

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA,  
PEDIATRÍA Y RADIOLOGÍA.**

**FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



***ACCIÓN CENTRAL DE LA PROCALCITONINA EN LA  
FIEBRE Y LA TEMPERATURA CORPORAL.***

Memoria que presenta

**MARÍA LUISA OJEDA MURILLO**

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

**SEVILLA 2004**

*D. Francisco Javier Miñano Sánchez, Catedrático del Departamento de Farmacología, Pediatría y Radiología de la Universidad de Sevilla,*

*D<sup>a</sup>. Eva Tavares Vázquez, Doctora en Farmacia,*

*CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral con título "Acción central de la procalcitonina sobre la fiebre y la temperatura corporal" presentada por la Lda. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Luisa Ojeda Murillo, para optar al grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizada bajo nuestra dirección, y reúne los requisitos exigidos para su lectura y posterior defensa.*

*Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente con fecha 16 de Diciembre de 2003.*

*Fdo: D. F. Javier Miñano Sánchez.*

*Fdo: D<sup>a</sup> Eva Tavares Vázquez.*

*D<sup>ª</sup> María Luisa Ojeda Murillo, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Sevilla, en posesión del Diploma de Estudios Avanzados en Farmacología, Pediatría y Radiología,*

***CERTIFICA:** que la presente Tesis Doctoral con título "Acción central de la procalcitonina sobre la fiebre y la temperatura corporal" ha sido realizado por ella bajo la dirección de D. Francisco Javier Miñano Sánchez Catedrático del Departamento de Farmacología, Pediatría y Radiología, y la Doctora D<sup>ª</sup> Eva Tavares Vázquez; y presentada para optar al grado de Doctor en Farmacia.*

*Fdo: D<sup>ª</sup> M<sup>ª</sup> Luisa Ojeda Murillo*

*Sevilla, 16 Noviembre 2003*

A mi madre

*"El porvenir de un hijo es siempre la obra de su madre"*

*NAPOLÉON I*

*En esta página quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han participado en la realización de esta tesis:*

*A la Universidad de Sevilla, al Departamento de Farmacología, Pediatría y Radiología, al Hospital Universitario de Valme, al Laboratorio Experimental de este Hospital, a la Fundación Valme y a la Consejería de Educación y Ciencias de la Junta de Andalucía, por ser un ejemplo de que la colaboración intercorporativa es fructífera, y haber hecho posible, proporcionando las instalaciones, la financiación y el soporte técnico adecuado, la realización de esta Tesis.*

*A mis directores F. Javier Miñano Sánchez y Eva Tavares Vázquez al haber puesto en mis manos un tema tan interesante como el de esta Tesis, por su labor directiva, sus consejos y experiencias. En definitiva, por iniciarme en este viaje de búsqueda interminable hacia el conocimiento, que es la ciencia.*

*A mis compañeros por su ayuda desinteresada y porque "compartir es vivir". A ti Driss por la "Teoría de la Onda", a ti Rosario por tu lógica aplastante, a ti Jesús por enseñarme tantas y tantas cosas, y a ti Antonio por los ratos de humor.*

*A todo el personal de servicios, administración y mantenimiento que han facilitado las tareas menos agradables de la investigación. A Joaquina por su eficiencia.*

*A toda mi familia, en especial a mis padres, mi hermano y mis abuelos, tan preocupados en cada una de estas letras, por hacer suyos mis sentimientos, creer en mí y darme fuerzas. A Santi, por su confianza, sus consejos, su paciencia y sobre todo por enseñarme a disfrutar de la vida. A la familia López-Herrero. A todos mis amigos por los estímulos ofrecidos.*

*A mis compañeras más incomprendidas, las ratas, por su resignación, su amor desinteresado hacia la humanidad, y por haberme enseñado a vencer el miedo. Sin ellas hubiera sido imposible este y otros muchos trabajos.*

