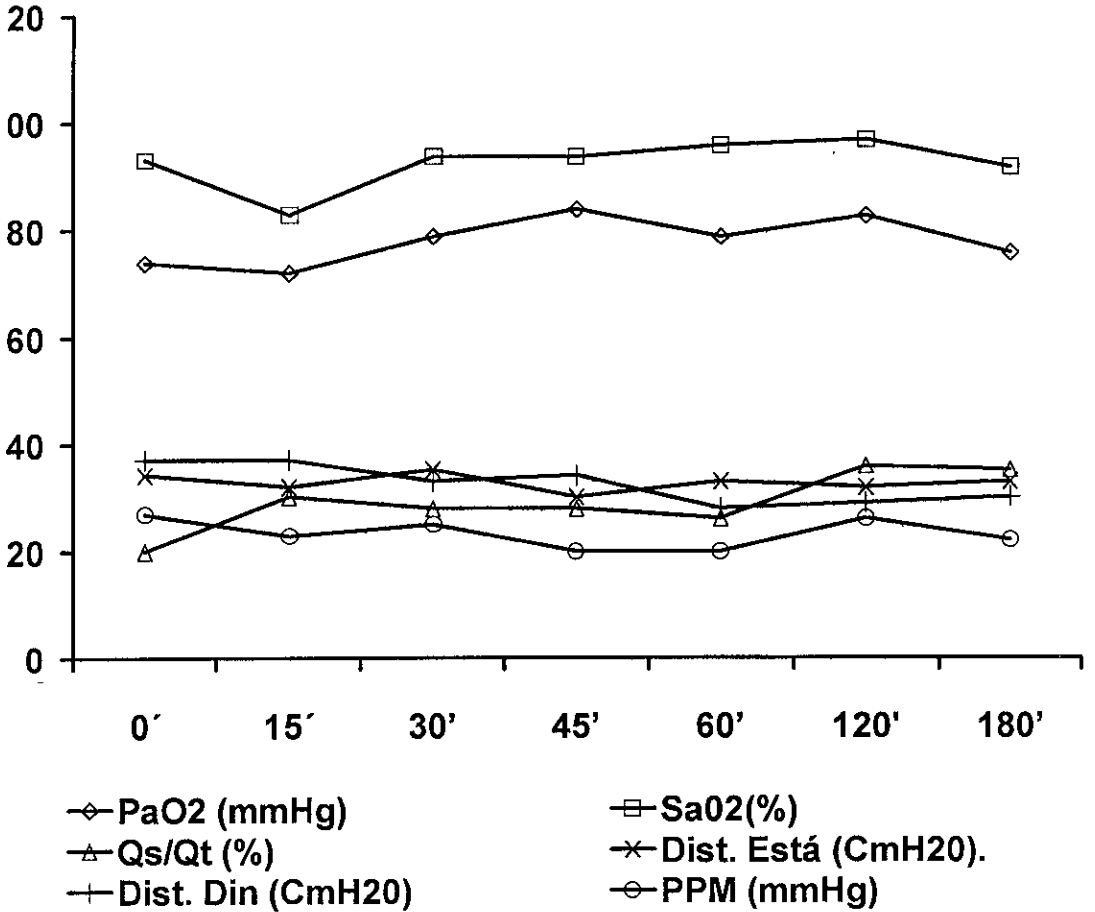


Fig 3. Cambios respiratorios posterior a la infusión de azul de metileno

DISCUSION

A pesar de los grandes avances terapéuticos, el choque séptico se sigue asociando a una alta mortandad sobre todo cuando éste llega a una fase de hiperdinamia refractaria al uso de volumen y vasopresores¹.

El óxido nítrico que es un mediador fundamental de ésta fase se sintetiza a partir de la L- arginina por la acción de las sintetasas de óxido nítrico⁸.

En condiciones normales, el óxido nítrico regula la función cardiovascular, pulmonar, neurológica, renal e inmunológica así como de plaquetas y leucocitos, sin embargo, la sobreproducción de éste por la activación de la sintetasa inducible estimulada por endotoxinas o citocinas lleva a la hipotensión y a la disfunción miocárdica que se observa en la sépsis y que es refractaria al uso de vasopresores e inotrópicos^{9,10,11}.

