

Efeitos protetores do choque térmico na sepse e na síndrome da resposta inflamatória sistêmica

João M.L. Fonseca¹, Sergio P. Ribeiro²

Sepse, disfunção orgânica múltipla e a síndrome da angústia respiratória aguda são as maiores causas e mortalidade nas unidades de terapia intensiva. Estudos em animais de laboratório demonstram que esta forma de injúria pode ser atenuada ou mesmo abolida se um fenômeno, conhecido como resposta ao estresse ou resposta ao choque térmico, for ativado. A resposta ao choque térmico, caracterizada pela suspensão transitória da produção da maioria das proteínas e pela ativação das proteínas do choque térmico (heat shock proteins - HSP), mostrou-se protetora a células e a animais de laboratório se desencadeada antes, ou imediatamente, que uma injúria letal. Os mecanismos pelos quais a resposta ao choque térmico é protetora não são claros, mas as proteínas do choque térmico parecem exercer um papel fundamental. Este artigo resume a literatura atual dos efeitos da resposta ao choque térmico em proteger células, órgãos e animais de laboratório de formas letais de sepse experimental.

Unitermos: Proteínas do choque térmico; sepse; síndrome da resposta inflamatória sistêmica; síndrome da angústia respiratória aguda.

Protective effects of heat shock on sepsis and on the systemic inflammatory response syndrome

Sepsis shock, multiorgan dysfunction and the acute respiratory distress syndrome are major contributors to morbidity and mortality in intensive care units. Animal studies have shown that these forms of injury can be attenuated or prevented if a phenomenon, called the stress response, is activated. The stress response, characterized by a transient downregulation of most cellular products and the upregulation of heat shock proteins (HSP), has been shown to provide protection to cells and experimental animals if triggered prior to or at an otherwise lethal injury. The mechanisms by which the stress response is protective are not known with certainty, but HSP appear to play an important role. This article summarizes the current literature on the effects of the stress response in protecting cells, organ systems and laboratory animals from lethal forms of systemic and organic damage.

Key-words: Heat shock proteins; sepsis; systemic inflammatory response syndrome; acute respiratory distress syndrome.

Revista HCPA 1999;19(3):396-406

¹ Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Correspondência: Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Serviço de Medicina Intensiva – CTI, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Introdução

Sepse e suas conseqüências clínicas, tais como a Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) e a Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO), continuam sendo os maiores contribuintes das altas taxas de mortalidade e morbidade em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). O tratamento convencional da sepse, a princípio baseado em terapia antimicrobiana e de suporte ventilatório e hemodinâmico, não evoluiu nos últimos anos a ponto de diminuir taxas de mortalidade. Com o conhecimento advindo da pesquisa básica de que sepse e suas conseqüências orgânicas estão relacionadas a uma ativação descontrolada do sistema imunológico do hospedeiro em resposta a um insulto infeccioso, ou não infeccioso, no caso da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) – na última década foram produzidos vários estudos experimentais e clínicos na tentativa de obter terapêuticas mais específicas e efetivas (4,16,24,29). Em estudos animais, o uso de anticorpos específicos contra mediadores inflamatórios presentes na cascata séptica como o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), Interleucina 1- β (IL 1-b) entre outros, diminuíram taxas de mortalidade no laboratório, atuando na profilaxia da instalação da síndrome séptica (2,28,44). Infelizmente, os resultados de estudos clínicos utilizando estratégias semelhantes foram desapontadores, não demonstrando diminuição de mortalidade e, em alguns estudos, demonstrando até piora da sobrevida quando novas terapias foram utilizadas (3,17,19,45).

Uma abordagem potencial para este problema é a de fazer uso de um mecanismo natural de defesa celular presente em todos os organismos vivos, da célula vegetal à célula humana, fenômeno denominado de resposta ao estresse ou resposta ao choque térmico, nome utilizado pela descoberta das proteínas de choque térmico após um aquecimento breve e controlado de células de *Drosophila melanogaster*. Este mecanismo, quando desencadeado previamente ou mesmo no início de modelos experimentais de infecção sistêmica ou de SIRS, mostrou-se protetor, com diminuição de mortalidade e

abrandamento das lesões teciduais. Esta proteção parece estar relacionado à síntese de proteínas intracelulares chamadas de proteínas de choque térmico ou *heat shock proteins* (HSP).

Reação imunológica, sepse e resposta inflamatória sistêmica

Infecção e mesmo qualquer outro tipo de lesão orgânica grave são freqüentemente acompanhados por uma reação imunológica sistêmica, ocasionando desarranjo metabólico significativo e danos vasculares, ainda que à distância, evoluindo, nos casos mais graves, como uma síndrome devastadora de colapso hemodinâmico, choque e morte. O conhecimento desta seqüência destruidora de eventos é rudimentar. Sabe-se, através de modelos em animais, que ocorre uma ativação descontrolada do sistema imunológico. Mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios são sintetizados e mobilizados na intenção de proteger o organismo. Há evidências que mostram que um segmento externo de bactérias gram negativas (lipídio A, lipopolissacrídeo, LPS) – a endotoxina – pode desencadear esta cascata inflamatória (5,15). Quando exposto ao plasma, a endotoxina bacteriana liga-se a proteínas específicas, que por sua vez se ligam a receptores de membrana em monócitos e macrófagos, ativando-os para a liberação de mediadores inflamatórios específicos (13,40,54).