*A todos ellos, y a las personas que se interesen por este trabajo. GRACIAS.*

## **Abreviaturas utilizadas**

- Ac1°: anticuerpo primario*  
*Ac2°: anticuerpo secundario*  
*Acb: núcleo acumbens*  
*AH: área hipotalámica anterior*  
*AHP: área hipotalámica anterior, posterior*  
*AINES: antiinflamatorios no esteroideos*  
*AMPc: adenosín monofosfato cíclica*  
*AP: área postrema*  
*Arc: núcleo arcuato*  
*AVS: área ventral septal*  
*BHE: barrera hematoencefálica*  
*CC: citocina*  
*CGRP: péptidos relacionados con la calcitonina*  
*COX-2: ciclooxigenasa-2*  
*CVOs: órganos circunventriculares*  
*CRF: factor liberador de corticotropina*  
*CRs: receptores de calcitonina*  
*CRLRs: receptores parecidos a los receptores de calcitonina*  
*CSF: factor estimulador de colonia*  
*CT: calcitonina*  
*DAB: diaminobencidina*  
*DPIV: enzima dipeptidil peptidasa IV*  
*erk: kinasa extracelular reguladora de señal*  
*FDA: food and drug administration*  
*FUO: fiebre de origen desconocido*  
*GFAP: proteína ácida fibrilar*  
*G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos*  
*GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.*  
*HPA: eje hipotálamo hipofisario*  
*icv: inyección intraventricular*  
*IFN: interferon*  
*IgG1k: inmunoglobulina G 1 kappa*  
*IHC: inmunohistoquímica*  
*IKB $\alpha$ : forma inactiva del factor nuclear kappa kinasa*  
*IL: interleucina*  
*ILMA: técnica de inmunoluminometría*

*iNOS: enzima inducible de la oxido nítrico sintetasa*  
*i.p.: inyección intraperitoneal*  
*JAK: jano kinasas*  
*LBP: proteínas de unión de LPS*  
*LCR: líquido cefalorraquídeo*  
*LMIF: factor inhibidor de la migración de linfocitos*  
*LPO: área preóptica lateral del hipotálamo*  
*LPS: lipopolisacárido*  
*MAF: factor activador de macrófagos*  
*MAP: proteína activadora de mitogénesis*  
*MAPK: proteína activadora de mitogénesis kinasa*  
*MCF: factor quimiotáctico de macrófagos*  
*MCP: proteína quimiotáctica de monocitos*  
*MDL: tálamo dorsomedial posterior*  
*ME: eminencia media*  
*Mig: monocina inducida por IFN- $\delta$*   
*MIP: proteína inflamatoria de los macrófagos*  
*MIF: factor inhibidor de la migración de macrófagos*  
*MPA: área medial preóptica del hipotálamo*  
*MPO: núcleo preóptico hipotalámico*  
*MVL: médula ventrolateral*  
*NAP: proteína neural antiproliferativa*  
*NC: núcleo circularis*  
*NF- $K\beta$ : factor nuclear kappa  $\beta$  kinasa*  
*NIK/IKK: kinasas inducibles*  
*NO: óxido nítrico*  
*N-PCT: procalcitonina N terminal*  
*OB: bulbo olfatorio*  
*Pa: núcleo paraventricular*  
*PAF: paraformaldehido*  
*PB: parabraquial*  
*PC: prohormona convertasa*  
*pch: plexos coroideos*  
*PC-PLC: fosfatidil colin fosfolipasa específica C*  
*PCR: proteína C reactiva*  
*PCR: técnica de reacción de la polimerasa en cadena*  
*PE: pirógeno endógeno*  
*Pe: núcleo periventricular hipotalámico*