El óxido nítrico sintetizado a partir de las sintetasas inducibles o constitutivas, actúa a nivel celular por dos mecanismos: 1) mediante la activación de la Guanilato Ciclasa Soluble lo cual a su vez incrementa los niveles de la Guanilato Ciclasa Soluble en el citosol. 2) mediante mecanismos independientes de la Guanilato Ciclasa Soluble^{12, 13}.

El incremento en la activación de la vía de Guanilato Ciclasa Soluble, es la causante de la relajación del músculo liso arteriolar y de la depresión de la función ventricular que como se ha comentado previamente, son datos característicos del choque séptico.

Varios estudios han sugerido que los análogos de la L-arginina, pueden inhibir las formas inducible y constitutivas de las sintetasas de óxido nítrico. De esta manera en un modelo animal de sépsis inducido por lipopolisacárido, la infusión del análogo N-nitro-L-Arginina metil éster aumentaba la presión arterial y la resistencia vascular sistémica. En este

estudio no se observaron cambios en el gasto cardiaco o en el corto circuito intrapulmonar. En otro trabajo en el que se estudió músculo de ratas sépticas que fueron pretratados con el análogo N-monometil-L-arginina la respuesta arteriolar a norepinefrina mejoró de manera significativa^{14, 15, 16}.

Cardiomiocitos tomados de animales sépticos o expuestos a macrófagos activados por endotoxina, muestran depresión importante de su contractilidad, evento que es revertido mediante el pretratamiento con análogos de L- arginina. En anillos arteriales de animales sépticos la respuesta a norepinefrina es mínima a pesar del incremento en la dosis de ésta, evento que se revierte mediante el tratamiento con análogos^{17, 18}.

En otros modelos experimentales de sépsis inducida por endotoxinas, el uso de inhibidores de la sintetasa de óxido nítrico como la N monometil L arginina y la L-nitro-L-arginina-metil éster, revierten la vasodilatación y la depresión miocárdica pero no modifican la sobrevida, es más, se ha reportado que éstos inhibidores pueden potenciar el daño en el choque endotóxico por incremento en los radicales peroxi-nitrito. Además de que se ha observado de que el uso de éstos, incrementan la permeabilidad y daño endotelial; además de que el bloqueo generalizado en la producción de óxido nítrico puede alterar funciones celulares fundamentales en el choque séptico^{9, 19, 20, 21, 22}.

La discrepancia entre los resultados de los estudios en los que se han valorado los bloqueadores de sintetasa de óxido nítrico puede estar con relación al modelo experimental empleado, al tipo de bloqueo de sintetasa de óxido nítrico, a la dosis usada y al tiempo en el que se empleó la intervención (antes de la inducción de choque o posterior a éste y el tipo de disparador: lipopolisacárido, bacteria, etc...). Pero a pesar de las conclusiones anteriores en la actualidad no hay un consenso en el que se apruebe el uso de éstos bloqueadores en el paciente séptico que presenta

alteraciones hemodinámicas del tipo de la vasodilatación refractaria o la depresión contractil ventricular.

El azul de metileno o bis (dimetilamino)cloruro de fenazatonio trihidratado es un potente inhibidor de la forma soluble de la Guanilato ciclasa. El azul de metileno tiene una vida media plasmática de treinta minutos con una duración de acción de 10 a 60 minutos después de la inyección en bolo. La dosis letal 50 es de 40 mg/kg²³.

Se ha empleado desde el punto de vista terapéutico para el tratamiento de la metahemoglobinemia y la intoxicación por nitratos.

Dado que la Guanilato ciclasa es el mensajero del óxido nítrico, la inhibición de esta en el choque séptico puede atenuar los efectos hemodinámicos de éste, respetando los efectos independientes de Guanilato Ciclasa^{3, 24,25,26}.

Además del bloqueo de la Guanilato Ciclasa, se han postulado otros dos mecanismos de acción del azul de metileno en el paciente con choque séptico como son: a) La regulación en la producción de eicosanoides por las células endoteliales y b) La inhibición de la superóxido dismutasa con incremento en los niveles de anión superóxido el cual a su vez interfiere con las acciones del óxido nítrico^{27, 28,29}.

