An. R Acad. Nac. Farm. 2004, 70: 357-380.

Artículo Original

Acción de la procalcitonina sobre la temperatura corporal*

MARÍA LUISA OJEDA MURILLO

Área de Farmacología, Laboratorio Experimental, Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Valme Sevilla.

RESUMEN

La procalcitonina (PCT) una proteína de 116 aminoácidos precursora de la hormona calcitonina, es un nuevo marcador diagnóstico de infección bacteriana e inflamación sistémica que presenta alta sensibilidad y especificidad, sin que se alteren los valores de calcitonina. En infecciones bacterianas severas se encuentran valores altos de PCT en plasma, sin embargo en personas sanas los niveles de PCT son indetectables. Al contrario que la interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral (TNF) u otros pirógenos endógenos (marcadores de la respuesta inflamatoria), los niveles sanguíneos de PCT no se incrementan frente a infección viral, traumas, enfermedades autoinmunes o reacciones alérgicas. Por ello la PCT se usa para el diagnóstico diferencial entre infección bacteriana y viral. A pesar de desconocerse el papel biológico de este péptido, se ha demostrado que sus concentraciones plasmáticas se correlacionan con el inicio, curso y severidad de la inflamación. Así se ha demostrado que la PCT se libera tras la inyección de endotoxina bacteriana, este incremento está relacionado con los niveles séricos de IL-1, IL-6 y TNF. Estas características indican que la PCT puede ser algo mas que un simple marcador y que puede estar implicada en la respuesta febril. La región termorreguladora de las ratas se localiza en el área preóptica del hipotálamo anterior (AH/POA). En este trabajo se estudió el papel de la PCT en la termorregulación y en la fiebre inducida por endotoxina bacteriana a nivel central. En ratas Wistar se hizo un estudio dosis-respuesta de PCT frente a la temperatura corporal microinyectando diferentes dosis de PCT : 2, 4, 10, 100, 1000 y 5000 ng en el ventrículo lateral (icv) y registrando los cambios de temperatura corporal. También se inyectó una dosis de PCT: 100ng icv media hora antes de la endotoxina (lipopolisacárido (LPS)

* Premio Cinfa 2002 de la Real Academia Nacional de Farmacia

50μg/kg ip). Así mismo se realizó un estudio inmunohistoquímico de la presencia y localización de PCT en el AH/POA. Los resultados demostraron que la administración de PCT icv provoca una ligera disminución de la temperatura corporal pero no de un modo dosis-respuesta. El pretratamiento con PCT disminuye levemente la respuesta febril inducida por LPS. Se demostró la presencia del péptido PCT en la Pars Tuberal del hipotálamo.

Este trabajo se ha realizado gracias a la Fundación Valme y la Junta de Andalucía.

Palabras claves: Procalcitonin.— Fiebre.— Temperatura corporal.— Endotoxina.— Pirógeno endógeno.— Lipopolisacárido y sistema nervioso central.

ABSTRACT

Procalcitonin action on body temperature.

Procalcitonin (PCT), a 116 amino acid protein with identical sequence to the precursor protein of calcitonin hormone, is a new high sensitive and specific diagnostic parameter of bacterial infection and systemic inflammation in the absence of its precursor protein. High plasma concentrations of PCT are induced during severe bacterial infection but not in controls. Unlike interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF) or other endogenous pyrogens (parameters of the inflammatory response), PCT is generally not induced by viral infection, operation trauma, autoimmune or allergic disorders. Hence, PCT can be used for differential diagnosis of bacterial and non bacterial inflammation. Although the biological role of this peptide is still largely unknown, it has been shown that PCT plasma concentrations correlate closely with the onset, course and severity of the inflammatory reaction. Moreover, it has been demonstrated that PCT is released following endotoxin injection and that the increase of plasma PCT levels, are positively correlated with IL-1, IL-6 and TNF. These characteristics of PCT might well give it not only a role as a marker in clinical infections but also a potential role in fever of bacterial origin. The thermosensitive region of the rat is the anterior hypothalamic pre-optic area (AH/POA). Therefore, the rationale for this study was to study the role of PCT in the thermoregulation and in the febrile response induced by a bacterial endotoxin on the CNS. In Wistar rats we carried out a dose-response study with PCT and body temperature microinjecting different doses of PCT: 2, 4, 10, 100, 1000 and 5000 ng in the rat lateral ventricle (icv) and we measured their body temperature. We also microinjected one dose of PCT 100ng icv half an hour before endotoxin (lipopolysaccharide (LPS) 50μg/kg). We also designed an immunohistochemical study in the AH/POA to find the peptide PCT and its localization. The results demonstrated that the administration of PCT icv produced a low diminution in the body temperature but not in a dose-response manner. The pre-treatment with PCT lightly reduce the fever induced by endotoxin. We have found the peptide PCT in the endothelial cells of the hypothalamic Pars Tuberal.

This research was in part supported by Fundacion Valme and Junta de Andalucia.

Key words: Procalcitonin.— Fever.— Body temperature.— Endotoxin.— Pyrogenous endogens— Lipopolysaccharide.— CNS.

INTRODUCCIÓN

El control y mantenimiento de la temperatura corporal se realiza mediante una serie de mecanismos relacionados entre sí y controlados por el SNC, que consiguen mantenerla estable por medio de un equilibrio de ganancia y pérdidas de calor. El centro termorregulador del organismo reside en el área preóptica del hipotálamo anterior (PO/HA) (14,10) que actúa como un "termostato" que armoniza la producción y eliminación de calor mediante un sistema de retroalimentación (feed-back) negativa, manteniendo una temperatura central próxima a los 37º C. Varias son las sutancias neuroquímicas implicadas en la termorregulación: dopamina, noradrenalina, serotonina, el ácido gamma-aminobutírico, péptidos, segundos mensajeros y las concentraciones iónicas del sodio/calcio. La fiebre, se define como la elevación de la temperatura corporal por encima de los límites normales con conservación de los mecanismos reguladores. Este incremento genera simultáneamente un aumento en la producción de calor y una disminución de las pérdidas caloríficas. A diferencia de la hipertermia es una de las principales manifestaciones de la enfermedad. Las causas que pueden determinarla son múltiples: bacterias, sus endotoxinas, virus, hongos, protozoos, reacciones inmunológicas, tumores y fármacos entre otros, de todos, el mejor estudiado es un lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gram negativas, la endotoxina; de cuyos tres componentes se ha identificado el lípido A como responsable del efecto pirogénico. Este grupo de sustancias son los llamados pirógenos exógenos. Actualmente se supone que en la génesis de la fiebre participan una serie de acontecimientos interdependientes, posiblemente sujetos a mecanismos de retrocontrol negativo (4), en el que se incluyen los siguientes pasos: 1)Entrada de pirógenos exógenos al organismo. 2)Activación de los monocitos, neutrófilos, linfocitos y otras células por estímulos infecciosos, tóxicos, inflamatorios y/o inmunológicos. 3)Formación y liberación a la circulación de sustancias pirogénicas como interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF), interferón (IFN), interleucina-6 (IL-6), etc. Son