*PF: factor placentario*  
*PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>*  
*PGES: prostaglandin sintetasa*  
*PGs: prostaglandinas*  
*PH: hipotálamo posterior*  
*PLA<sub>2</sub>: fosfolipasa A<sub>2</sub>*  
*PO/HA: área preóptica del hipotálamo lateral*  
*Ppit: hipófisis posterior*  
*PTH: hormona paratiroidea*  
*PTHrP: proteínas relacionadas con la PTH*  
*R: núcleo rojo*  
*RANTES: regulador de la activación de expresión y secreción de células T normales*  
*RAMPs: proteínas modificadoras de la actividad de receptores*  
*SC: cresta supraóptica*  
*Sch: núcleo supraquiasmático*  
*SCO: órgano subcomisural*  
*SDRA: síndrome del distrés respiratorio agudo*  
*SFO: órgano subfornical*  
*SIRS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica*  
*SO: núcleo supraóptico*  
*Sol: núcleo del tracto solitario*  
*SSF: suero salino fisiológico*  
*TA: temperatura ambiente*  
*Tb: temperatura basal*  
*TBS: tampón fosfato salino*  
*Tc: temperatura corporal*  
*TC: tuber cinereum*  
*TNF: factor de necrosis tumoral*  
*Vgl: limitante glial ventral*  
*VLM: tálamo ventrolateral medial*  
*VOLT: lamina terminalis*  
*3V: tercer ventrículo*