Agindo a endotoxina como um gatilho exógeno, reconhece-se hoje que mediadores imunológicos liberados mantêm esse estado inflamatório, desenvolvendo mesmo uma seqüência de eventos chamada de Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), – a ativação do mecanismo de defesa do hospedeiro de forma intensa, desencadeada pela invasão dos microorganismos e seus produtos, que perpetua um estado de desequilíbrio e gera dano direto no endotélio vascular (30). As conseqüências clínicas desta seqüência de eventos são várias, incluindo coagulação intravascular disseminada (CIVD), insuficiência renal, SDMO e Lesão Pulmonar Aguda ou SARA (5,39,43). A gravidade de manifestações decorrentes dessa reação

inflamatória sistêmica e sua perpetuação no organismo pode conduzir ao choque irreversível e morte.

O tratamento convencional da sepse e suas complicações consiste em antibioticoterapia para o insulto bacteriano, ventilação mecânica promovendo o suporte necessário na insuficiência respiratória, drogas vasoativas para tentar controlar o choque hemodinâmico. Embora essas estratégias tenham sido intensamente estudadas por muitos anos, tem sido difícil documentar diminuição nas taxas de mortalidade, permanecendo até hoje na faixa dos 50%, chegando a 70% de mortalidade quando se apresenta como choque séptico. Avançando-se no conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da síndrome, assim como na demonstração de que se trata de uma resposta inflamatória sistêmica de grandes proporções, uma nova estratégia terapêutica chamada imunoterapia ganhou destaque na área de pesquisa experimental e clínica. Apesar do grande avanço no conhecimento da etiopatogenia e fisiopatologia da sepse, a maior dificuldade encontrada está no fato de não se conhecer um mediador central na cascata inflamatória da sepse. Por algum tempo, o fator de necrose tumoral (TNF- α), assim como a endotoxina bacteriana, foram considerados como mais importantes desencadeadores da cascata inflamatória na sepse. Os estudos clínicos que utilizaram anticorpos específicos para antagonizar estes e outros mediadores foram desapontadores, não demonstrando diminuição de mortalidade (1,2,6,41,49,55, 20,45). Portanto, a necessidade de desenvolver sistemas terapêuticos efetivos baseados no conhecimento imunoinflamatório se faz presente até o momento.

Proteínas de choque térmico (HSP)

Pode-se criar situações de estresse orgânico em laboratório por diversos meios, entre os quais a resposta ao choque térmico obtido pelo aquecimento breve e controlado de animais de experimentação ou mesmo culturas de células (estresse térmico). Outra forma são injeções de substâncias tóxicas como o arsenito de sódio (meios não térmicos) em doses

suficientes para desencadear a formação das HSP, mas não tão altas a ponto de serem letais ao organismo. A resposta de choque térmico desencadeada por esses insultos previamente a uma lesão orgânica potencialmente letal se mostrou protetora em um número de modelos experimentais. Há evidência experimental significativa demonstrando que a indução da resposta ao choque térmico, seja tanto por aquecimento ou por meios não térmicos, protege ratos contra os efeitos letais de sepse experimental (11,48), contra a lesão pulmonar induzida pela instilação intratraqueal de fosfolipase A₂ (PLA₂) (47), ou da exposição prolongada a altas frações de oxigênio (53), modelos experimentais conhecidos por causar lesões orgânicas significativas e letais.

Esse mecanismo de proteção pode ser relacionado diretamente a uma família de proteínas produzidas durante a resposta ao estresse – as HSP. Essas proteínas estão vinculadas ao desenvolvimento de termotolerância, isto é, o pré-tratamento com uma exposição subletal ao calor induz a síntese das HSP. Animais pré-aquecidos submetidos a um aquecimento posterior, mas potencialmente letal, apresentam taxas de sobrevivência maiores quando comparados a controles que não foram aquecidos previamente (e sem indução de HSP).

Atribui-se as HSP um papel biológico maior em se tratando de proteção a insultos. Diversos estudos sugerem que HSP atuam protegendo as células dos efeitos tóxicos (8,26,27,50). A indução das HSP é extremamente rápida, intensa e prioritária em relação à produção de todas as outras proteínas - um padrão de resposta emergencial (27).

A maioria dos estudos correlacionam o fenômeno da tolerância com a indução de HSP, particularmente com proteínas da família de 70 kilodaltons de peso molecular (70kDa) (25). O colapso dos filamentos intermediários ao redor do núcleo (12) e a redistribuição de membros da família HSP70 do núcleo para o nucléolo (51) tem sido associados com citoproteção. O papel protetor das HSP parece estar relacionado à associação física entre as HSP e proteínas em processo de formação (36). Por causa desta função específica, as HSP são chamadas guias

moleculares.

Estudos *in vivo* da indução de HSP

Há evidência experimental demonstrando que a resposta ao choque térmico, se aplicada previamente a um estímulo de outro modo letal, é protetora *in vivo*. Em muitos estudos, a resposta de choque térmico foi produzida por exposição de animais a breves períodos de hipertermia não letal. Em nossos estudos, ratos foram anestesiados e colocados em uma incubadora infantil pré-aquecida (41°C) até suas temperaturas retais atingirem 42,5°C, com tempo aproximado de aquecimento de 45 minutos. Esse protocolo foi bem tolerado pelos animais, não produzindo mortalidade, mas estímulo suficiente para induzir as HSP em vários órgãos num padrão homogêneo (47,53). Demonstramos que a proteína de choque térmico de 72 kilodaltons de peso molecular (HSP72kDa) – a HSP mais induzível e usada na maioria dos estudos como marcador molecular da indução da resposta ao estresse – está presente nos pulmões 2 horas após a exposição ao calor, permanecendo em altos níveis nos tecidos por cerca de 72 horas (47,53).

