

# Tratamiento temprano del choque séptico con azul de metileno

Acad. Dr. Raúl Carrillo-Esper\*

## Resumen

**Introducción:** el óxido nítrico es mediador de la vasodilatación periférica y depresión miocárdica en el choque séptico. De no revertirse, evoluciona a hipoperfusión tisular generalizada y alteración orgánica múltiple (DOM).

**Objetivo:** valorar si el azul de metileno (AM), que es un potente inhibidor de la guanilatociclasa, revierte los efectos hemodinámicos adversos en fases tempranas de choque séptico.

**Pacientes y método:** se realizó un estudio experimental de prueba clínico farmacológica sin controles en seis pacientes, en fase temprana de choque séptico y sin DOM, cuando el foco infeccioso estaba controlado. Al no haber respuesta al manejo habitual con líquidos, dobutamina y norepinefrina, se inició azul de metileno con dosis de impregnación de 2 mg/kg para posteriormente continuar infusión a dosis de 1 mg/kg/h por 12 horas. Se practicaron determinaciones: hemodinámicas (PAM, PPM, PCP, IC, IVL, IRVS, IRVP), DO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>, pH y bicarbonato arteriales, antes de la infusión y a las 1, 4, 8, 12, 24 y 48 h. Se realizó ecocardiograma basal y a las 24 horas posterior a la infusión con AM para valorar la función sistólica y diastólica. Se monitorizaron los requerimientos de inotrópico y los niveles de metahemoglobina.

**Resultados:** una vez iniciado el AM se observó mejoría significativa ( $P < 0.05$ ) en: PAM, IRVS, DO<sub>2</sub>, VO<sub>2</sub>, así como en la fracción de expulsión y en la función diastólica del ventrículo izquierdo, lo que se relacionó directamente con la mejoría en el DO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub> y reversión de la acidosis metabólica. Las dosis de dobutamina y norepinefrina se redujeron hasta suspenderlas y los niveles de metahemoglobina no rebasaron el 1%.

**Se concluyó que:** el uso de AM es una alternativa terapéutica útil en pacientes en fases tempranas de choque séptico, cuando el foco infeccioso se ha controlado, no hay evidencia de fallas orgánicas y no hay respuesta al manejo con líquidos, dobutamina y norepinefrina.

**Palabras clave:** azul de metileno, choque séptico, óxido nítrico, guanilato-ciclasa.

## Summary

**Introduction:** Nitric oxide produces vasodilatation and myocardial depression in septic shock that is associated to tisular hypoperfusion and multiorganic dysfunction.

**Objective:** To evaluate the effect of methylene blue, a potent guanylate cyclase blocker, to revert early phases of septic shock.

**Patients and method:** We carried out an experimental clinical-pharmacologic trial without controls. Six patients were included with early septic shock after the initial treatment with volume infusion, dobutamine, and norepinephrine had failed. In all patients, the infectious process has been controlled and organic failures have not been appeared. The initial dose of methylene blue was 2 mg/kg followed by continuous infusion of 1 mg/kg/h for 12 h. The patients were subjected to advanced hemodynamic monitoring and determination of MAP, MPP, PCP, CI, SVRI, PVRI, LVI, DO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>, arterial pH, and HCO<sub>3</sub> before the initial dose, and in the following 1, 4, 8, 12, 24, and 48 h, transthoracic echocardiography to evaluate systolic and diastolic function and methahemoglobin levels.

**Results:** Significant increment ( $p < 0.05$ ) was obtained in MAP and SVRI, as well as in the relationship between DO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>, reverting the shock state, and improving the tissue perfusion, made possible quick reduction in the dose of vasopressors. Echocardiographically, we observed reversion of systolic and diastolic dysfunction.

Methylene blue, a potent bloker of guanylate cyclase, is a therapeutic alternative in initial phases of septic shock when initial treatment failed infectious process was controlled, and organic failure has not get appeared.

**Key words:** Methylene blue, nitric oxide, septic shock, guanylate cyclase.

\* Jefe de Servicio de la Unidad de Terapia Intensiva. Hospital Central Sur, Petróleos Mexicanos. Profesor Titular del Curso de Postgrado Medicina del Enfermo en Estado Crítico, UNAM.