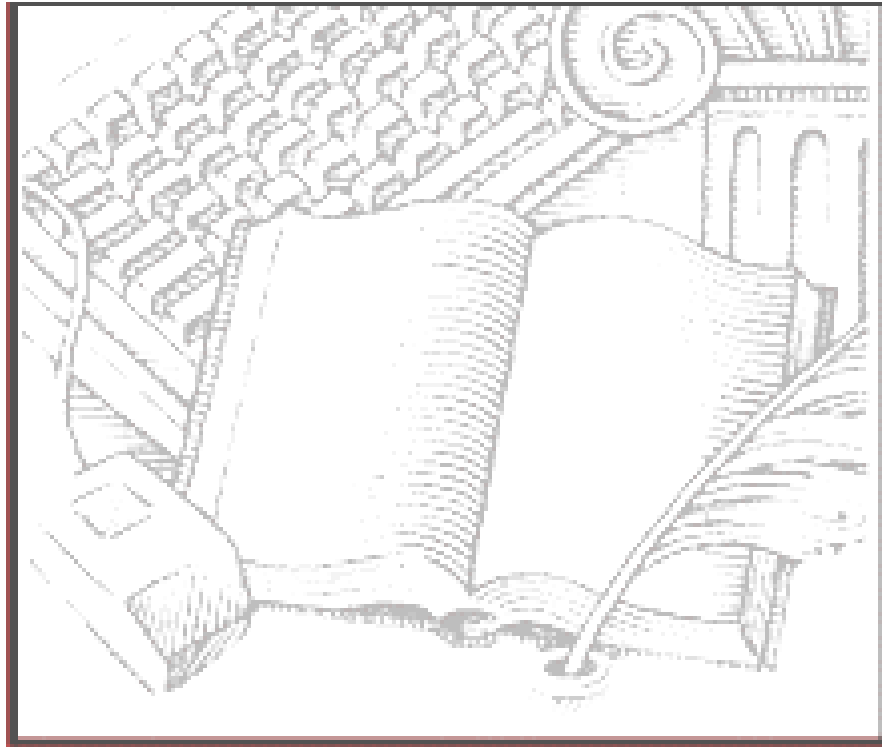


---

## ***ÍNDICE***

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>I.1</b> Reseña histórica.....	5
<b>I.2</b> Control central de la temperatura corporal.....	6
<b>I.3</b> Fiebre:.....	6
<b>I.3.1</b> Definición.....	6
<b>I.3.2</b> Fisiología.....	7
<b>I.3.3</b> Pirógeno Exógeno: Lipopolisacárido.....	9
<b>I.3.4</b> Pirógeno Endógeno (PE): Citocinas.....	12
<b>I.3.5</b> Interacción del PE con el SNC.....	14
<b>I.3.6</b> Prostaglandinas.....	19
<b>I.4</b> Marcadores de inflamación: .....	22
<b>I.4.1</b> Proteína C reactiva (PCR) .....	22
<b>I.4.2</b> Citocinas.....	23
<b>I.4.3</b> Fosfolipasa A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ).....	23
<b>I.4.4</b> Elastasa.....	24
<b>I.4.5</b> Neopterinina.....	24
<b>I.4.6</b> Procalcitonina (PCT).....	24
<b>I.4.7</b> Otros parámetros.....	25
<b>I.5</b> Procalcitonina, marcador o mediador.....	27
<b>I.5.1</b> Marco histórico.....	27
<b>I.5.2</b> ¿Qué es la PCT?.....	29
<b>I.5.3</b> Inducción y síntesis de PCT.....	30
<b>I.5.4</b> Mecanismo de acción.....	<b>I.5.5</b> Actividad 32
fisiológica y fisiopatológica.....	34
<b>I.5.6</b> Niveles plasmáticos.....	37
<b>I.5.7</b> PCT y citocinas.....	38
<b>I.5.8</b> Indicaciones clínicas.....	39
<b>I.5.9</b> PCT y SNC.....	41
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>45</b>
<b>III. METODOLOGÍA.....</b>	<b>48</b>
<b>III.1</b> Animales.....	49
<b>III.2</b> Construcción de cánulas guías.....	49
<b>III.3</b> Registro de la temperatura corporal.....	50
<b>III.4</b> Procedimiento quirúrgico e implantación de c. guías....	51
<b>III.5</b> Técnica de microinyección.....	55
<b>III.6</b> Fármacos.....	59
<b>III.7</b> Análisis histológicos.....	60
<b>III.8</b> Análisis estadístico.....	62

III.9 Estudio de los niveles plasmáticos de PCT.....	63
III.10 Inmunohistoquímica.....	64
III.10.1 Localización del daño cerebral inducida por la introducción crónica de cánulas guías.....	65
III.10.2 Inmunolocalización cerebral de la PCT.....	68
III.10.2.a Presencia de IgG1k en tejido.....	69
III.10.2.b Adsorbancia.....	71
III.10.2.c Animal Research Kit, DAKO.....	72
III.11 Protocolo experimental.....	76
IV. RESULTADOS.....	80
IV.1 Niveles plasmáticos de PCT en ratas normales y tratadas con LPS 100µg/kg i.p.....	81
IV.2 Efectos de la administración central de la PCT sobre la temperatura corporal. Estudio dosis/respuesta.....	83
IV.2.1 Dosis 2ng/5µl.....	88
IV.2.2 Dosis 4ng/5µl.....	90
IV.2.3 Dosis 10ng/5µl.....	91
IV.2.4 Dosis 100ng/5µl.....	93
IV.2.5 Dosis 1000ng/5µl.....	94
IV.3 Efecto central de la PCT sobre la fiebre inducida por bacterias Gram (-).....	97
IV.3.1 PCT dosis 2ng/5µl (icv) + LPS 50µg/kg (i.p.).....	102
IV.3.2 PCT dosis 4ng/5µl (icv) + LPS 50µg/kg (i.p.).....	104
IV.3.3 PCT dosis 10ng/5µl (icv) + LPS 50µg/kg (i.p.).....	106
IV.3.4 PCT dosis 100ng/5µl (icv) + LPS 50µg/kg (i.p.).....	108
IV.3.5 PCT dosis 1000ng/5µl (icv) + LPS 50µg/kg (i.p.).....	110
IV.4 Resultados histológicos de los lugares de microinyección.....	114
IV.5 Estudio inmunohistoquímico de PCT en cerebro.....	115
IV.5.1 Grupo control (SSF i.p.).....	115
IV.5.2 Animales endotoxémicos perfundidos a 1h.....	121
IV.5.3 Animales endotoxémicos perfundidos a 3h.....	126
IV.5.4 Animales endotoxémicos perfundidos a 6h.....	126
IV.5.5 Animales endotoxémicos perfundidos a 12h.....	129
IV.5.6 Animales endotoxémicos perfundidos a 24h.....	129
V. DISCUSIÓN.....	132
VI. CONCLUSIONES.....	143
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	146