los llamados pirógenos endógenos (PE). 4)Interacción de estas sustancias con lugares específicos localizados alrededor de los ventrículos cerebrales (zonas periventriculares). 5)Estímulo de la síntesis y liberación de prostaglandinas (PGs), fundamentalmente PGE2, en la pared anterior del tercer ventrículo (3V) y en el PO/HA. 6)Activación de las neuronas termorreguladoras hipotalámicas que desencadenan en última instancia un incremento de la temperatura corporal. Sin embargo, y a pesar de todo ello, aún no se han establecido de forma precisa los últimos pasos que desencadenan la fiebre. Se sabe que el transporte humoral no es el único que siguen las citocinas para llegar al cerebro, pues las aferencias vagales participan en dicho transporte (16). Actualmente se piensa que las citocinas encontradas en hipotálamo no derivan de la sangre, sino que se sintetizan en el cerebro y son reflejo de lo que acontece con estas en la periferia, ante situaciones adversas, tales como las infecciones (13). Aunque la fiebre no constituye el único signo presente en los procesos infecciosos, es probablemente el signo mas manifiesto y mejor conocido de la infección. Origina un considerable costo metabólico para el individuo, asociado a un incremento de las demandas de oxígeno y posteriormente conlleva a un riesgo potencial de producir daños neurológicos. Además como reacción del hospedador frente a la infección aumenta la respuesta inflamatoria y la función del sistema inmunológico, reduciendo al mismo tiempo la replicación de los microorganismos. Por eso no es de extrañar que los pocos marcadores de la inflamación que existen hagan referencia al nivel de ciertas citocinas, que actúan como pirógenos endógenos, como la IL-6 y el TNF, y otros marcadores inflamatorios como la procalcitonina (PCT), la proteína C reactiva (PCR), la neopterina, la elastasa y la fosfolipasa A2 CPLA2). Cada uno de estos parámetros tienen un perfil de inducción específico y características propias frente a las distintas enfermedades. De entre todos ellos destaca la PCT por incrementar sus valores rápida, selectiva y proporcionalmente frente a bacteriemias Gram- negativas, producidas por endotoxinas (LPS, pirógeno exógeno por ontonomasia), por ello, posiblemente juegue un papel biológico más relevante que un simple marcador, actuando así en los procesos de inflamación y fiebre; hasta ahora ligeramente intuido, pero desconocido.

La PCT es la prohormona inmediata de la calcitonina. La PCT es una prohormona glico-peptídica de 116 aminoácidos. Está codificada por el gen Calc-1 y tiene un peso molecular de 12793Da. (17) En individuos sanos la PCT es producida y segregada por las Células-C del tiroides,donde por un proceso proteolítico se transforma en la hormona calcitonina. Por tanto los niveles de PCT en plasma de individuos sanos son del orden de picogramos. En 1993 se demostró que los valores de PCT en sangre aumentaban en pacientes afectados por bacteriemias gram negativas, no así los de CT. (9,17) Actualmente se sabe que existen valores de PCT altos en pacientes que sufren distintos tipos de procesos inflamatorios, llegando incluso en casos de infección severa a alcanzar niveles en plasma de hasta 1000 ng/ml. El principal estímulo para la síntesis de PCT en sangre es por tanto la administración sistémica de LPS.(5) En pacientes tiroidectomizados con bacteriemia gram negativa también se han encontrado niveles altos de PCT, lo que obviamente nos lleva a buscar nuevos sitios de síntesis de PCT. Varias han sido las nuevas zonas adjudicadas a dicho fin: hígado, pulmón, intestino, monocitos..... Pero inesperadamente Müller y cols (12) han demostrado, mediante la técnica de hibridación in-situ usando hamsters, que el ARNm PCT está, ubicua y uniformemente expresado en múltiples tejidos del cuerpo humano en respuesta a un proceso de **sepsis**; el cuerpo entero aparece como una glándula endocrina productora de PCT.

Ya hemos comentado que en personas **sanas** la PCT es la prohormona de la calcitonina, dicha hormona se encarga de reducir los niveles de calcio en sangre e inhibe la reabsorción ósea, también se ha estudiado su acción como anestésico. Aunque se sabe que la PCT también se une a los receptores de calcitonina, no se ha probado su acción como hipocalcemiante.(5) Un estudio del grupo de Becker (15) sugiere, que la PCT puede agravar el transcurso de la **sepsis**, basándose en el hecho de que la inyección de anticuerpos Anti-PCT en hamsters les proporcionó prevención frente a la infección por *E.coli*. Así como, que los animales en estado de sepsis provocado por LPS, sobrevivían durante mas tiempo si no estaban tratados con sobredosis de PCT, que cuando sí lo estaban. Durante la sepsis aparece una fuerte hipocalcemia como respuesta a varios mecanismos, pero a día de hoy parece estar totalmente desconectado con la

acción de la PCT, así como también se sabe que los niveles de calcitonina no se encuentran elevados (3,5). Otros estudios defienden que en el lugar oportuno, y en las concentraciones adecuadas, la PCT debe contribuir a la defensa del organismo, de hecho, Monneret y cols (11) describen por primera vez un efecto antiinflamatorio en humanos. El estudio se basa en la inhibición parcial (27%) de TNF-α en sangre humana, debido a la acción de la PCT, que sin embargo no inhibe ni a IL-1, ni a IL-6, ni a IL-8. Frente a esto surge otra teoría que defiende la unión de la PCT a los receptores de calcitonina de linfocitos T y B, provocando un aumento de la proteína-G y de los niveles intracelulares de AMPc que estimulan a la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC), que es una encima clave en la activación del proceso inflamatorio.(17)

La PCT es una molécula muy estable tanto "in vitro" como "in vivo", ya que presenta una vida media de 24-30, mucho mayor que la mayoría de las citocinas. En personas sanas los valores plasmáticos de PCT son menores de 0.5ng/ml.(9,17) En personas voluntarias inyectadas con *E.coli* (4ng/kg) se detectan valores de PCT a las 2h de la inyección. Los valores sufren un incremento rápido y elevado de 4-8 h y a las 12 horas alcanza unos valores constantes que se mantienen durante cerca de 24 h. Cuando se repiten dichas inyecciones a las 24 y 48 h los valores de la PCT se elevan ligeramente y se mantienen hasta las 72 h, por ello, los valores de PCT nos dan una idea del estado de la infección (si los valores de PCT aumentan o persisten durante mucho tiempo, nos augura un mal pronóstico). Sin embargo los valores máximos de TNF-α e IL-6 tras la administración iv de LPS (4mg/kg) se alcanzan a las 2 y 3h, desapareciendo completamente de sangre a las 6 y 8h, respectivamente (2). Lo que nos invita a pensar que el TNF-α y la IL-6 pueden ser inductores de la PCT (Fig 1). De hecho, se ha demostrado que al inyectar TNF-α o IL-6 iv se produce un incremento en los valores de PCT, directa o indirectamente (1). Esto indicaría que la PCT esta implicada en el complejo proceso de la inflamación, y que no sería uno de los factores iniciadores de la cascada. La rápida inducción de los valores de PCT tras la inyección in vivo de endotoxina, y la detección "in vitro" de ARNm de PCT, mediante PCR en cultivos celulares, que aumenta notablemente y por orden decreciente, tras la administración de LPS, TNF-α, IL-6, IL-1β e IL-

2 (no ocurre así con la IL-10), sugiere, que la estimulación de PCT está muy relacionada con la inducción de los procesos inflamatorios (concretamente con la fase aguda) (1).