Solicitud de sobretiros:  
Acad. Dr. Raúl Carrillo Esper. Periférico Sur 4091,  
Deleg. Tlalpan, Distrito Federal, C.P. 40140.

Recibido para publicación: 07-07-00.

Recibido para aceptación: 28-03-01.

## Introducción

La incidencia de sepsis se ha incrementado en las últimas décadas. En Estados Unidos se reportan 400,00 nuevos casos por año. De los pacientes con sepsis, 40% desarrolla choque séptico y mal funcionamiento orgánico múltiple (DOM)<sup>(1,2)</sup>.

Los eventos que inician la respuesta inflamatoria sistémica y que llevan a choque séptico, son el resultado de una compleja interacción, entre los elementos del sistema inmune y macromoléculas de los organismos infectantes. Esta interacción lleva a: 1) desequilibrio entre la respuesta proinflamatoria-antiinflamatoria; 2) producción exagerada de citocinas con efectos deletéreos a nivel metabólico, inmunológico y hemodinámico; 3) daño endotelial generalizado secundario a mediadores solubles de la inflamación, activación de polimorfonucleares, isquemia reperusión y radicales libres de oxígeno; y 4) activación de la sintetasa inducible de óxido nítrico por endotoxinas y citocinas, con la subsecuente producción de óxido nítrico (ON)<sup>(3,4)</sup>.

En el choque séptico el ON juega un papel fundamental como mediador de vasodilatación periférica y depresión miocárdica. La producción continua y exagerada de éste, condiciona el estado hiperdinámico asociado a depresión contráctil e hipotensión arterial, que llega a ser refractario a la reanimación agresiva con líquidos y al uso de inotrópicos y aminas presoras. Esto a su vez se asocia a gran deuda de oxígeno sistémico que de no controlarse evoluciona a daño tisular irreversible y DOM. Por este motivo se han utilizado en modelos experimentales y clínicos, inhibidores de la sintetasa de ON o de la guanilato-ciclasa, que es el segundo mensajero del ON, observando en ambos, reversión del deterioro hemodinámico, pero con poco impacto en la supervivencia, debido al uso de éstos en fases avanzadas de choque séptico en las cuales hay DOM<sup>(5-12)</sup>.

En vista de lo anterior desarrollamos un protocolo en pacientes con sepsis y choque séptico en los que hubo una pobre respuesta al manejo con volumen, inotrópicos y aminas presoras y en los cuales utilizamos azul de metileno (AM) que es un bloqueador del guanilato-ciclasa, con la finalidad de valorar si con su uso, de manera temprana se podría revertir el deterioro hemodinámico y la evolución a choque séptico refractario y DOM.

## Pacientes y método

Se realizó un estudio experimental de prueba clinicofarmacológica sin controles, en pacientes con sepsis y choque séptico que ingresaron a la Unidad de Terapia Intensiva del Hospital Central Sur de Alta Especialidad (HCSAE) de PEMEX, en un lapso de 12 meses, de enero de 1999 a enero de 2000.

Se incluyeron en el estudio a enfermos con choque séptico, en los que el foco infeccioso inicial ya se había controlado mediante drenaje quirúrgico y/o antibióticos y en los cuales no hubo respuesta al manejo con volumen y dosis crecientes de inotrópico (dobutamina) y/o amina presora (norepinefrina), para lograr las metas terapéuticas recomendadas por el Colegio Americano de Medicina Crítica.

Se excluyeron del estudio aquellos pacientes en choque séptico en los cuales no fue posible controlar el proceso infeccio-

so y que cursaran con DOM, además de enfermos con cardiopatía previa, hepatopatía o daño renal. La exclusión de enfermos que cursaban con DOM se relacionó con el hecho de que no se ha demostrado en la literatura que el bloqueo de la guanilato-ciclasa sea útil en ellos. La exclusión de pacientes con cardiopatía previa se debió a que no se quería tener una variable de confusión a nivel cardíaco para la interpretación de los efectos del azul de metileno a este nivel. La exclusión de pacientes con hepatopatía y nefropatía se debió a que no se conoce la farmacodinamia y farmacocinética del AM en éstos.