---

---

## ***INTRODUCCIÓN***

# **I. INTRODUCCIÓN**

## **I.1. RESEÑA HISTÓRICA:**

*La historia de la termorregulación va casi pareja a la del ser humano. Ya desde la prehistoria los hombres observaron que los cuerpos vivos estaban calientes y los muertos fríos, el calor por tanto era un símbolo de vida, de poder y de fuerza. Un gran número de rituales y fiestas se dedicaron a esta temática que tenía una explicación mágica, mística y misteriosa. Con las primeras civilizaciones se empiezan a buscar formas de controlar este calor corporal, así en el Papiro de Ebers aparecen los primeros tratamientos y anotaciones.*

*Con los griegos aparece el concepto de “balance ideal”, siendo los primeros en comprender que el organismo trata constantemente de mantener una temperatura ideal. Los griegos hicieron grandes aportaciones que se mantuvieron en gran medida hasta el siglo diecisiete cuando William Harvey defendió que el corazón no era la fuente del calor vital.*

*Durante los siglos diecisiete y dieciocho, aparecieron dos grandes líneas: la mecánica o física y la química. Gradualmente los científicos empezaron a comprobar sus teorías experimentalmente, lo que dio el soporte necesario para explicar que el calor corporal era un*

*problema de química. Así una vez más, la teoría precedió a la práctica (1)*

## **I.2. CONTROL CENTRAL DE LA TEMPERATURA CORPORAL**

*El control y mantenimiento de la temperatura corporal se realiza mediante una serie de mecanismos relacionados entre sí y controlados por el sistema nervioso central (SNC), que consiguen mantenerla estable por medio de un equilibrio de ganancia y pérdida de calor.*

*El centro termorregulador del organismo reside en el hipotálamo, se cree que se encuentra localizado fundamentalmente en el área preóptica del hipotálamo anterior (PO/HA) (2-4), la cual contiene diferentes tipos de poblaciones neuronales: neuronas termo-insensibles que representan el 60% de la población neuronal del PO/HA, neuronas sensibles al calor que representan el 30% y neuronas sensibles al frío que representan el 10% (5).*

*El PO/HA actúa como un "termostato" que armoniza la producción y eliminación de calor mediante un sistema de retroalimentación "feed-back" negativa, manteniendo, de este modo, una temperatura central próxima a los 37° C.*

*Varias son las sustancias neuroquímicas implicadas en la termorregulación. Aunque no está muy claro el papel de cada una, sabemos que neurotransmisores como la dopamina, noradrenalina, serotonina, ácido gamma-aminobutírico, así como diversos péptidos, segundos mensajeros como la monofosfato cíclico adenosina y la monofosfato cíclico guanosina, y las concentraciones iónicas del sodio/calcio están implicados en el control de la temperatura corporal (6). Recientemente también se ha implicado al óxido nítrico en esta trama de sustancias relacionadas con la termorregulación, concretamente con la producción de fiebre (7).*

## **I.3. FIEBRE**

### **I.3.1. DEFINICIÓN**

*La fiebre, se define como la elevación de la temperatura corporal por encima de los límites normales con conservación de los mecanismos reguladores, a diferencia de lo que sucede en la hipertermia. Este incremento genera simultáneamente un aumento en la producción de calor y una disminución de las pérdidas caloríficas. La fiebre es una de las principales manifestaciones de la enfermedad, y aunque las causas que pueden originarla son múltiples, la mayoría son debidas a infecciones bacterianas, virales, parasitarias o micóticas.*

### **I.3.2. FISIOLÓGÍA**

*La base fisiopatológica fundamental en la producción de la fiebre es el ajuste del mecanismo hipotalámico de regulación de la temperatura a un nivel más elevado que el normal, debido a algún proceso patológico.*

*Actualmente se supone que en la génesis de la fiebre participan una cascada de acontecimientos interdependientes, posiblemente sujetos a mecanismos de retrocontrol negativo (8,9), en los que intervienen diferentes mediadores celulares y humorales.*