Usando protocolos de aquecimento similar ao que utilizamos, Ryan et al (38) injetaram endotoxina bacteriana - como modelo experimental da SIRS e sepse - para determinar se o aquecimento prévio seria protetor. A administração de doses letais de endotoxina bacteriana (20mg/kg de *E. coli*) em ratos que haviam sido expostos ao estresse térmico 24 horas antes da injeção de endotoxina resultou em uma taxa de mortalidade de zero, em comparação com um grupo de animais

expostos somente à endotoxina, que tiveram 72% de taxa de mortalidade. Em um estudo similar, camundongos foram protegidos da alta mortalidade observada após a injeção de endotoxina bacteriana (*E. coli*, 20mg/kg, intra-peritoneal), quando previamente tratados com hipertermia (21). Em conjunto, esses estudos sugerem que, submetendo animais ao choque térmico 18-24 horas antes de um modelo letal de sepse ou SIRS, ocorre um efeito benéfico, com diminuição significativa da mortalidade.

Assim como diminuição nas taxas de mortalidade relacionadas a modelos experimentais de sepse e SIRS, a resposta ao estresse também promove proteção específica a certos órgãos. Winston et al (53) expuseram ratos a breves períodos de aquecimento e, 18 horas após, a 100% de oxigênio por 60 horas, em um modelo experimental de lesão pulmonar aguda por hiperóxia. Os ratos que foram expostos ao estresse térmico mostraram menor evidência de lesão pulmonar induzida por hiperóxia do que animais não expostos previamente ao choque térmico. Da mesma forma, Villar et al (47) pré-aqueceram ratos e instilaram fosfolipase A₂ (PLA₂), um modelo experimental de lesão pulmonar aguda, nas traquéias destes animais 18-24 horas após o choque térmico. Sob condições controladas, 27% dos animais não aquecidos morreram em 48 horas após a instilação de PLA₂, comparados com a mortalidade zero no grupo de animais que receberam pré-tratamento com calor. Importante, também, é que a lesão pulmonar induzida por PLA₂ em animais pré-aquecidos foi significativamente menor, sugerindo a proteção de sistemas orgânicos individualmente.

Usando um modelo experimental de sepse

Tabela 1. Taxas de mortalidade 18 horas após ligadura cecal com perfuração (CLP - Sepse) e 7 dias após a remoção do ceco, em ambos grupos de ratos sépticos. Modificado de (48)