## Protocolo de estudio

Los pacientes que ingresaron al estudio fueron sometidos al siguiente protocolo, que se realizó de acuerdo a la declaración de Helsinki, se obtuvo consentimiento informado del familiar responsable y fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del HCSAE de PEMEX:

### Monitoreo hemodinámico invasivo y no invasivo

El monitoreo hemodinámico no invasivo fue a base de ecocardiograma transtorácico para valorar la función de expulsión como marcador de función sistólica ventricular izquierda. La función diastólica se valoró mediante la relación de las curvas E/A que son indicadoras del llenado diastólico ventricular.

El monitoreo hemodinámico invasivo se llevó a cabo mediante la colocación de catéter de flotación pulmonar y línea arterial para la determinación de los siguientes parámetros: frecuencia cardíaca (FC), presión arterial media (PAM), presión pulmonar media (PPM), presión capilar pulmonar (PCP), índice cardíaco (IC), índice de volumen-latido (IVL), índice de resistencias vasculares sistémicas (IRVS) e índice de resistencia vascular pulmonar (IRVP).

### Monitoreo metabólico

Se monitorizaron índice de aporte de oxígeno (IDO<sub>2</sub>), índice de consumo de oxígeno (IVO<sub>2</sub>), porcentaje de extracción de oxígeno, diferencia arterio-venosa de oxígeno, pH y bicarbonato arteriales.

El manejo consistió en control del proceso infeccioso mediante el uso de antibióticos y/o drenaje quirúrgico, infusión de volumen con combinación de coloide y cristaloiide, con la finalidad de incrementar la PCP de 15-18 mmHg y la PAM a 70 mmHg. Cuando a pesar del incremento de la PCP persistía el estado de choque con PAM menor de 55 mmHg y se instalaba un estado hiperdinámico definido como IC por arriba de 3.5 L/m<sup>2</sup> y disminución del IRVS por debajo de 1000 dinas/seg/cm<sup>5</sup>/m<sup>2</sup> y con evidencia ecocardiográfica de alteración sistólica manifestada por una fracción de expulsión menor de 50%, se inició la administración de dobutami-

na a dosis inicial de 10 µg/kg/min y norepinefrina a dosis de 0.5 µg/kg/min. La dobutamina y la norepinefrina se incrementaron cada 30 minutos en 5 µg/kg/min y 0.3 µg/kg/min respectivamente, con la finalidad de revertir el estado de choque, mejorar la función de bomba, e incrementar el IDO2 a los tejidos periféricos por arriba de 600 mL/m<sup>2</sup>.

Cuando a pesar del incremento de los inotrópicos y del uso de volumen no se lograba la mejoría hemodinámica y el incremento en el IDO2, se inició infusión de AM siguiendo el protocolo descrito a continuación.

Dosis inicial de 2 mg/kg que se diluyeron en 100 mL de solución salina y se infundieron en una hora.

Se continuó con infusión continua de azul de metileno de 1 mg/kg/h hasta completar 12 horas.

Antes de la infusión de AM se documentaron parámetros hemodinámicos y metabólicos basales que se evaluaron de manera seriada a las 1, 4, 8, 12, 24 y 48 h. Se practicó ecocardiograma transtorácico basal y a las 24 h de la infusión de AM.

Se monitorizaron los requerimientos de inotrópicos durante y al terminar la infusión de AM. Se hicieron determinaciones de metahemoglobina al terminar la infusión.

Los resultados se expresaron con sus medias y desviación estándar y el análisis estadístico fue mediante análisis de varianza y prueba de Wilcoxon.

## Resultados

Se estudiaron seis pacientes que llenaron los criterios de inclusión y cuyo promedio de edad fue de 42.8 años, el grupo de estudio fue pequeño debido por un lado a los estrictos criterios de inclusión, y por otro, a que se dejó fuera del estudio a un gran número de enfermos que cursaba con choque séptico pero que además era portador de DOM, cardiopatía, hepatopatía o nefropatía o en los que no fue posible controlar el proceso infeccioso.

**Cuadro I.** Grupo estudiado

Paciente	Diagnóstico	Agente causal	Edad
1	Pielonefritis	<i>E. coli</i>	44
2	Leucemia + Bacteremia	<i>Estafilococo</i>	18
3	Leucemia + Bacteremia	<i>Estafilococo</i>	20
4	Sepsis abdominal	<i>Candida</i> <i>Estafilococo</i>	60
5	Sepsis abdominal	<i>Candida</i>	60
6	Neumonía	<i>Pseudomona</i>	50

La etiología del choque séptico y los gérmenes involucrados se anotan en el cuadro I. Dos pacientes del grupo estudiado requirieron de laparotomía exploradora para drenaje quirúrgico de colección intraabdominal.