*Este mecanismo es estimulado por unas sustancias circulantes denominadas pirógenos. Los procedentes de fuera del organismo (**pirógenos exógenos**) que pueden afectar y originar un proceso inflamatorio y determinar la aparición de una reacción febril, están constituidos por diversos y complejos agentes, tales como bacterias, sus endotoxinas, virus, hongos, protozoos, reacciones inmunológicas, tumores y fármacos entre otros. De todos ellos, el mejor estudiado es el lipopolisacarido (**LPS**), un componente de la membrana externa de las bacterias gram negativas. Se han identificado tres componentes en el LPS o endotoxina, siendo el lípido A el responsable del efecto pirogénico. La administración parenteral de endotoxina no produce fiebre de forma inmediata, sino que, tras un periodo de latencia, que dura aproximadamente entre 90 y 120 minutos, comienza la elevación de la temperatura corporal (10).*

*Debido a este obligado intervalo desde que se administra la endotoxina hasta que aparece la respuesta febril, desde 1948 se sospecha la existencia de una sustancia mediadora de naturaleza*



proteica, denominada **pirógeno endógeno (PE)**, que elaboraría el organismo en respuesta al pirógeno exógeno y que sería responsable del aumento de temperatura a nivel del centro hipotalámico (11). Durante la última década se ha descubierto que dentro de la familia de las **citocinas** (cuyo papel principal consiste en regular las respuestas inflamatorias ante cualquier agresión externa) existen diversos miembros con capacidad de producir fiebre, y que se han identificado con los PE (12). Aunque actualmente todavía existe controversia acerca del mecanismo preciso de actuación de los PE, se piensa que éstos se liberan en sangre y pasan al SNC a través de los órganos circunventriculares (CVOs), estructuras que carecen de barrera hematoencefálica (BHE) (13).

Los PE poseen la capacidad de provocar la síntesis de prostaglandinas (PGs), concretamente  $PGE_2$ , a través de la inducción de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), en zonas próximas al área hipotalámica termorreguladora (14, 15).

La zona más pirogénica del SNC es el área preóptica ventromedial (PO/AH) que rodea justamente la parte anterior de la lamina terminalis, pero se sabe que existen otras estructuras que cambian su patrón metabólico frente a la fiebre. Entre estas zonas reactivas están el área preóptica lateral del hipotálamo (LPO), el tálamo dorsomedial posterior (MDL), el hipotálamo posterior (PH) y el núcleo rojo (R) (16, 17).

Clásicamente el mecanismo de génesis de la fiebre se divide en cinco fases:

1) Activación de los monocitos, neutrófilos, linfocitos y otras células por estímulos infecciosos, tóxicos, inflamatorios y/o inmunológicos (**pirógenos exógenos**).

2) Formación y liberación a la circulación de **PE** como interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF), interferón (IFN), interleucina-6 (IL-6), etc...

3) Interacción de estas sustancias con los diferentes CVOs, que prácticamente carecen de BHE, tales como: lámina terminalis (VOLT),

*eminencia media (ME), órgano subfornical (SFO), órgano subcomisural (SCO) y área postrema (AP).*

*4) Estímulo de la síntesis y liberación de PGs, fundamentalmente PGE<sub>2</sub>, en la pared anterior del tercer ventrículo (3V) y en el PO/HA.*

*5) Activación de las neuronas termorreguladoras hipotalámicas que desencadenan en última instancia un incremento de la temperatura corporal. (Fig. 1)*

*Sin embargo, y a pesar de todo ello, aún no se han establecido de forma precisa los últimos pasos que desencadenan la fiebre, lo que ha originado grandes discrepancias al considerar tanto el gran número de sustancias y áreas centrales involucradas, como las propiedades moleculares de los mediadores implicados y los mecanismos por los cuales se asume que éstos alcanzan y actúan a nivel central.*