Após Sepse	Controle	Aquecidos	P
18 h	25	0	< 0.005
7 dias	69	21	< 0.01
n	16	14	

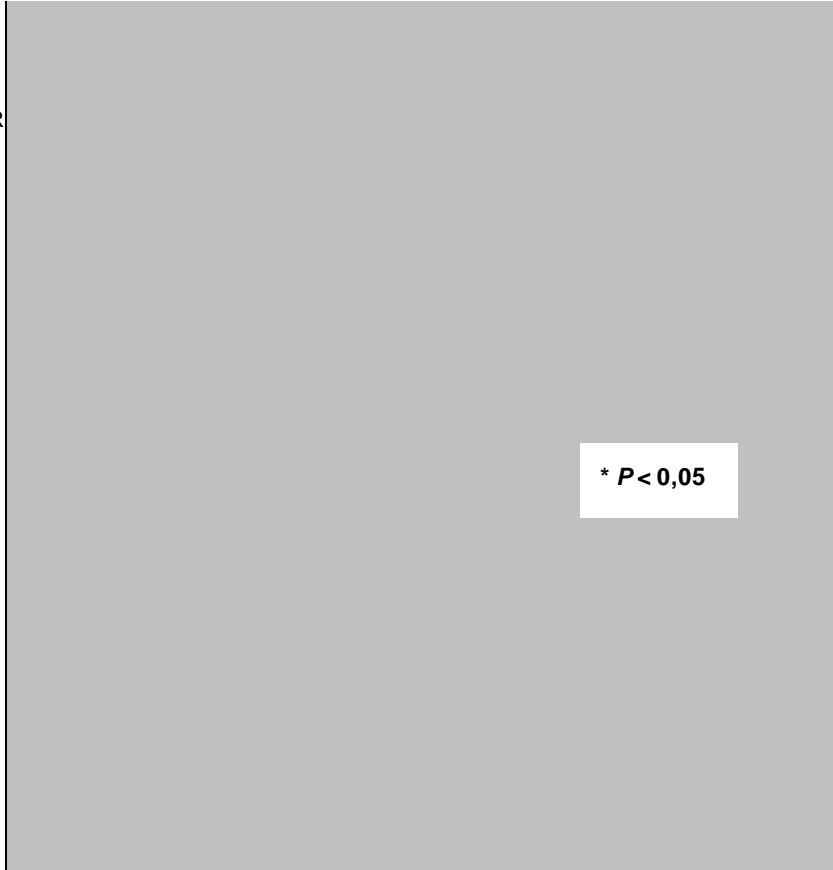


Figura 1. Seguimento da mortalidade de ratos após sepse experimental (ligadura cecal com perfuração - CLP). Os animais foram randomizados em dois grupos de 31 animais e receberam injeção intravenosa de solução salina (quadrados) ou injeção de arsenito de sódio (círculos), 18 horas antes da sepse. Notar que 6 horas após a ligadura cecal com perfuração, todos os animais tinham recuperado da anestesia e da cirurgia. Dezoito horas após CLP, 42% dos animais injetados com soro fisiológico e 6,5% dos animais injetados com arsenito de sódio tinham morrido ($P=0,002$). Nas 24 horas, as taxas de mortalidade foram de 45% e 16%, respectivamente ($P=0,026$). Modificado de (35)

cl clinicamente mais relevante, a ligadura do ceco e subsequente perfuração (9,52), Villar et al (48) demonstraram que ratos pré-aquecidos também são protegidos contra sepse experimental. Nesse estudo, 18 horas após ligadura cecal e perfuração, 25% dos ratos não aquecidos tinham ido ao óbito, comparado com nenhuma morte no grupo de animais sépticos mas pré-aquecidos. Sete dias após a intervenção a proteção foi ainda evidente, com 69% de mortalidade comparada com 20%, respectivamente (tabela 1). Os pulmões dos animais sépticos apresentavam evidências de infiltrado inflamatório agudo, formação precoce de membrana hialina e atelectasias. Em contraste, pulmões de animais aquecidos e sépticos mostraram uma arquitetura relativamente normal e menor evidência de edema pulmonar.

Após determinar que um período breve e não-letal de aquecimento (estresse por calor) foi suficiente para fazer ratos tolerantes a sepse (48), examinamos a hipótese de que esses efeitos pudessem ser obtidos por meios não térmicos. Desde que aquecimento poderia estar associado com mecanismos não específicos, não relacionados a resposta ao estresse, usamos arsenito de sódio, um derivado do arsênico usado em pesticidas. A injeção de arsenito de sódio mostrou-se efetiva na indução das proteínas de choque térmico (HSP72kDa) em pulmões, com um padrão dose e tempo dependente, semelhante aquele encontrado por Brown e Rush (7) em rins, coração e fígado. Para determinar se a indução de HSP72kDa utilizando métodos não térmicos seria também protetora, utilizamos arsenito de sódio num modelo experimental de injeção de

endotoxina bacteriana em ratos (35). Nesse estudo, foi aplicado 6 mg/kg de arsenito de sódio em ratos – um tratamento que não induz resposta febril, mas induz HSP72kDa nos pulmões – e, 18 horas depois, foram expostos à endotoxina bacteriana. Quarenta e cinco por cento dos animais controle – injetados com placebo e submetidos à sepse – morreram nas primeiras 24 horas. Entretanto, apenas 6% dos animais injetados com arsenito de sódio e posteriormente tornados sépticos foram ao óbito no mesmo período (figura 1). Esses estudos, portanto, abrem a possibilidade de eventualmente serem úteis como estratégias terapêuticas no contexto clínico, embora o arsenito de sódio seja substancialmente tóxico e o aquecimento, por si, possa ser muito comprometedor para o sistema nervoso central.