Desde el punto de vista experimental, se ha demostrado que el azul de metileno revierte la pérdida de la respuesta vascular de anillos aórticos tratados con endotoxina, además de revertir la hipotensión inducida, sin afectar los flujos sanguíneos regionales. Se ha demostrado, que el azul de metileno previene la vasodilatación inducida por lipopolisacáridos e interleucina I, revirtiendo la hipotensión y depresión miocárdica^{28, 29,30}.

En un modelo animal de choque séptico en conejos, Keaney, demostró que dosis de 5 a 10 mg/kg de azul de metileno produjeron un incremento importante en la presión arterial y descenso en los niveles de óxido nítrico²⁴.

En base a éstos estudios experimentales, Scheider en 1992, utilizó azul de metileno en enfermos con choque séptico encontrando mejoría del

estado hemodinámico, hecho que fue corroborado posteriormente por Preiser^{31, 32}.

A partir de los estudios anteriores, se han realizado diversos ensayos clínicos no controlados, con grupos pequeños de pacientes en choque séptico refractario en los cuales se empleó azul de metileno a dosis de 2 a 3 mg/kg en una sola aplicación y en los cuales únicamente se valoró la evolución hemodinámica aguda a la aplicación de éste.

La respuesta hemodinámica encontrada en los estudios ya comentados se puede resumir en lo siguiente: Incremento de la presión arterial media, Incremento de la resistencia vascular sistémica, mejoría de la eficiencia cardiaca manifestada por incremento del volumen latido miocárdico, mejoría del aporte de oxígeno, así como del incremento en las fases iniciales de la infusión de las resistencias vasculares pulmonares y del corto circuito intrapulmonar, (este último evento es secundario a pérdida de la vasoconstricción pulmonar hipoxica), así como mejoría en la respuesta vascular a las aminas presoras^{31, 32,33,34,35}.

En el estudio de Zhang, se corroboró que dosis bajas de azul de metileno (2.5 - 5 mg/kg) además de la mejoría hemodinámica sistémica, incrementaban de manera selectiva el flujo mesentérico, pero a dosis más altas (5 - 20 mg/kg) empeoraba la depresión miocárdica y la hipotensión sistémica³⁵.

Es importante mencionar que la respuesta hemodinámica a la infusión de azul de metileno en pacientes con choque séptico refractario es transitoria, además de que el uso de azul de metileno no modifica la historia natural del choque séptico.

La respuesta hemodinámica, metabólica y pulmonar que presentó nuestra paciente con la infusión de azul de metileno fue del todo semejante a lo reportado en la literatura, incluyendo lo temporal de la respuesta y el nulo impacto en la evolución natural de la enfermedad. Es importante señalar que a pesar del incremento que observamos en el aporte de

oxígeno, el consumo y la extracción no se modificaron, persistiendo la acidosis metabólica, lo que es reflejo de la disfunción celular que presentaba ésta paciente, lo que nos indica, como ya ha sido anteriormente reportado, que el azul de metileno no mejora la disfunción celular que presentan los paciente con sépsis grave³⁶.

Algo importante que debemos mencionar es que este es el primer estudio en el cual se verificó mediante ecocardiografía la reversión de la disfunción miocárdica inducida por óxido nítrico mediante el uso de azul de metileno, dado que como ya comentamos, se observó un incremento significativo en la fracción de expulsión, así como mejoría de la relajación diastólica^{37, 38}.

El óxido nítrico sintetizado, se metaliza a nitritos y nitratos y en parte es eliminado por la orina. En esta paciente es de llamar la atención que asociado al grave deterioro hemodinámico, presentaba niveles elevados de nitritos en orina, lo que nos habla de la asociación entre sobreproducción de óxido nítrico y deterioro hemodinámico. Una vez que se inició la infusión de azul de metileno, los niveles de nitritos se negativizaron, asociándose esto a la mejoría hemodinámica de la enferma. Lo anterior nos sugiere que el azul de metileno además de los mecanismo de acción ya comentados pudiese tener efecto bloqueador en la síntesis del óxido nítrico^{39, 40}.