### Respuesta hemodinámica

Una vez iniciada la infusión de AM se observó a partir de la primera hora y de una manera sostenida, al paso del tiempo, incremento progresivo en el IRVS y la PAM ( $p < 0.05$ ) sin que se tuviese que aumentar la dosis de la dobutamina-norepinefrina, lo que hizo posible disminuir la dosis de éstas y mantener infusión de 8 µg/kg/min y 1 µg/kg/min a las 24 h y de 5 µg/kg/min y 0.5 µg/kg/min a las 48 h ( $p < 0.05$ ), respectivamente.

La estabilidad hemodinámica se mantuvo a las 48 h de la infusión, revirtiendo el estado de choque con la subsecuente suspensión de los inotrópicos en las siguientes horas (Cuadro II).

**Cuadro II.** Respuesta hemodinámica a la infusión de azul de metileno

Parámetro	Basal	1 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	P
FC (lxmin)	120 ± 10	120 ± 5	110 ± 5	105 ± 10	110 ± 3	108 ± 5	105 ± 5	0.018
PAM(mm/Hg)	55 ± 3	65 ± 3	70 ± 3	74 ± 4	75 ± 3	78 ± 2	80 ± 3	0.018
IC (L/min/m <sup>2</sup> )	4.4 ± 0.3	4.2 ± 0.4	4.3 ± 0.3	4.1 ± 2	4.3 ± 0.2	3.9 ± 0.3	3.8 ± 0.2	0.7353
PCP(mm/Hg)	12 ± 2	13 ± 1	12 ± 3	12 ± 2	12 ± 2	11 ± 2	10 ± 2	0.018
%FE	55 ± 5						68 ± 3	0.018
IRVS(din/s/cm <sup>-5</sup> )	600 ± 115	1010 ± 80	1100 ± 50	1150 ± 50	1200 ± 20	1250 ± 30	1240 ± 10	0.018
IRVP(din/s/cm <sup>-5</sup> )	130 ± 10	140 ± 10	135 ± 5	132 ± 8	135 ± 10	135 ± 8	140 ± 5	0.018
DOB(µg/kg/min)	15	15	10	10	8	8	5	0.018
NOR(µg/kg/min)	3	3	2.5	2	1.5	1	0.5	0.018

FC: frecuencia cardíaca; PAM: presión arterial media; IC: índice cardiaco; PCP: presión capilar pulmonar; %FE: fracción de expulsión; IRVS: índice de resistencia vascular sistémica; IRVP: índice de resistencia vascular pulmonar; DOB: dobutamina (µg/kg/minuto); NOR: norepinefrina (µg/kg/minuto).

El IC, la PCP y el IRVP no presentaron modificaciones significativas. Los requerimientos de volumen se adecuaron para mantener la PCP entre 10-15 mmHg y volúmenes urinarios por arriba de 1 mL/kg/h

En relación al monitoreo ecocardiográfico, al inicio del estudio se encontró una fracción de expulsión de 55±5. Todos los pacientes cursaron con mal funcionamiento diastólico manifestado por inversión de la relación E/A. En el ecocardiograma de control se observó incremento en la fracción de expulsión a 68±3 ( $p < 0.05$ ), así como reversión de la alteración diastólica con normalización de la relación E/A.

### Respuesta metabólica

Una vez que se inició la infusión de AM y asociado a la mejoría hemodinámica, se observó incremento progresivo del índice de aporte y consumo de oxígeno, así como de la extracción ( $p < 0.05$ ). La diferencia arteriovenosa de oxígeno se amplió progresivamente con normalización del pH y bicarbonato arterial (Cuadro III).

Los enfermos evolucionaron satisfactoriamente y fue posible el retiro del inotrópico y la amina presora. No desarrollaron DOM y la estabilidad hemodinámica se mantuvo. Los niveles de metahemoglobina se mantuvieron por debajo de 1%. Se observó un tono azul/verdoso de la orina y de los pacientes en relación al efecto colorante del AM.