Estudos *in vivo* da resposta ao choque

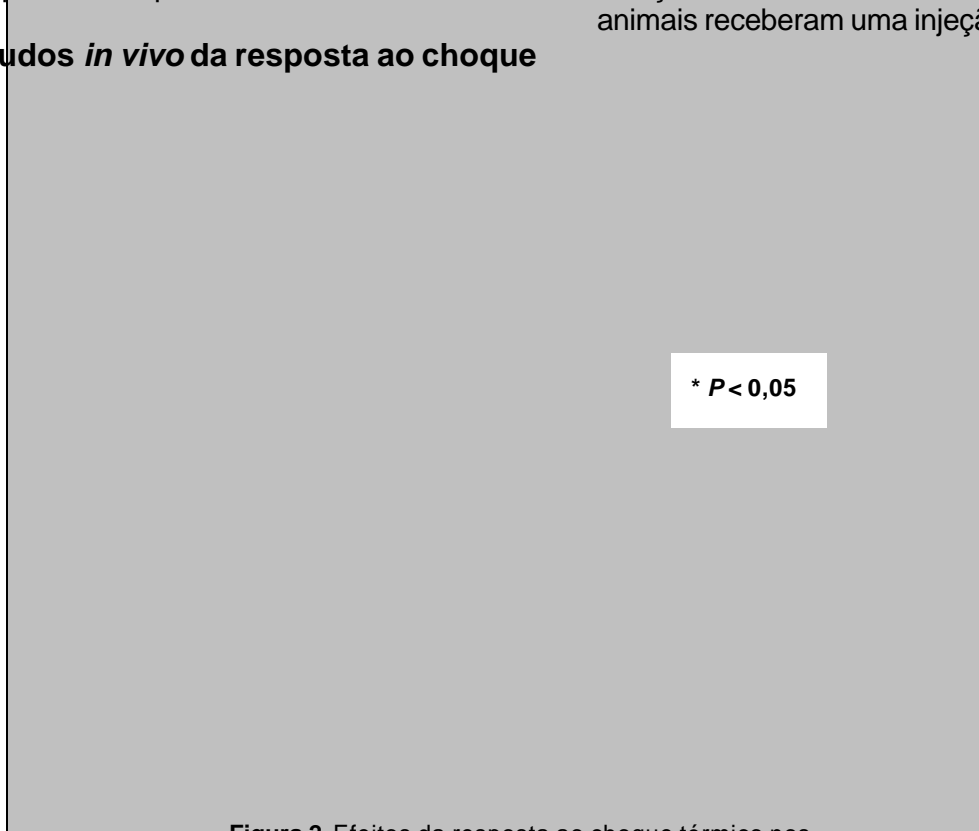


Figura 2. Efeitos da resposta ao choque térmico nos níveis plasmáticos do Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) de ratos. Os animais tratados apenas com endotoxina bacteriana (LPS) tinham concentrações de TNF significativamente maiores comparadas com animais que haviam sido expostos ao choque térmico (Aquecimento - A) ou ao arsenito de sódio (AS) 18 horas antes da endotoxina bacteriana (* $P < 0,0001$). A área calculada sob as curvas demonstraram uma diminuição de 56% no grupo aquecido e de 59% no grupo arsenito de sódio, comparados ao grupo injetado com endotoxina apenas ($P < 0,005$). Modificado de (36).

térmico e mediadores inflamatórios

Dada a importância do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) como mediador central na sepse e na SARA, formulamos a hipótese de que o mecanismo pelo qual a resposta ao choque térmico exerceria proteção estivesse relacionado com a redução de níveis de TNF- α plasmáticos, fazendo os animais mais resistentes à sepse (36). Para examinar essa hipótese, randomizamos ratos em 3 grupos: controles, que inicialmente receberam uma injeção salina (C); animais submetidos a choque térmico (A); e ratos injetados com arsenito de sódio (AS). Subseqüente ao tratamento inicial, os animais voltaram para suas gaiolas por 18 horas para recuperação e indução de HSP. No final deste período, os animais receberam uma injeção de endotoxina

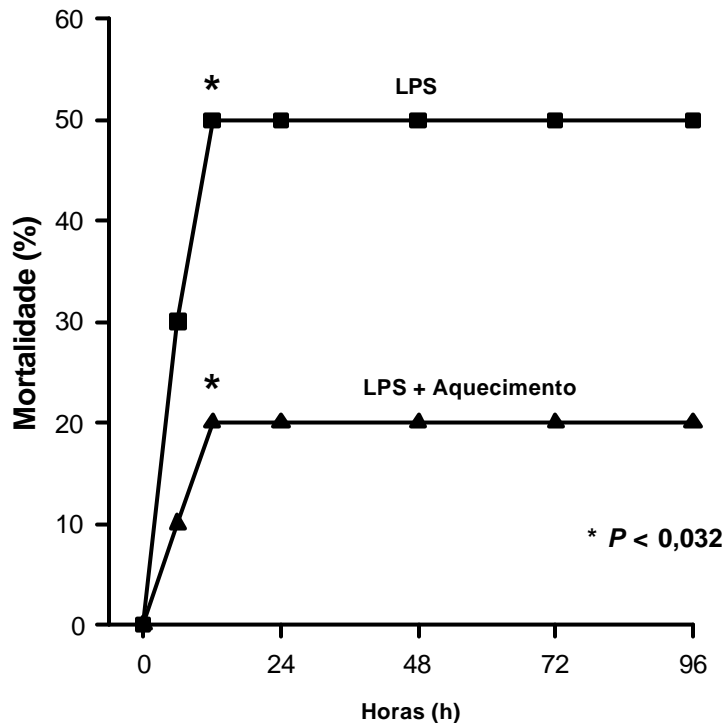


Figura 3. Ratos receberam injeções intravenosas de endotoxina bacteriana (LPS, *E. coli*, 15mg/kg) e foram randomizados para receber nenhum tratamento (controle) ou foram expostos ao choque térmico (aquecimento) até a temperatura retal de 41°C. As taxas de mortalidade foram de 52% e 20% respectivamente (* $P=0,039$).

bacteriana (20mg/kg, EV, *Salmonella typhosa*). Achemos concentrações significativamente maiores de TNF- α plasmático em 1 e 2 horas após a injeção de LPS no grupo controle quando comparado a ratos que haviam sido expostos à resposta ao choque térmico (A e AS) 18 horas antes da injeção de endotoxina, sugerindo que, de alguma forma, a resposta ao choque térmico estava modulando a resposta inflamatória à endotoxina (figura 2). Portanto, nos estudos anteriores, pudemos demonstrar que a indução da resposta ao choque térmico, previamente a um insulto letal, diminui mortalidade em modelos experimentais de sepse e SIRS, assim como diminui a produção da resposta inflamatória sistêmica associada a estes modelos.