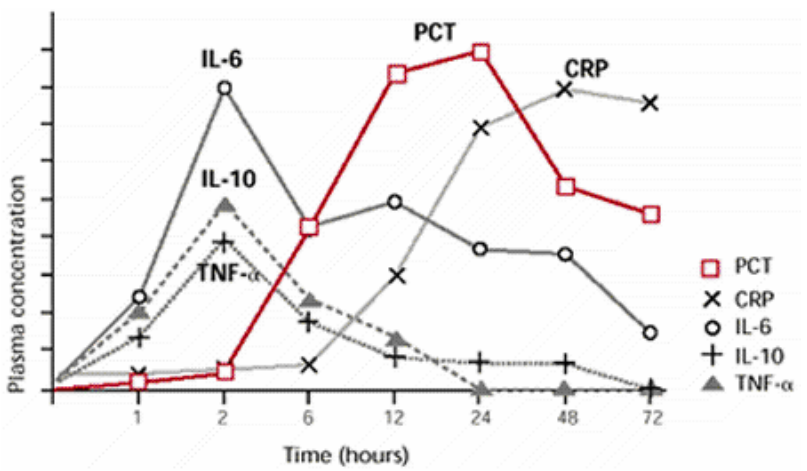


FIGURA 1. *Vida media, valores máximos y tiempo de latencia de distintas citocinas y PCT, en infecciones agudas.*

Así como existen numerosos estudios de los valores sanguíneos de PCT en personas sanas y en pacientes que sufren un proceso inflamatorio, poca bibliografía podemos encontrar sobre los valores de PCT en líquido cefalorraquídeo (LCR) de personas sanas o enfermas. De los trabajos existentes la mayoría se refieren a pacientes con meningitis o con traumatismos craneoencefálicos y se limitan a medir niveles plasmáticos. Referente a pacientes con meningitis, se ha visto que los valores de PCT plasmática tienen una gran importancia diagnóstica para diferenciar si el origen de la infección es viral o bacteriano. En cuanto a los valores de PCT en LCR, parece ser que un valor > 0.5ng/ml tiene carácter diagnóstico para decir que nos encontramos frente a una meningitis bacteriana. Referente a los pacientes con traumatismo craneoencefálico, los valores de PCT en

LCR de individuos accidentados se triplicaron (PCT=0.41ng/ml) frente a los controles (PCT= 0.15ng/ml) (6,7). La vida media de PCT en LCR se desconoce así como cuando alcanza su concentración máxima, su meseta y cuando desaparece del LCR. La correlación entre los valores de PCT en LCR y los de IL-6, parecen ser paralelos, lo que implicaría a la PCT en la respuesta de fase aguda. Comparándolo con los estudios clínicos, ambos marcadores están relacionados con la gravedad de la enfermedad. Presumiblemente están implicados en la respuesta inflamatoria a nivel central. De hecho se especula que la PCT puede ser uno de los miembros de la familia de los neuropéptidos vasoactivos, que actúan como respuesta adaptativa frente a una hipoperfusión local. (6,7)

Como vimos anteriormente, el mecanismo de génesis de la fiebre actualmente aceptado, se basa en la síntesis y liberación de PGE2 a nivel central, concretamente en la pared anterior del 3V y en el PO/HA. Si la PCT actúa como eslabón de la cadena de citocinas debe estar implicada en los mecanismos de control de la fiebre (como estimulador o como inhibidor). De cualquier modo la PCT ha demostrado tener alto valor diagnóstico para diferenciar el origen de ciertas fiebres de origen desconocido (FUO), fundamentalmente, para diferenciar si son de origen infeccioso bacteriano o de supresión inmunológica, lo cual es altamente útil porque nos da una idea del tratamiento a seguir con dichos pacientes. De hecho otros marcadores inflamatorios como la PCR y la IL-6 no tiene valor diagnóstico en este tipo de pacientes. La presencia de niveles elevados de PCT se han correlacionado con la presencia de episodios febriles en pacientes neutropénicos, sobre todo aquellos episodios debidos a infecciones por gérmenes gram negativos. Dado que la eficacia de este parámetro como marcador de episodios febriles en pacientes neutropénicos ha demostrado ser claramente superior a la de otros parámetros como la PCR, la IL-6, la IL-8 o el TNF-α, la PCT se coloca como el marcador mas eficaz y de valor diagnóstico más alto en pacientes con fiebre neutropénica. Así como un gran indicador del régimen terapéutico utilizado en dichos pacientes. Por su papel como marcador febril y los estudios citados anteriormente, podríamos pensar que la PCT está implicada en los mecanismo de la producción de fiebre, de hecho, cuando pretratamos a animales con PCT periféricamente (2, 3 y 4 μg/kg i.p.)

vemos que se produce un efecto dosis-respuesta de inhibición de la fiebre inducida por *E.coli*. (8). Estos resultados otorgan un valor potencial a la PCT como mediador antipirético en el control de la fiebre de origen bacteriano gram negativo. Sabemos que en última instancia, el control de la temperatura corporal, y por ende de la fiebre, se localiza en el SNC, concretamente en el PO/HA. Por tanto si la PCT verdaderamente tiene alguna acción antipirética, es conveniente estudiar su acción frente a la temperatura corporal a nivel central, así como su acción frente a la fiebre inducida por lipopolisacáridos. Por tanto, los **objetivos** de este trabajo son: 1) Estudiar el efecto de la PCT administrada en el Ventrículo Lateral (icv) sobre la temperatura corporal. 2) Analizar el efecto de la PCT administrada icv en la fiebre inducida por endotoxina bacterina (lipopolisacárido, LPS). 3) Estudiar la presencia y localización de la PCT en el SNC, especialmente en el PO/HA, tanto en condiciones normales como tras estímulos pirogénicos (LPS).

METODOLOGÍA

Animales: ratas Wistar machos (200-250g) mantenidas en jaulas individuales a temperatura 26±1ºC (zona termoneutral para ratas), con ciclos naturales de luz y oscuridad (07:00-19:00). Agua y comida "ad libitum". Los experimentos se iniciaron entre las 8:00 y 10:00 a.m.

Cánulas Guías: las cánulas guías de implantación crónica para microinyecciones, se fabricaron con tubos de acero inoxidable de diámetro externo 23 ga. El extremo de localización intracerebral fue biselado y redondeado, con el fin de minimizar al máximo la lesión tisular durante su implantación.

Registro de la temperatura corporal (Tc): mediante técnicas de registro biotelemétricas (Mini-Mitter, Sunriver USA). Durante la cirugía para la implantación de cánulas guía, se procedió a la implantación intraperitoneal (i.p.) de transmisores de frecuencia VH-FH calibrados previamente. Las señales emitidas por estos transmisores (Hz) fueron recogidas a través de un procesador periférico (Dataquest IV, system, Mini-Mitter) situado bajo la jaula de cada animal, y conectado a su vez a un ordenador personal. Tanto la temperatura como la actividad de cada

animal fueron registradas y guardadas a intervalos de 5 min, para su posterior análisis.

Procedimiento quirúrgico: los animales se implantaron crónicamente en el ventrículo lateral (icv) con cánulas guías, siguiendo procedimientos asépticos de uso rutinario en nuestro laboratorio. Para ello se anestesiaron (i.p.) con una mezcla de ketamina (100mg/kg) y xilazina (5mg/Kg) y se colocaron en una mesa estereotáxica, con el cráneo perfectamente fijado en los planos verticales y horizontales. A continuación, se realizó con un bisturí una incisión sobre la piel, desde la comisura anterior de los ojos hasta el inicio de la musculatura del cuello. Tras despegar y separar lateralmente el periostio, se expuso la calota, y se localizó bregma como punto de referencia para la obtención de las coordenadas estereotáxicas correspondientes al segundo ventrículo. Según el atlas estereotáxico (The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. G. Paxinos y Ch. Watson. Second edition, Acedemic Press Australia. 1996), las coordenadas utilizadas con fijación del maxilar superior 3 mm por debajo del plano horizontal cero, fueron: Antero-posterior: -0.3 a – 0.9 mm desde Bregma, Lateral: 1.4 mm desde la línea media y Vertical: 3.2 a 4 mm desde la calota. Una vez fijadas las coordenadas, y mediante una fresa de corona esférica, se procedió a la craneotomía perforando la calota hasta dejar expuesta la duramadre. A continuación se procedió a la apertura de puntos, para el emplazamiento de sendos tornillos, necesarios para la sujeción y permanencia de la cánula guía. La cánula guía se fijó al cráneo mediante el empleo de cemento dental acrílico, englobando tanto a los tornillos de fijación como a la cánula guía. Una vez endurecido éste, se introdujo a la cánula guía un estilete estéril y biselado (26 ga) de la misma longitud que ésta, con el fin de mantenerla permeable y evitar contaminación. Finalizado el proceso quirúrgico, los animales se colocaron en jaulas individuales, hasta su completa recuperación postquirúrgica (6 días al menos).