**ESTA FOLIO NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CONCLUSIONES

- 1) La vasodilatación, hipotensión arterial sistémica y depresión miocárdica que se observa en el paciente con choque séptico refractario, son mediados por óxido nítrico, el cual se sobreproduce por activación de la sintetasa inducible.
- 2) El uso de los análogos de L-arginina como la N monometil L arginina y la L-nitro-L-arginina-metil éster aunque han mostrado en modelos experimentales que bloquean la producción de óxido nítrico y la reversión de los efectos hemodinámicos que se observan en el choque séptico refractario, no están indicados en la práctica clínica por los efectos deletéreos que inducen a nivel sistémico por el bloqueo masivo en la producción de óxido nítrico.
- 3) El azul de metileno, al ser un bloqueador selectivo de la Guanilato Ciclasa Soluble, tiene menos efectos colaterales que los bloqueadores de la sintetasa y se prefieren a estos en el manejo del paciente con choque séptico refractario.
- 4) El azul de metileno puede revertir la hipotensión refractaria y la depresión miocárdica que se observa en el choque séptico, previniendo la muerte inminente del enfermo mientras podemos actuar para tratar de revertir la causa.
- 5) La mejoría hemodinámica que se observa con el uso de azul de metileno es transitoria como ha sido demostrado en éste estudio y en otros; además de no modificar la historia natural del choque séptico grave, ni la disfunción celular existente.
- 6) Se requieren más estudios y mayor número de pacientes para validar el uso del azul de metileno en el manejo del paciente con choque séptico refractario, pero en la actualidad y en base a lo ya discutido podría ser una última alternativa terapéutica para el paciente en choque séptico que no responde a volumen, inotrópico y aminas presoras.

BIBLIOGRAFIA

1. - Groeneveld ABJ; Bronsveld W, Thijs LG: Hemodynamic determinants of mortality in human septic shock. *Surgery* 1986; 99:140-153
2. - Lowry SF: Sepsis and complications: Clinical definitions and therapeutic prospects. *Crit Care Med* 1994; 22:S1-S2.
3. - Beasley D: Interleukin 1 and endotoxin activate soluble guanylate cyclase in vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1990; 259:R38-R44.
4. - Joulou-Schaeffer G, Gray G, Fleming I: Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. *Am J Physiol* 1990; 259: H1038-H1043
5. - Brady AJB; Warren JB, Poole-Wilson PA, et al: Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol* 1993; 265:H176-H182.
6. - Meyer J, Lentz CW, Stothert JC, et al: Effects of nitric oxide synthesis inhibition in hyperdynamic endotoxemia. *Crit Care Med* 1994; 22:306-312
7. - Petros A, Lamb G, Leone A, et al: Effects of nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovasc Res* 1994; 28:34-39
8. - Lorente JA, Landín L, De Pablo R, et al: L-arginine pathway in sepsis syndrome. *Crit Care Med* 1993; 21:1287-1295
9. - Wright CE, Rees DD; Moncada S: Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Res* 1992; 26:48-57

10. - Evans T, Carpenter A, Kinderman H: Evidence of increase nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. *Circ Shock* 1993; 41:77-81
- 11.- Lorence JA, Landin L, Renes E, et al: Role of the nitric oxide in the hemodynamic changes in sepsis. *Crit Care Med* 1993; 21: 759-767
- 12.- Moncada S, Palmer RLJ, Higg EA: Nitric Oxide: Phyology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43; 109-142
- 13.- Kam PCA; Govender G: Nitric oxide: Basic science and clinical applications. *Anaesthesia* 1994; 49:515-521.
- 14.- Klabunde RE, Ritger RC: N^G-monomethyl-L-arginine (NMA) restores arterial blood pressure but reduces cardiac output in a canine model of endotoxic shock. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;178:1135-1141
- 15.- Geroulanos S, Shilling J, CakmakciM, et al: Inhibition of NO synthesis in septic shock. *Lancet* 1992; 339:434-435
- 16.- Isao Tsuneyoshi, Yuichi Kanmura, Nozumu Yoshimura: Nitric oxide as a mediator of reduced arterial responsiveness in septic patients. *Crit Care Med* 1996; 24: 1083-1086
- 17.- Balligand J-L, Ungureanu D, Kelly RA, et al: Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage conditioned medium. *J Clin Invest* 1993; 91:2314-2319