A possibilidade de que o choque térmico poderia também ser protetor se induzido após o início do processo infeccioso sistêmico também foi alvo de nossas atenções (10), principalmente por sua similaridade com a realidade clínica. Para minimizar o efeito

somatório da injeção de endotoxina e da hipertermia, diminuimos ambos os estímulos, por redução da dose de endotoxina assim como o período de exposição ao calor. Nesse estudo prospectivo e randomizado, ratos foram anestesiados e injetados com uma LD₅₀ (dose letal para mortalidade de 50%) de endotoxina de *E. coli* (15mg/kg – em nossos estudos prévios nós administramos 20mg/kg de endotoxina). Imediatamente após se tornarem sépticos com a injeção endovenosa de endotoxina, os animais foram randomizados para não receber nenhum tratamento (controle) ou serem submetidos à febre induzida a 41°C (em nossos protocolos anteriores os ratos atingiam 42,5°C). A injeção de endotoxina bacteriana no grupo controle não produziu febre enquanto que animais expostos ao choque térmico (febre induzida) – após a injeção de endotoxina – aumentaram a temperatura corporal e a presença de HSP72kDa nos pulmões (confirmando o desencadear da resposta ao choque térmico). Doze horas após

o início da sepse experimental, as taxas de mortalidade no grupo controle injetado apenas com endotoxina foi de 52%. Em contraste, animais que foram injetados com endotoxina e posteriormente submetidos ao estresse térmico (febre induzida) demonstraram uma taxa de mortalidade de apenas 20% ($P=0.039$) (figura 3). O aumento na sobrevivência de animais sépticos que foram expostos a febre artificialmente induzida (estresse por calor) foi associado com uma redução significativa nos níveis plasmáticos de TNF- α e IL-1 β (figura 4). Os resultados deste estudo sugerem que a resposta ao choque térmico, mesmo induzida

após o início da sepse experimental, tem o potencial de modular a resposta inflamatória e diminuir a mortalidade associada à sepse.

Implicações clínicas e conclusões

Os estudos acima citados demonstram que a inibição ou atenuação da resposta inflamatória sistêmica através da febre induzida (choque térmico) produz efeitos benéficos em modelos experimentais de sepse e SIRS. De forma diferenciada da imunoterapia, cujos anticorpos atuam no bloqueio da expressão de um único mediador por vez, o uso da hipertermia

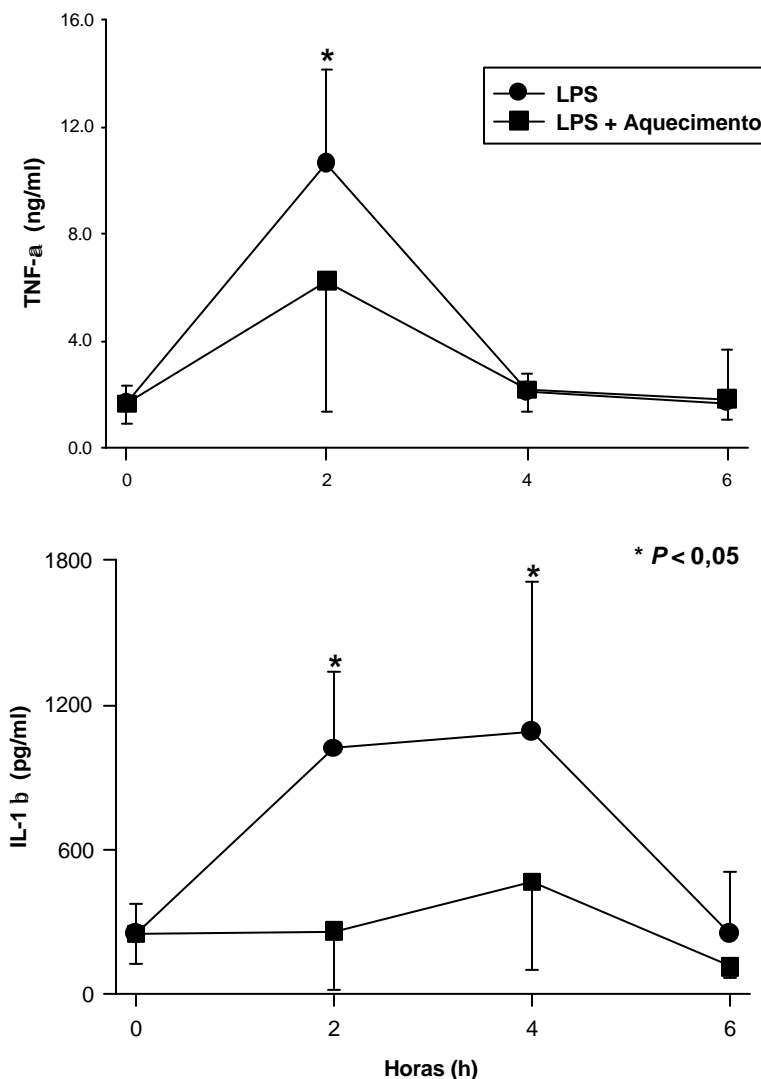


Figura 4. Níveis plasmáticos de TNF α e IL-1 β às 0, 2, 4 e 6 horas após injeção de endotoxina bacteriana (LPS) em animais controle e aqueles que foram aquecidos após a injeção de endotoxina (* $P<0,0001$).

deve atuar em diversas rotas de citocinas simultaneamente. Na maioria destes estudos, o choque térmico foi iniciado antes do desencadeamento da resposta inflamatória letal. Neste contexto, o uso da resposta ao choque térmico em situações não-emergenciais que sabidamente produzem reação inflamatória sistêmica e lesão de órgãos-alvo poderia ser de grande valia, como por exemplo em estudos com choque térmico em doadores de órgãos para transplante que demonstrou uma melhora na função do órgão pós-transplante renal (32). Da mesma forma, enxertos de pele têm melhor resultado se forem primeiramente submetido ao estresse térmico e posteriormente utilizados (23). Pizzarro e colaboradores (33) demonstraram que há uma expressão exagerada de TNF em transplantes cardíacos de ratos durante a rejeição halogênica. Esses achados sugerem a possibilidade de uso deste mecanismo de defesa natural do organismo (a resposta ao choque térmico) na prevenção de rejeição de órgãos transplantados, associadas algumas vezes, a lesões inflamatórias do tipo isquemia/reperfusão (31).