Técnica de microinyección: todas las inyecciones se realizaron en animales despiertos y habituados a los procedimientos experimentales. Para ello se utilizó una cánula inyectora de acero inoxidable (26 ga) con 1mm de longitud superior a la cánula guía, para evitar la retrodifusión del fármaco, acoplada mediante un tubo de polietileno (PE 50) lleno de la

sustancia a inyectar que fue impulsada por una jeringa de Hamilton de 50 µl. La microinyección se realizó, inyectando un volumen de 5 µl en cada animal; la perfusión duró 5 min. Antes de proceder a la inyección de las sustancias se realizó una esterilización de los materiales, se extrajo el estilete de la cánula guía y se introdujo la cánula inyectora, infundiéndose así la sustancia elegida. Tras la perfusión se dejó la cánula inyectora 1 min en el lugar de la inyección para evitar el reflujo del líquido inyectado, a continuación se extrajo y se introdujo un nuevo estilete estéril.

Fármacos: Se ha empleado Calcitonin N-Terminal Flanking Peptide (BACHEM AG) reconstituida en buffer fosfato salino (PBS) con 0.1% de albúmina sérica bovina pasado a través de un filtro 0.22 micras, llevándola a una concentración stock de 1mg/ml, a partir de la cual se prepararon con LCR distintas alícuotas, almacenadas a –20ºC durante un máximo de tres meses, evitando múltiples procesos de congelación y descongelación. Así pues, las distintas dosis: 2, 4, 10, 100, 1000 y 5000 ng/5µl se prepararon con LCR estéril en el momento de su uso. Se han empleado lipopolisacáridos *Escherichia coli* (lote 110K4060, serotipo 0111:B4, Sigma), disueltos en suero salino y administrados a una dosis de 50µg/Kg/ml i.p. En el caso de la inmunohistoquímica, se usaron dosis de 50, 100 y 500 µg/Kg/ml i.p.

Análisis histológico: Tras concluir los experimentos, y de forma rutinaria, todos los cerebros fueron analizados histológicamente, procediéndose a la localización anatómica de los lugares de microinyección. Para ello, cada rata fue anestesiada i.p. con una mezcla de ketamina y xilazina. A continuación se procedió a la perfusión intracardiaca con suero salino isotónico hasta la total eliminación de la sangre, seguido sin interrupción, para la fijación del cerebro, de 500ml paraformaldehido al 4%. Finalizado este paso, se extrajo de forma cuidadosa el cerebro y se sumergió en tampón fosfato /sacarosa al 30% a 4ºC, donde permaneció de 12 a 48h, en ese momento ya está listo para ser almacenado a –80ºC para su posterior uso. Los cortes seriados en secciones coronales de 20 µm se realizaron con un microtomo de congelación a una temperatura de –16ºC. Una vez secos los cortes a temperatura ambiente procedimos a su fijación, montaje y tinción, mediante varias etapas consecutivas: inmersión de los portas en una

solución etanol 95% (2 s), lavado en agua destilada (5 s), tinción con acetato de violeta de cresilo a 40ºC (15 s), inmersión en tres soluciones sucesivas de etanol 95% (5 s), deshidratación con etanol 100% en dos sesiones (5 s), citrosol (10-60 min), secado a temperatura ambiente, montaje de portas con cubres en medio de montaje permanente, localización de los sitios de inyección con la ayuda de un microscopio óptico y de un atlas estereotáxico de cerebro de rata Wistar (Paxinos y Watson. 1996). Los lugares de microinyección se caracterizan por la producción de un discreto daño tisular en la zona. De cualquier forma fueron descartados del presente estudio aquellos casos en los cuales la localización de las cánulas guía o lugares de microinyección se ubicaban fuera de las coordenadas establecidas.

Análisis estadístico: Los datos de todos los experimentos fueron analizados mediante el programa Sigma Plot. Todos los resultados se representan como media ± error estándar de la media. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Newman-Keuls . Un valor de P menor de 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

Inmunohistoquímica: en este estudio se usaron dos técnicas inmunohistoquímicas para detectar el *daño cerebral* inducido por la introducción crónica de cánulas guías en las ratas implantadas (asegurándonos que las variaciones de Tc se deben solo a la administración icv de PCT) y para *localizar la PCT* en el cerebro de los animales no implantados cronicamente con cánulas guías viendo si la PCT tiene acción “per sé” en el cerebro de los animales tratados.

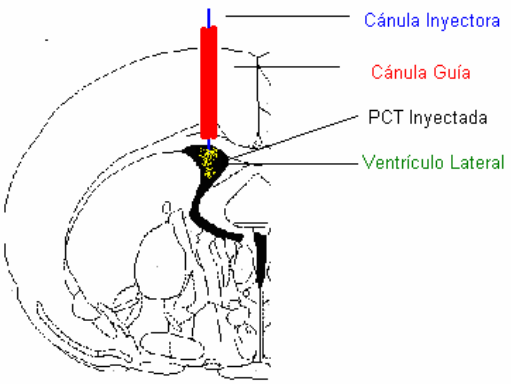


FIGURA 2. *Esquema: Localización de la cánula guía e inyectora de un implante icv*

Localización del *daño cerebral* inducido el implante de cánulas guías: Para ver el daño cerebral sufrido, se utilizó un estudio IHC de marcaje de astrocitos. Los niveles de astrocitos y su localización nos proporcionan una idea del daño tisular cerebral. Para ello se utilizó un anticuerpo primario (Ac1º) antiglial (GFAP). Los cerebros se fijaron con paraformaldehido al 4%, los cortes seriados se hicieron a 8µm y antes de congelarlos a –70ºC, se dejaron 1h a temperatura ambiente para evitar que los cortes se despeguen durante la incubación. Antes de proceder a la incubación del anticuerpo(Ac), los portas están 30min a temperatura ambiente. Todos los lavados se hicieron con tampón buffer salino (PBS) 0.01M a pH 7.4 y saponina al 0.1% durante 10min. Antes de añadir el Ac1º se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% 40min a temperatura ambiente en oscuridad, se bloquearon las proteínas endógenas con bloqueante de proteínas (Bloqueante de proteínas endógenas, Bio_Genex.) 15min a temperatura ambiente y por último se bloquearon las actividades endógenas de avidina y biotina con bloqueante de avidina 15 min. y bloqueante de biotina 30 min (las diluciones de biotina y avidina se suplementaron con un 2% de suero no inmunizado del mismo tipo que el anticuerpo secundario, para bloquear uniones inespecíficas). Todo el proceso se realizó en cámaras de humedad. A continuación se procedió a la incubación a temperatura ambiente durante toda la noche, con 50-100µl del Ac 1º (Rabbit Anti-cow Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), DAKO) de concentración 1mg/ml y diluido al 1/4000 en PBS/saponina 0.1%, unido a un 2% de suero no inmunizado del mismo tipo del anticuerpo secundario; o control negativo del Ac en una cámara húmeda. A continuación se procedió a la incubación a temperatura ambiente durante 30min con 25-50µl del Anticuerpo secundario (Ac 2º) biotinizado, con una concentración de 1mg/ml diluido al 1/2000 en PBS/saponina al 0.1%. Se le añadió el sistema de detección avidina/biotina/peroxidasa 15 min y se procedió a añadir el sistema de visualización tetracloruro de diaminobencidina (DAB) 8min. Los tejidos se contratiñeron con hematoxilina 20s y se deshidrataron con una batería seriada de alcoholes: etanol 95% 5s, etanol 100% 5s, etanol 100% 5s y

citrosol 20min. Los tejidos se montaron en medio permanente y se observan al microscopio. Se hicieron controles positivos en tejidos con el daño cerebral para ver el buen funcionamiento de la reacción. También se hizo un control negativo con ausencia de Ac 1º para asegurar que no se produjeran reacciones inespecíficas .