## Discusión

El AM (bis(dimetiamonio) cloruro de fenazatonio trihidratado), es un potente inhibidor de la forma soluble de la guanilato-ciclasa, la cual es el segundo mensajero del ON. Dado que la guanilato-ciclasa es el mensajero del ON, la inhibición de ésta por el AM, revierte los efectos hemodinámicos inducidos por éste, respetando los efectos fisiológicos y que son independientes de la guanilato-ciclasa. Otros mecanismos positivos del AM en el paciente con choque séptico son: a) La regulación en la producción de eicosanoides por las células endoteliales y b) la inhibición de la superóxido dismutasa<sup>(13-16)</sup>.

En modelos animales se ha demostrado que el AM revierte la pérdida de la respuesta vascular de anillos aórticos tratados con endotoxina, y la depresión miocárdica inducida por lipopolisacárido, interleucina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral (FNT)<sup>(17,18)</sup>.

En base a lo anterior Schneider en 1992 fue el primero en utilizar azul de metileno en enfermos con choque séptico reportando mejoría del estado hemodinámico, lo cual fue corroborado posteriormente por Preiser<sup>(5,19)</sup>.

A partir de los estudios anteriores se realizaron ensayos clínicos con grupos pequeños de enfermos en choque séptico y DOM, en los cuales se utilizaron dosis únicas de AM y en los cuales se valoró la evolución hemodinámica aguda posterior a la aplicación de éste. La respuesta hemodinámica que se encontró, se puede resumir en lo siguiente: incremento de la PAM y del IRVS, con mejoría de la eficiencia cardíaca manifestada por incremento del IVL y menor requerimiento de inotrópico. A pesar de la mejoría hemodinámica la mortalidad no fue modificada debido a la utilización tardía del AM<sup>(12,20-25)</sup>.

Con fundamento en los conocimientos previos, se decidió utilizar AM en un subgrupo muy específico de pacientes en choque séptico, esto es, aquellos que se encontraban en fase temprana y que presentaban básicamente deterioro hemodinámico manifestado como hipotensión, caída de la RVS y disfunción sistólica y diastólica de ventrículo izquierdo, y que habían sido refractarios al manejo con volumen e inotrópicos. Es importante anotar que en este grupo aún no se presentaban datos de DOM.

Fue impresionante la rápida recuperación hemodinámica una vez que se inició el manejo con AM, lo cual se manifestó por el incremento en la RVS y en la PAM, lo cual llevó a mejoría en la perfusión tisular y en la DO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>. La acidosis revirtió progresivamente lo que traduce mejoría en el metabolismo aerobio a nivel celular.

Algo que no ha sido reportado previamente son los cambios ecocardiográficos en el choque séptico una vez iniciado el AM y que se manifestaron como incremento significativo en la fracción de expulsión y en la reversión de la disfunción diastólica.

**Cuadro III.** Respuesta metabólica a la infusión de azul de metileno

Parámetro	Basal	1 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	P
IDO <sup>2</sup> (mL/min/cm <sup>2</sup> )	500 ± 20	557 ± 15	620 ± 30	750 ± 20	770 ± 30	775 ± 20	770 ± 15	0.018
IVO <sup>2</sup> (mL/min/cm <sup>2</sup> )	150 ± 15	180 ± 20	220 ± 15	250 ± 20	252 ± 15	254 ± 16	252 ± 14	0.018
%EO <sup>2</sup>	20 ± 1	22 ± 2	25 ± 1	28 ± 2	30 ± 2	30 ± 2	30 ± 1	0.018
Dif a-vO <sup>2</sup>	2.8 ± 0.4	3 ± 0.3	3.5 ± 0.2	4.2 ± 0.3	4.5 ± 0.2	4.6 ± 0.1	4.7 ± 0.2	0.9326
PH art.	7.3 ± .02	7.32 ± .01	7.35 ± .02	7.38 ± .02	7.39 ± .01	7.38 ± .01	7.39 ± .02	0.018
HCO <sup>3</sup> (mEq/L) art	14 ± 2	17 ± 2	18 ± 2	20 ± 2	21 ± 2	21 ± 1	21 ± 2	0.018

IDO<sup>2</sup>: Índice de aporte de oxígeno; IVO<sup>2</sup>: Índice de consumo de oxígeno; %EO<sup>2</sup>: porcentaje de extracción de oxígeno; Dif a-vO<sup>2</sup>: Diferencia arteriovenosa de oxígeno; pH art: pH arterial; HCO<sup>3</sup>art: Bicarbonato arterial.