A inibição das proteínas de choque térmico (HSP) pode também ter utilidade clínica. Por exemplo, células tumorais que expressam HSP72kDa são mais resistentes a agentes quimioterápicos (18). Portanto, a inibição desta proteína em células malignas poderia aumentar a eficácia de muitos agentes quimioterápicos, permitindo o uso de menores doses destes agentes e minimizando seus efeitos tóxicos. Da mesma forma, a possibilidade do uso de HSP como marcadores de atividade de doenças como artrite reumatóide, sepse, lesão pulmonar aguda ou qualquer insulto tecidual potencialmente letal (convulsões, isquemia, hipóxia, febre), deve ser explorado experimentalmente (46,14,22,34).

A situação clínica mais comum, entretanto, é aquela em que os pacientes são identificados após a doença ter-se iniciado. Apenas um de nossos estudos (10) testou a possibilidade da febre induzida ser benéfica também após o insulto inflamatório ter sido iniciado, demonstrando resultados promissores. Para que a indução de resposta ao choque térmico seja utilizada clinicamente,

será necessário um melhor entendimento deste fenômeno e ainda vários estudos controlados em organismos nos quais a resposta inflamatória e infecciosa já tenha sido iniciada, simulando a situação clínica mais comum. De qualquer forma, estes estudos no mínimo questionam nossa tendência de tratar a febre assim que ela se apresenta.

Referências

1. Ashkenazi A, Marsters SA, Capon DJ, et al. Protection against endotoxic shock by tumor necrosis factor receptor immunoadhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10535-9.
2. Beutler B, Milsark IW, Cerami A. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1985;229:869-71.
3. Bone RC. A critical evaluation of new agents for treatment of sepsis. *JAMA* 1991a;266:1686-91.
4. Bone RC. Gram-negative sepsis. Background, clinical features, and interventions. *Chest* 1991b;100:802-8.
5. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991c;115:457-69.
6. Bone RC, Fisher CJ, Clemment TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. A controlled clinical trial of high dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 1987;317:653-8.
7. Brown IR, Rush SJ. Induction of a 'stress' proteins in intact mammalian organs after the intravenous administration of sodium arsenite. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120:150-5.
8. Burdon RH. Heat shock and the heat shock proteins. *Biochem J* 1986;240:313-24.
9. Chaudry IH, Wichterka KA, Baue AE. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. *Surgery* 1979;85:205-11.
10. Chu E, Ribeiro SP, Slutsky AS. Heat stress protects septic rats. *Crit Care Med* 1997;25:1727-32.
11. Chung CH. Proteases in *Escherichia coli*. *Science* 1993;262:372-4.
12. Collier NC, Schlesinger MJ. The dynamic state of heat shock proteins in chicken embryo fibroblasts. *J Cell Biol* 1986;103:1495-1507.
13. Dentener MA, Bazil V, von-Asmuth EJU, Ceska M, Buurman WA. Involvement of CD14 in

- lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α , IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 1993;150:2885-91.
14. Dilmann WH, Metha HB, Barrieux A, Guth BD, Neeley WE, Ross Jr J. Ischemia of the dog heart induces the appearance of cardiac mRNA coding for a protein with migration characteristics similar to heat-shock/stress proteins. *Circ Res* 1986;59:110-4.
 15. Fong Y, Lowry SF. Modulation of the cytokine response in sepsis. In: Vincent JL, editor. *Update in intensive care and emergency medicine*. Berlin: Springer-Verlag; 1991. p. 223-31.
 16. Fowler AA, Hamman RF, Zerbe GO, Benson KN, Hyers TM. Adult respiratory distress syndrome: prognosis after onset. *Am Ver Respir Dis* 1985;132:472-8.
 17. Greenman RL, Schein RMH, Martin MA, et al. A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis. *JAMA* 1991;266:1097-1102.
 18. Hahn GM, Li GC. Thermotolerance, thermoresistance, and thermosensitization. In: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C, editors. *Stress proteins in biology and medicine*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1990. p. 79-100.
 19. Haupt MT, Jastremski MS, Clemmer TP, Metz CA, Goris GB. Effect of ibuprofen in patients with severe sepsis: a randomized, double-blind, multicenter study. *Crit Care Med* 1991;19:1339-47.
 20. Herdegen JJ, Bone RC. Inflammatory mediators and the role of immunomodulation in sepsis. In: Bone RC, editor. *Pulmonary and critical care medicine*. Toronto: Mosby; 1995. p. 1-20.
 21. Hotchkiss R, Nunnally I, Lindquist S, Taulien J, Perdrizet G, Karl I. Hyperthermia protects mice against the lethal effects of endotoxin. *Am J Physiol* 1993;265:R1447-R57.
 22. Howard G, Geoghegan TE. Induction of stress proteins mRNA in mouse cardiac tissue by hypoxic hypoxia. *Fed Proc* 1985;44:664.
 23. Koenig WJ, Lohner RA, Perdrizet GA, Lohner ME, Schweitzer RT, Lewis Jr VL. Improving acute skin-flap survival through stress conditioning using heat shock and recovery. *Plast Reconstr Surg* 1992;90:659-64.
 24. Kollef MH, Schuster DP. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1995;332:27-37.
 25. Li GC, Laszlo A. Amino acid analogs while inducing heat shock proteins sensitize CHO cells to thermal damage. *J Cell Physiol* 1985;122:91-7.
 26. Lindquist S. The heat-shock response. *Ann Rev Biochem* 1986;55:1151-91.
 27. Lindquist S. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988;22:631-77.
 28. Mathinson JC, Wolfson E, Ulevitch RJ. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacteria lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J Clin Invest* 1988;81:1925-37.
 29. Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, Hudson LD. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:485-9.
 30. Morrison DC, Ulevitch RJ. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. *Am J Pathol* 1978;93:527-617.
 31. Nowak Jr TS. Synthesis of a stress protein following transient ischemia in the gerbil. *J Neurochem* 1990;45:1635-41.
 32. Perdrizet GA, Hefferon TG, Buckingham FC. Stress condition: a novel approach to organ preservation. *Curr Surg* 1989;42:23-5.
 33. Pizarro TT, Malinowska K, Kovacs EJ, Clancy Jr. J, Robinson JA, Piccinini LA. Induction of TNF α and TNF β gene expression in a rat cardiac transplants during allograft rejection. *Transplant* 1993;56:399-404.
 34. Polla BS, Kantengwa S. Heat shock proteins and inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;167:93-105.
 35. Ribeiro SP, Villar J, Downey GP, Edelson JD, Slutsky AS. Sodium arsenite induces heat shock protein-72 kilodalton expression in the lungs and protects rats against sepsis. *Crit Care Med* 1994;22:922-9.
 36. Ribeiro SP, Villar J, Downey GP, Edelson JD, Slutsky AS. Effects of the stress response in septic rats and LPS-stimulated alveolar macrophages: evidence for TNF- α posttranslational regulation. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1843-50.
 37. Roine R, Luurila OJ, Soukas A, et al. Alcohol and sauna bathing: effects on cardiac rhythm, blood pressure, and serum electrolyte and cortisol concentrations. *J Inter Med* 1992;231:333-8.
 38. Ryan AJ, Flanagan SW, Moseley PL, Gisolfi CV. Acute heat stress protects rats against endotoxin

- shock. *J Appl Physiol* 1992;73:1517-22.
39. Said SI, Foda HD. Pharmacologic modulation of lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:1553-64.
 40. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990;249:1429-31.
 41. Silva AT, Bayston KF, Cohen J. Prophylactic and therapeutic effects of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha in experimental gram-negative shock. *J Infect Dis* 1990;162:421-27.
 42. Tobias PS, Mathinson J, Mintz D, et al. Participation of lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-dependent macrophage activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:239-45.
 43. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986;234:470-4.
 44. Tracey KJ, Fong Y, Hesse HG. Anti-cachectin/TNF antibodies prevent the fatal sequelae of experimental bacteremia in primates. *Nature* 1987;330:662-4.
 45. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 1997;99:944-52.
 46. Vass K, Berger ML, Nowak TSJ, Welch WJ, Lassmann H. Induction of stress protein Hsp 70 in nerve cells after status epilepticus in the rat. *Neurosci Lett* 1989;100:259-64.
 47. Villar J, Edelson J, Post M, Mullen JBM, Slutsky AS. Induction of heat stress proteins is associated with decreased mortality in an animal model of acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:177-81.
 48. Villar J, Ribeiro SP, Mullen JBM, Post M, Slutsky AS. Induction of heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model. *Crit Care Med* 1994;22:914-21.
 49. Walsh CJ, Carey PD, Cook DJ, Bechara DE, Fowler AA, Sugerman HJ. Anti-CD18 antibody attenuates neutropenia and alveolar capillary-membrane injury during gram-negative sepsis. *Surgery* 1991;110:205-12.
 50. Welch WJ. The mammalian heat shock (or stress) response; a cellular defense mechanism. *Adv Exp Med Biol* 1987;225:287-304.
 51. Welch WJ, Mizzen LA. Characterization of the thermotolerant cell II. Effects on the intracellular distribution of heat-shock protein 70, intermediate filaments, and small nuclear ribonucleoprotein complexes. *J Cell Biol* 1988;106:1117-30.
 52. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980;29:189-201.
 53. Winston BW, Villar J, Edelson JD, Piovesan J, Mullen JBM, Slutsky AS. Induction of heat stress proteins (hsp) is associated with decreased mortality in an animal model of hyperoxic lung injury. *American Review of Respiratory Disease (GENERIC)* 1991;143:A728.
 54. Ziegler-Heitbrock HWL, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 1993;14:121-5.
 55. Ziegler EJ, McCutchan JA, Fierer J, et al. Treatment of gram-negative bacteremia and shock with human antiserum to mutant *Escherichia coli*. *N Engl J Med* 1987;307:1225-30.