Localización de la *molécula PCT* en el cerebro: en este caso los animales fueron perfundidos intracardiovascularmente por gravedad con 300ml de suero salino fisiológico (SSF) a temperatura ambiente, y posteriormente con 200ml de SSF frío. A continuación se procedió a la extracción cuidadosa del cerebro del animal, el cual se introdujo en medio de inmersión rodeado por isopentano líquido en nieve carbónica a –60ºC. Las muestras se almacenaron a –80ºC. Los cortes seriados se hicieron a 8µm y a –16ºC. Se dejaron a temperatura ambiente durante 30min, seguidos de otros 30 a 37ºC (para asegurar la adhesión de los cortes al porta). Se volvieron a almacenar a –80ºC. Antes de iniciar la incubación los portas se dejaron 30 min a temperatura ambiente, y a continuación se fijaron con acetona pura fría durante 10min. A continuación se procedió a bloquear la peroxidasa, proteínas endógenas, avidina y biotina endógenas. Todos los lavados se hicieron con PBS 0.01M a pH 7.4 y saponina al 0.1% durante 10min. La incubación se hizo a temperatura ambiente y en cámaras de humedad, durante toda la noche, con 100µl del Ac 1º (anti-Human Procalcitonin Mouse Monoclonal Antibody PCT-N1, Protein G Purified, Bio Vendor) de concentración 1mg/ml y diluido al 1/40000 en PBS/saponina 0.1%, unido a un 2% de suero no inmunizado del mismo tipo del Ac 2º; o control negativo del Ac en una cámara húmeda. A continuación se procedió a la incubación a temperatura ambiente durante 30min con 25-50µl del Ac 2º biotinizado (Ac 2º biotinizado Multilink, Super sensitive Biotinylated Anti-Ig for mouse, Rabbit and Guinea Pig antibodies, Bio_Genex) de uso inmediato. El proceso se realizó en cámaras de humedad. Se le añadió el sistema de detección avidina/biotina/peroxidasa 15 min y se procedió a añadir el sistema de visualización DAB 8min. Los tejidos se contratiñeron con hematoxilina 20s y se deshidrataron con una batería seriada de alcoholes: etanol 95% 5s, etanol 100% 5s, etanol 100% 5s y citrosol (Panreac) 20min. Los tejidos se montaron con EUKITT y se observan al microscopio. Se hicieron

controles negativos de cada dilución prueba del Ac1º. Los controles positivos no se pudieron hacer, debido a que no se conoce a ciencia cierta el lugar de síntesis de la PCT, con lo cual no dispusimos de tejidos que la expresaran.

Protocolo experimental: en todos los grupos experimentales se estudiaron los cambios temporales de temperatura durante el tiempo que duró el experimento. Se dividió el trabajo en tres fases: 1) Estudio Dosis/respuesta, para ver la relación a nivel central existente entre temperatura corporal y PCT en animales sanos haciendo un estudio de la curva Dosis/ Respuesta de la PCT frente a los cambios de temperatura registrado en animales sanos. Se microinyectaron diferentes dosis de PCT: 2, 4, 10,100, 1000 y 5000ng en icv y se midieron los cambios de temperatura en animales sanos. Se administró un control (LCR) y dos dosis de PCT por cada grupo de animales (n=6). 2) Efecto de la PCT sobre la fiebre inducida por LPS, para ver la relación a nivel central existente entre fiebre y PCT en animales tratados con endotoxinas bacterianas (gram negativas). Se administró PCT 100ng icv media hora antes de la inyección de LPS 50μg/Kg/ml i.p. (para ver su efecto profiláctico) y se midieron los cambios de temperatura producidos en el animal. Se administró una sola dosis de LPS en cada experimento, pues su administración repetida produce tolerancia frente a la fiebre (16). Por tanto se hicieron dos grupos, uno control (LCR icv + LPS i.p.) (n=6) y otro con PCT (PCT icv + LPS i.p.) (n=6). La dosis elegida (PCT 100ng) fue en base a los estudios obtenidos en la fase primera. 3) Estudio Inmunohistoquímico, para detectar la presencia y localización de la PCT en el SNC. Se administró LPS a dosis únicas: 50, 100 y 500 μg/kg i.p. a ratas para provocarles fiebre, y se perfundieron a las 1h, 4h y 8h, que son las horas correspondientes al tiempo de latencia, de inducción y de valor máximo de los niveles plasmáticos de PCT en individuos con infección por bacterias gram negativas. Se les extrajo el cerebro y se les aplicó la técnica cualitativa de inmunocitoquímica. En total son doce grupos (n=2).

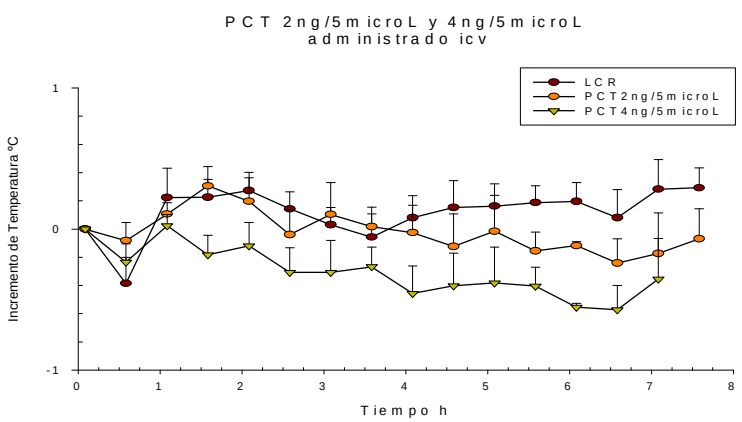
RESULTADOS:

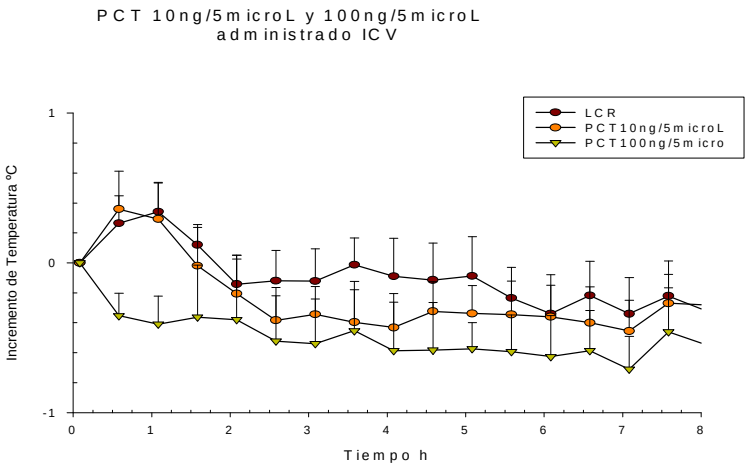
La administración icv de PCT a dosis 2ng (Fig.3), modifica significativamente la temperatura corporal (Tc) ($P<0.05$). Se observa una ligera disminución de la Tc desde las 4-8h, alcanzando su valor mínimo a las 4h (-0.28 ± 0.21), presentando un tiempo de latencia de aproximadamente 60 min. Las ratas tratadas con PCT 2ng, presentaron unos valores medios de la Tc, a lo largo de las 8h que duró el experimento, de (0.01 ± 0.01), alcanzando su incremento máximo de Tc a las 2h (0.32 ± 0.13). El análisis comparativo del control (LCR) respecto a la dosis 2ng reveló la existencia de diferencias significativas ($P<0.05$). La inyección icv de PCT a dosis 4ng (Fig.3), es capaz de producir una variación significativo en la Tc ($P<0.05$). Se observa una ligera disminución de la Tc desde la 1-8h. Alcanza su valor mínimo a las 6 h (-0.57 ± 0.17), valor que es significativamente menor que el del LCR (-0.43 ± 0.15), ($P<0.05$). Al administrar esta dosis observamos un tiempo de latencia aproximado a 60 min. Los animales tratados con PCT a dosis de 4ng/5µl, presentaron, durante las 8 h que duró el experimento, unos valores medios de Tc de -0.29 ± 0.02 ºC, y alcanzaron su incremento máximo a la hora (0.04 ± 0.09). Los análisis comparativos del LCR respecto a la dosis 4ng revelaron la existencia de diferencias significativas ($P<0.05$), como también revelaron, que la diferencia era significativa con respecto a la dosis anterior ($P<0.05$). La administración de PCT a dosis 10ng icv (Fig.4), es capaz de producir un cambio significativo en la Tc ($P<0.05$). Se observa una ligera disminución de la Tc desde las 2-8h, prácticamente actúa sobre la Tc durante casi toso el experimento a excepción de las 2h primeras. Su valor mínimo lo alcanza a las 4h (-0.28 ± 0.21), el cual es significativamente menor que el del control (-0.02 ± 0.2), ($P<0.05$). A esta dosis, la PCT presenta un tiempo de latencia de aproximadamente 60 min. Los animales tratados con PCT 10ng, presentaron unos valores medios de la Tc, a lo largo de las 8h que duró el experimento, de (-0.22 ±0.03) , alcanzando su incremento máximo de Tc a la hora (0.41 ± 0.23). El análisis comparativo del control respecto a la dosis 10ng reveló la existencia de diferencias significativas ($p<0.05$). La inyección icv de PCT a dosis 100ng/5µ (fig. 4) es capaz de producir un cambio significativo en la Tc ($P<0.05$). Se observa una ligera disminución de la Tc desde los 30min hasta las 8h, es decir, durante casi completamente todo el

experimento. Alcanza su valor mínimo a las 4 h (-0.59 ± 0.32), el cual es significativamente menor que el del LCR (-0.02 ± 0.2), (P<0.05). Al administrar esta dosis observamos un tiempo de latencia de aproximadamente 30 min. Los animales tratados con PCT a dosis de 100ng, presentaron, durante las 8 h que duró el experimento, unos valores medios de Tc de - 0.47 ±0.02 ºC, y alcanzaron su incremento máximo a la hora (0.24 ± 0.17). El análisis comparativo del control respecto a la dosis 100ng reveló la existencia de diferencias significativas (P<0.05), así como también las hubo con respecto a la dosis 10ng(P<0.05). En la figura 5 se observa como la administración de PCT a dosis 1000ng icv, modifica significativamente la Tc (P<0.05). Se observa una leve disminución de la Tc desde los 30 min hasta las 2 h, alcanzando su valor mínimo en torno a la hora (-0.01 ± 0.10). A esta dosis, la PCT presenta un tiempo de latencia de aproximadamente 30 min. Las ratas tratadas con esta dosis, presentaron unos valores medios de la Tc, a lo largo de las 8h que duró el experimento, de 0.09 ± 0.01 ºC, alcanzando su incremento máximo de Tc a las 5h (0.28 ± 0.29). El análisis comparativo del control respecto a esta dosis reveló la existencia de diferencias significativas (P<0.05). La inyección icv de PCT a dosis 5000ng, representada en la figura 5, es capaz de producir una variación significativo en la Tc (P<0.05). Se observa una ligera disminución de la temperatura de los animales desde los 30min hasta las 8h,es decir, durante casi todo el tiempo que dura el experimento. Es a las 4h cuando alcanza su valor mínimo (-0.47 ± 0.15) significativamente menor que el del LCR (-0.13 ± 0.14), (P<0.05). Al administrar esta dosis observamos un tiempo de latencia de alrededor de 30 min. Los animales tratados con dosis de PCT 5000ng, presentaron, durante las 8 h que duró el experimento, unos valores medios de Tc de -0.24 ± 0.01 ºC, y alcanzaron su incremento máximo a los 30min (0.07 ± 0.06). El análisis comparativo del control respecto a dicha dosis reveló la existencia de diferencias significativas (P<0.05). Así como también se encontraron diferencias significativas con respecto a la dosis 1000ng(P<0.05).

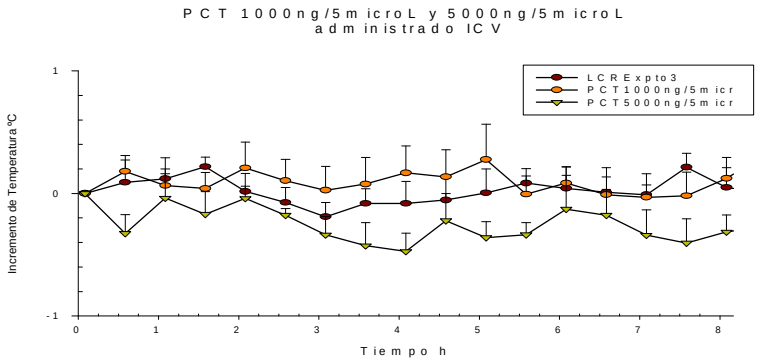
Anteriormente hemos comprobado que la dosis de 100ng de PCT administrada icv, es la más apropiada para ejercer alguna acción sobre la Tc en animales sanos. Pues, por su corto periodo de latencia (30min) igual al de dosis superiores, su valor medio durante las 8h que duró el

experimento(-0.47±0.02) menor incluso que el de dosis 5000ng (-0.24± 0.01), su valor mínimo(-0.59 ± 0.32) menor que el de dosis 5000ng (-0.4 ± 0.15) y el largo tiempo que dura su acción (de 30min a 8h), se erige como la dosis mas apropiada. El pretratamiento icv con PCT (100ng) 30 min previa a la administración periférica de LPS (50µg/kg i.p.), produjo cambios significativos en la respuesta febril inducida por éste ($P<0.05$). En la figura 6 se observa como el pretratamiento con PCT disminuye ligeramente los valores de la Tc desde las 5-9h. Alcanza su valor mínimo (-0.13 ± 0.28) a la hora y media, al igual que el control (LCRicv + LPSi.p.) que en dicho momento alcanza un valor mínimo (-0.02 ± 0.22) significativamente mayor ($P<0.05$). El periodo de latencia y la evolución de la temperatura corporal fueron muy parecidos al control. No así sus valores medios de Tc durante las 12h que duró el experimento (0.48 ± 0.02), ni su incremento máximo (1.01 ± 0.16), que fueron significativamente menores que el control ($P<0.05$). La localización anatómica de los sitios de microinyección correspondientes a todos los grupos de ratas tratadas se situaron entre –0.3mm y –0.9mm desde bregma (Paxinos y Watson, 1996).