- 18.- Hollenberg SM, Cunnion RE, Zimmerman J: Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to catecholamines in septic rats. *Am J Physiol* 1993;264 (Heart Circ Physiol 33):H660-H663
- 19.- Coob JP; Natanson C, Hoffman WD, et al: N-amino-L-arginine, an inhibitor on nitric oxide synthase, raises vascular resistance but increases mortality rates in awake canines challenged with endotoxin. *J Exp Med* 1992;176:1175-1182
- 20.- Gardines SM, Compton AM, et al: Control of regional blood flow by endothelium derived nitric oxide. *Hypertension* 1990; 15:486-492.
- 21.- Hutcheson IR, Whittle BJR, et al: Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin induced acute intestinal damage in the rat. *Br J Pharmacol* 1990; 101:815-820
- 22.- Robertson FM, Offner PJ, Ciceri DP, et al: Detrimental hemodynamic effects of nitric oxide synthase inhibition in septic shock. *Arch Surg* 1994;129:149-156
- 23.- Hall HA, Kulig KW, Rumack BH: Drug and chemical- induced methaemoglobinemia: clinical features and management. *Med Toxicol* 1986 1:253-260
- 24.- Keaney JF Jr, Puyana J-C, Francis S, et al: methylene blue reverses endotoxin- induced hypotension. *Circ Research* 1994; 74: 121-125

- 25.- Martin W, Villani GM, Jothianandan D, et al: Selective blockade of endothelium- dependent and glyceryl trinitrate- induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;232:708-716
- 26.- Schneider F, Lutun Ph, Couchot A, et al: Plasma cyclic guanosine 3'-5' monophosphate concentrations and low vascular resistances in human septic shock. *Intensive Care Med* 1993; 19:99-104
- 27.- Okamura T, Yoshida K, Toda N: Suppression by methylene blue of prostaglandin I₂ synthesis in isolated dog renal arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 254:198-203
- 28.- Paya D, Gray GA, Stoclet JC: Effects of methylene blue on blood pressure and reactivity to norepinephrine in endotoxemic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;21:926-930
- 29.- Wolin SW, Cherry PD, Rodenburg JM, et al: Methylene blue inhibits vasodilation of skeletal muscle arterioles to acetylcholine and nitric oxide via the extraellular generation of superoxide anion. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;254:872-876
- 30.- Finker MS, Oddis CV, Jacob TD, et al: Negative inotropic effect of cytokines on the heart mediated via the nitric oxide. *Science* 1992; 257:387-389

- 31.- Schneider F, Lutun PH, Masselmann M, et al: Methylene blue increases systemic vascular resistances in human septic shock. *Intensive Care Med* 1992; 18: 309-311
- 32.- Preiser J-C, Lejeune P, Roman A, et al: Methylene blue in septic shock: A clinical trial. *Crit Car Med* 1995; 23: 259-264
- 33.- Catharina RGH, Daemen-Gukbbles, Paul HP, et al: Methylene blue increases myocardial function in septic shock. *Crit Care Med* 1995; 23:1363-1369
- 34.- Gachot B, Bedos JP, Veber B, et al: Short- term effects of methylene blue on hemodynamics and gas exchange in humans with septic shock. *Intensive Care Med.* 1995; 21:1027-1031
- 35.- Zhang H, Rogiers P, Preiser JC, et al: Effects of methylene blue on oxygen availability and regional blood flow during endotoxic shock. *Crit Care Med* 1995; 25: 1711-1721
- 36.- Samsel RW, Nelson DP, Sanders WM, et al: Effects of endotoxin in systemic and skeletal muscle O₂ extraction. *J Appl Physiol.* 1988;65:1377-1382
- 37.- De Belder AJ, Radomski MW, Why HJF, et al: Nitric oxide synthase activities in human myocardium. *Lancet* 1993; 341:84-85

- 38.- Paulus WJ, Vantrimpont PJ, Shah AM: Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion. *Circulation* 1994; 89:2070-2078
- 39.- Mayer B, Brunner F, Schmidt K: Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem Pharmacol* 1993; 45:367-374
- 40.- Shimizu S, Yamamoto T, Momose K: Inhibition by methylene blue of the L-arginine metabolism to L-citrulline coupled with nitric oxide synthesis in cultured endothelial cells. *Res Commun chem Pathol Pharmacol*.1993;82:35-48