Por otro lado, a las pocas horas de iniciada la infusión de AM, los requerimientos de dobutamina y norepinefrina se redujeron, lo que hizo posible su retiro después de las 48 h. Este evento está en relación a una mejor sensibilidad a los inotrópicos una vez que se bloquea el efecto del ON.

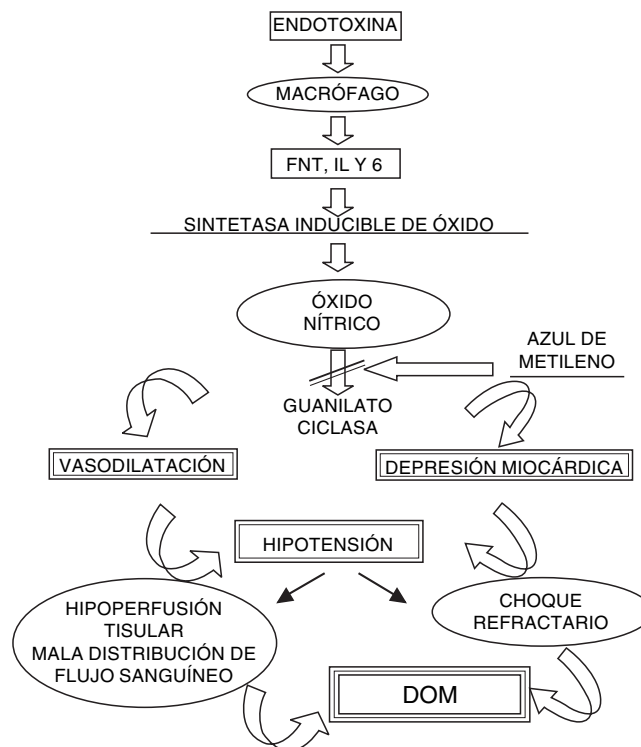
La modificación en nuestro estudio, en relación a los esquemas terapéuticos descritos por otros autores, fue que además del inicio temprano del AM, éste se utilizó en infusión continua durante un periodo de 12 h. Esto lo consideramos de mucha trascendencia, dado que como ya se ha demostrado en estudios experimentales, la síntesis de ON en pacientes con choque séptico es en pulsos continuos, por lo tanto se requiere de un bloqueo de la guanilato-ciclase por un lapso de tiempo razonable mientras se logra el equilibrio proinflamatorio-antiinflamatorio y de esta manera la inactivación de la sintetasa inducible.

Lograr una pronta estabilidad hemodinámica y un buen aporte de oxígeno a los tejidos periféricos mediante el uso de AM, junto con la erradicación temprana y oportuna del foco infeccioso, fueron claves en este grupo de pacientes para evitar la evolución a un estado de choque persistente, desequilibrio proinflamatorio-antiinflamatorio y la progresión a DOM.

A diferencia de los análogos de la L-arginina, que son inhibidores de la sintetasa de ON, el AM no tiene los efectos deletéreos de éstos, dado que no bloquea ninguna de las isoformas de sintetasa de ON y únicamente revierte los efectos mediados por guanilato-ciclase como son los hemodinámicos, lo cual hace que el AM sea una alternativa terapéutica útil en choque séptico cuando aún no se instala la DOM<sup>(26-33)</sup> (Figura 1).