FIGURAS 3 Y 4*: Efecto sobre la Tc de la microinyección icv de LCR (n=6), PCT 2ng (n=6) y PCT 4ng (n=6), efecto sobre la Tc de la microinyección icv de LCR (n=6), PCT 10ng (n=6) y PCT 100ng (n=6).*



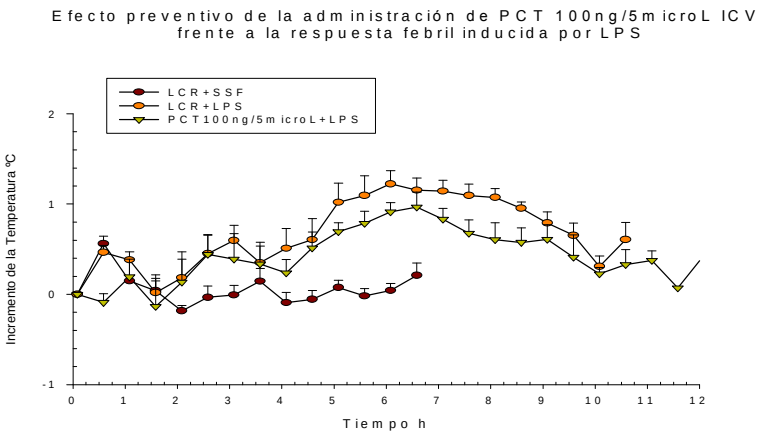


FIGURA 5 Y 6: *Efecto sobre la Tc de la microinyección icv de LCR (n=6), PCT 1000ng (n=6) y 5000ng (n=6), efecto de la administración icv de PCT 100ng sobre la respuesta febril inducida por LPS (n=6).*

La inmunohistoquímica del *daño cerebral* demostró, que la zona dañada se limitaba a la zona cercana a la cánula guía, y la inyectora pero sin extenderse demasiado (Fig.7). Esto indica que el efecto producido por la administración de PCT icv, se debe a su acción básicamente sobre el ventrículo. Este hecho ocurrió tanto en los animales de la fase primera, como en los animales de la fase segunda.

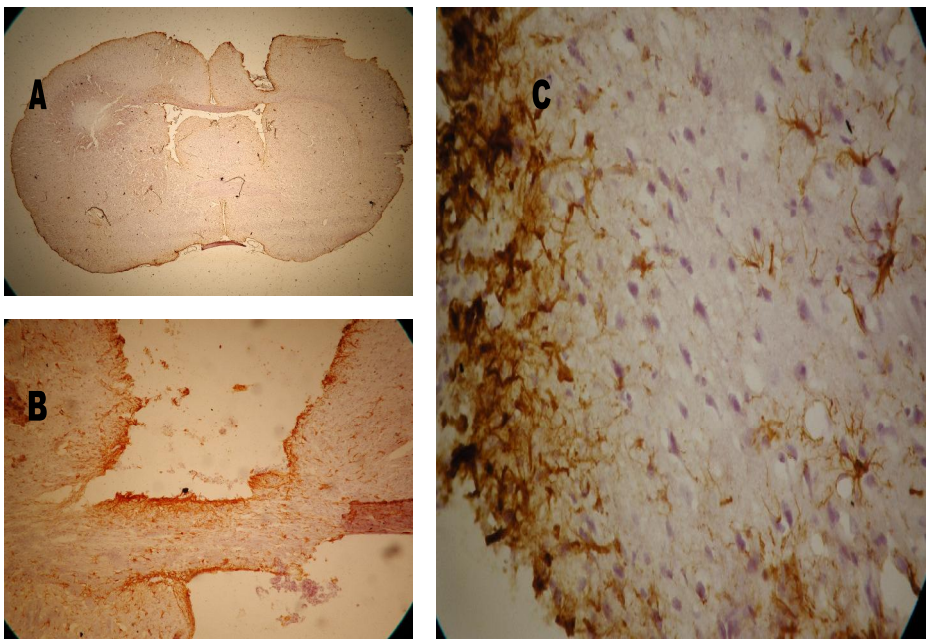


FIGURA 7: *A) mapa anatómico histológico representativo del daño tisular inducido por implante de cánula guía, B) marcaje astrocitario del daño tidsular , C) astrocitos marcados en zona pericanular.*

El estudio inmunohistoquímico de la *presencia de PCT* en el cerebro: marcó la presencia de esta molécula en las células endoteliales de la Pars Tuberal del hipotálamo. Esta zona se localiza cerca del tercer ventrículo y del Núcleo Arcuato, se caracteriza por poseer una barrera hematoencefálica muy permeable, lo cual explicaría la presencia de la PCT en dicha zona. En los grupos perfundidos a 1h se marcó la presencia de

PCT en las células endoteliales anteriormente citadas, pero no se encontraron diferencias significativas a las distintas dosis de LPS administradas: 50, 100 y 500μg. En los grupos perfundidos a las 4h la PCT se localizó en las células de la Pars Tuberal del hipotálamo, y tampoco se encontraron diferencias en función de la dosis de LPS administrada. Los grupos perfundidos a las 8h marcaron la presencia de PCT en la misma zona (la Pars Tuberal), y no mostraron diferencias en función de las dosis de LPS que se administraron. Los controles no presentaron marcaje en las células endoteliales de la Pars Tuberal del Hipotálamo (Fig.8 y 9).

CONCLUSIONES

1) La administración central (icv) de PCT produce una ligera disminución de la Tc, fundamentalmente de 3-8h.
2) La administración central (icv) de PCT a diferentes dosis no produce un efecto Dosis/Respuesta frente a la Tc.
3) El pretratamiento con PCT 100ng/5μl (icv), disminuye ligeramente la respuesta febril inducida periféricamente por LPS 50μg/kg (i.p.), fundamentalmente de 4-9h.
4) La presencia de PCT en el cerebro de ratas con fiebre producida por la administración de LPS, se localiza en las células endoteliales de la Pars Tuberal del Hipotálamo.

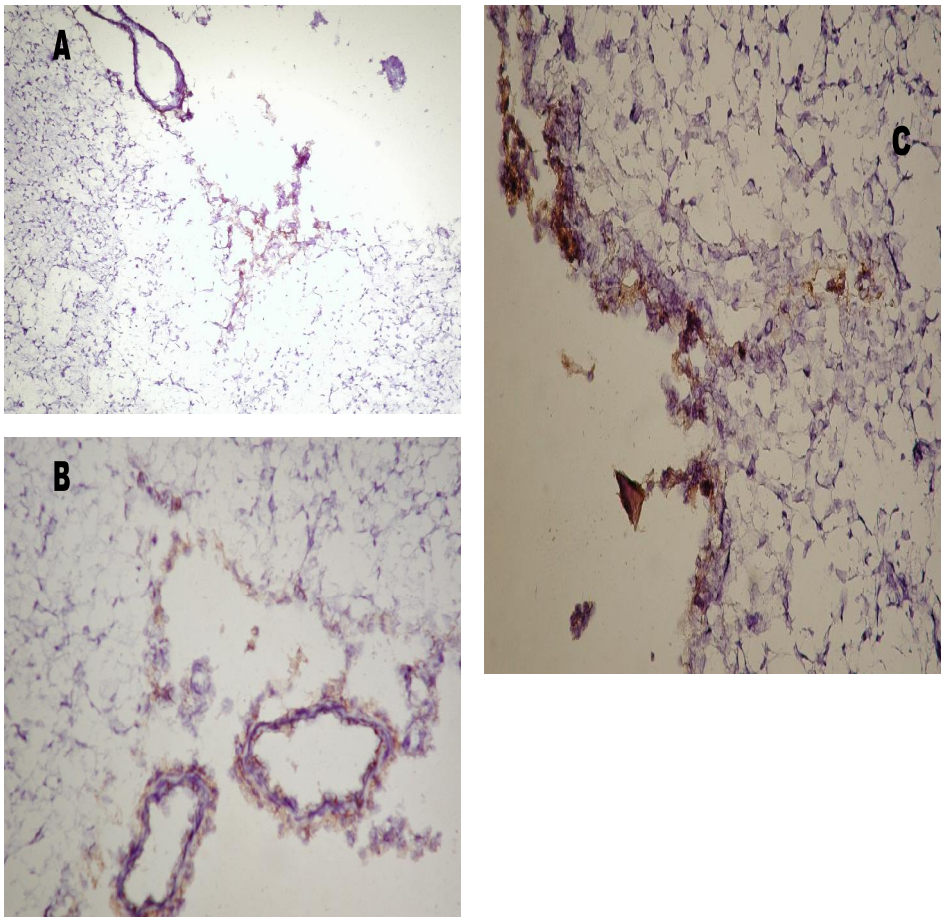


FIGURA 8: *Estudio IHQ de la presencia de PCT en la Pars Tuberal del hipotálamo: A) marcaje representativo de ratas prefundidas a 1h tas LPS i.p., B) a las 4h y C) a las 8h.*

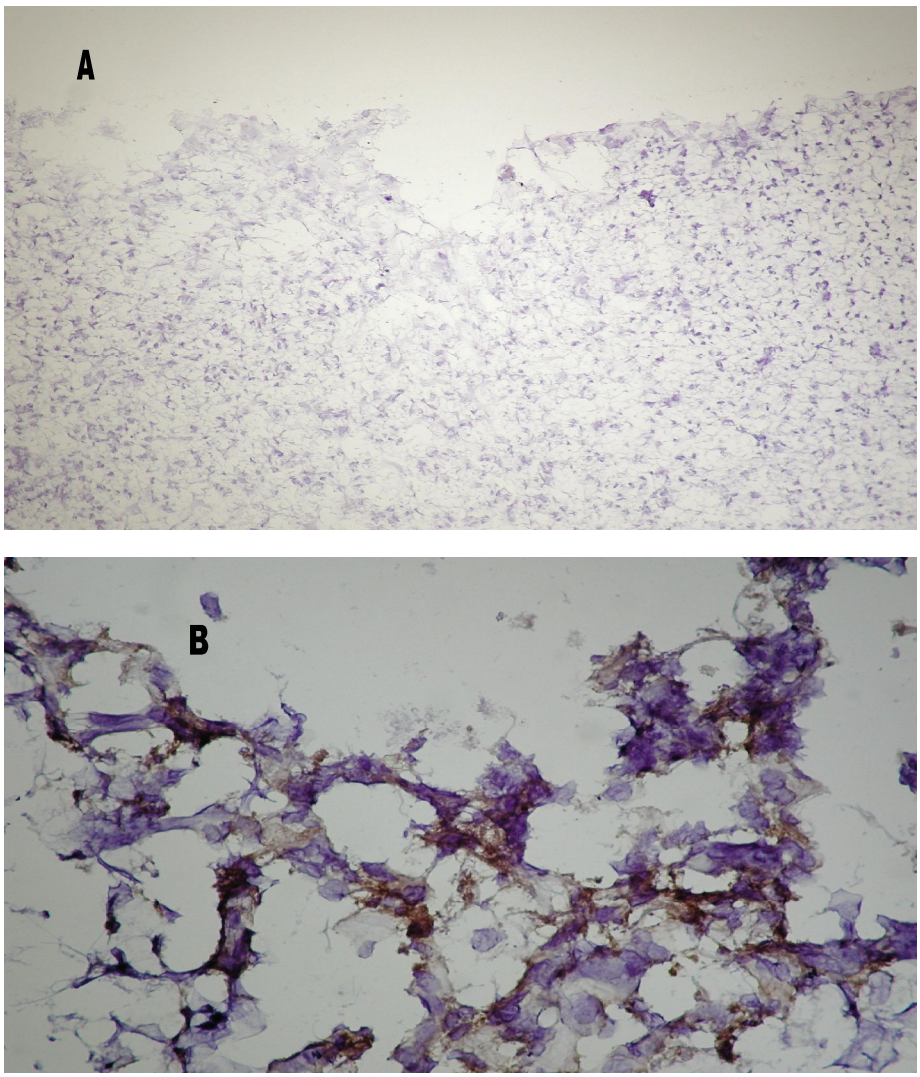


FIGURA 9: *A) marcaje inexistente de PCT representativo de ratas control (SSF), B) ampliación de zona inmunoreactiva a la PCT, concretamente la Pars Tuberal.*

BIBLIOGRAFIA

(1) BRAITHWAITE S. (2000) Procalcitonin: New insights on regulation and origin. *Crit Care Med*, 28(2): 586-588.

(2) BRUNKHORST F. M., HEINZ U., FORYCKI Z.F.(1998) Kinetics of procalcitonin in iatrogenic sepsis. *Intensive Care Med*, 24: 888-892.

(3) DANDONA P., NIX D., WILSON M.F. y cols.(1994) Procalcitonin increase after endotoxin inyection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 1605-1608.

(4) DINARELLO C.A., CANNON J.G., WOLFF S.M. (1988) New concepts on the pathogenesis of fever. *Rev Infect Dis*, 10(1): 168-189.

(5) GENDREL D., BOHUON C. (2000) Procalcitonin as a marker of bacterial infection. *Pediatr Infect Dis J*, 19(8): 679-688.

(6) HAN Y., CARCILLO J., RUPPEL R. y cols. (1999) Cerebrospinal fluid procalcitonin is increased after traumatic brain injury in children. *Crit Care Med*, 27(12): A75.

(7) HAN Y., CARCILLO J., RUPPEL R. y cols. (2002) Cerebrospinal fluid procalcitonin and severe traumatic brain injury in children. *Crit Care Med*, 3(1): 39-44.

(8) LÓPEZ-VALPUESTA F.J., TAVARES E., FERNÁNDEZ-ALONSO A., SANCIBRIÁN M., MIÑANO F.J. (1999) Procalcitonin: A new molecule involved in endotoxin-induced fever. Abst. XI Int Congress of Pharmacology of Thermoregulation. Sevilla.

(9) MEISNER M. (1996) PCT: A new innovative infection parameter, biochemical and clinical aspects. Brahms Diagnostica GMBH.

(10) MIÑANO F.J., FERNÁNDEZ-ALONSO A., MYERS R.D., SANCIBRIÁN M. (1996) Hypothalamic interaction between macrophage inflammatory protein-1α (MIP-1α) and MIP-1β in rats: a new level for fever control?. *J Physiol*, 491(1): 209-217.

(11) MONNERET G., PACHOT A., LAROCHE B., PICOLLET J., BIENVENU J. (2000) Procalcitonin and calcitonin gene-related peptide decrease LPS-induced TNF production by human circulating blood cells. *Cytokine,* 12(6): 762-764.

(12) MÜLLER B., WHITE J., NYLEN E., SNIDER R., BECKER K., HABENER J. (2001) Ubiquitous expression of the calcitonin-I gene in multiple tissues in response to sepsis. J *Clin Endocrinol Metab*, 86(1): 396-404.

(13) NETEA M.G., KULLBERG B.J., VAN DER MEER J. (1999) Do only circulating pyrogenic cytokines act as mediators in the febrile response? A hypothesis. *Eur J Clin Invest,* 29(4): 351-356.

(14) NOOR A., MALLIK B. (1991) Differential influence of medial and lateral preoptic areas on body temperature in conscious and unconscious rats. *Brain Res,* 566: 307-315.

(15) NYLEN E.S., WHANG K.T., SNIDER JR y cols. (1998) Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis. *Crit Care Med*, 26: 1001-1006.

(16) ZEISBERGER E. (1999) From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *J Therm Biol* 24 (5-6): 287-326.

(17) http/www.procalcitonin.com