## Referencias

- Groeneveld ABJ, Bronsveld W, Thijs LG. Hemodynamic determinates of mortality in human septic shock. *Surgery* 1986; 99: 140-153.
- Lowry SF. Sepsis and complications: clinical definitions and therapeutic prospects. *Crit Care Med* 1994; 22: S1-S2.
- Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffrendi AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP. Septic shock in humans: advances in the understand of pathogenesis, cardiovascular dysfunction and therapy. *Ann Int Med* 1990; 113: 227-242.
- Snell J, Parrillo JE. Cardiovascular dysfunction in septic shock. *Chest* 1991; 99: 1000-9.
- Preiser JC, Lejeune P, Roman A. Methylene blue in septic shock: A clinical trial. *Crit Care Med* 1095; 3: 259-264.
- Kumar A, Thota V, Dee L. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta are responsible for depression of *in vitro* myocardial cell contractility induced by serum from humans with septic shock. *J Exp Med* 1996; 183: 949-958.
- Kumar A, Brar R, Wang P. Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J Physiol* 1999; 276: R265-R276.
- Turner A, Tsamitros M, Bellomo R. Myocardial cell injury in septic shock. *Crit Care Med* 1999; 27: 1775-1780.
- Moncada S, Palmer RLJ, Higg EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
- Petros A, Lamb G, Leone A. Effects of nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 34-39.



**Figura 1.** Diagrama de flujo en el que se describe el deterioro hemodinámico en choque séptico mediado por ON y el bloqueo inducido por AM.

- Brady AJB, Warren JB, Poole-Wilson PA. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol* 1993; 263: H 176- H182.
- Carrillo ER, Núñez FN, Alvarado MC. Azul de metileno en choque séptico refractario. *Rev Asoc Mex Med Crit* 1999; 13: 28-35.
- Hall HA, Kuling KW, Rumack BH. Drug and chemical induced methemoglobinemia: clinical features and management. *Med Toxicol* 1986; 1: 253-260.
- Okamura T, Yoshida K, Toda N. Suppression by methylene blue of prostaglandin I<sub>2</sub> synthesis in isolated dog renal arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 40: 198-203.
- Paya D, Gray GA, Stoclet JC. Effect of methylene blue on blood pressure and reactivity to norepinephrine in endotoxemic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 21: 926-930.
- Wolin SW, Cherry PD, Rodenburg JM. Methylene blue inhibits vasodilation of skeletal muscle arterioles to acetylcholine and nitric oxide via the extracellular generation of superoxide anion. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 254: 872-876.
- Martin W, Villani GM, Jothianandan D. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 232: 708-716.
- Keaney JF, Puyana JC, Francis S. Methylene blue reverses endotoxin induced hypotension. *Circ Res* 1994; 74: 121-125.
- Schneider F, Lutun PH, Masselmann M. Methylene blue increases systemic vascular resistances in human septic shock. *Intensive Care Med* 1992; 19: 309-311.
- Finker MS, Oddis CV, Jacob TD. Negative inotropic effect of cytokines on the heart mediated via nitric oxide. *Science* 1992; 257: 387-389.

21. Catharina RGH, Deamen G, Paul HP. Methylene blue increases myocardial function in septic shock. *Crit Care Med* 1995; 23: 1363-1369.
22. Gachot B, Bedos JP, Veber B. Short term effects of methylene blue on hemodynamics and gas exchange in humans with septic shock. *Intensive Care Med* 1995; 21: 1027-1031.
23. Zhang H, Rogiers P, Preiser JC. Effects of methylene blue on oxygen availability and regional blood flow during endotoxic shock. *Crit Care Med* 1995; 30: 1711-1721.
24. Mayer B, Brunner F, Schmidt K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 367-374.
25. 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.
26. Wang Y, Marsden PA. Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995; 4: 12-22.
27. McDonald LJ, Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 211:1-6.
28. Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18: 484-91.
29. Chen CC, Lin YC, Chen SA. Shortening of cardiac action potentials in endotoxic shock in guinea pigs is caused by an increase in nitric oxide activity and activation of the adenosine triphosphate-sensitive potassium channel. *Crit Care Med* 2000 ; 28: 1713-20.
30. Zinfarelli B, Hasto G, Salzman AL. Effects of a novel guanylate cyclase inhibitor on the vascular actions of nitric oxide and peroxynitrite in immunostimulated smooth muscle cells and endotoxic shock. *Crit Care Med* 1999; 27: 1701-7.
31. Andresen M. Use of methylene blue in patients with refractory septic shock. *J Crit Care* 1999; 13:164-8.
32. Weingartner R. Blockade of the action of nitric oxide in human septic shock increases systemic vascular resistance and has detrimental effects on pulmonary function after a short infusion of methylene blue. *Braz J Med Biol Res* 1999; 21: 1505-13.
33. Avontour JA. Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in a severe septic shock: a clinical study. *Crit Care Med* 1998; 26: 660-7.