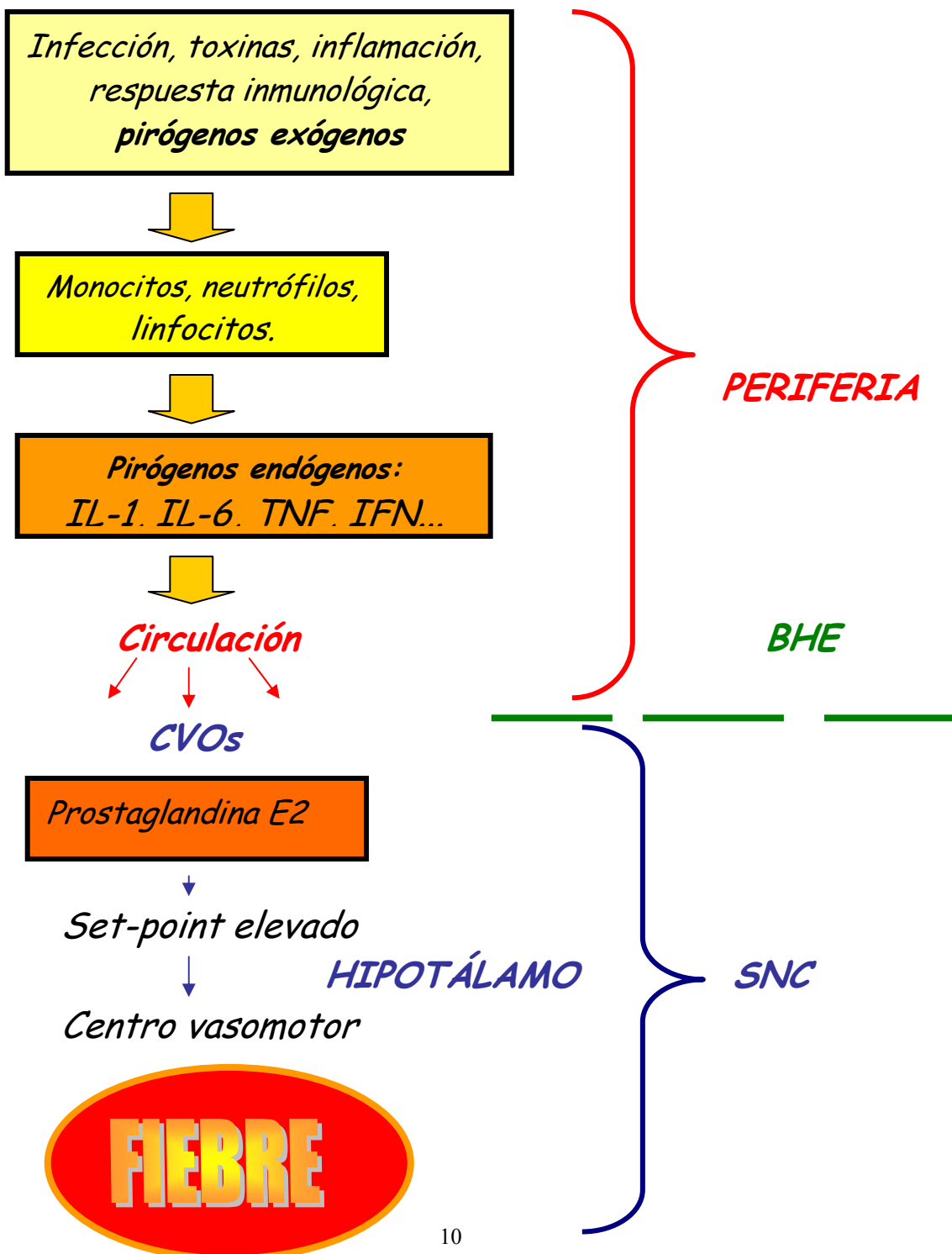
*La fiebre no es un mecanismo de protección aislado, debe entenderse como un sistema de defensa, que junto con la estimulación del eje hipotálamo-hipofisario (HPA) y otras funciones autonómicas son necesarias para la protección del huésped frente a estímulos inflamatorios/infecciosos. Este encuadre es importante para comprender que el sistema neuroendocrino y el inmune, están interrelacionados, y que funcionan con una finalidad común, reestablecer la homeostasis lo antes posible. De ahí también el término de sistema neuro-inmunoendocrino (18).*

### ***I.3.3. PIRÓGENO EXÓGENO: LIPOPOLISACÁRIDO***

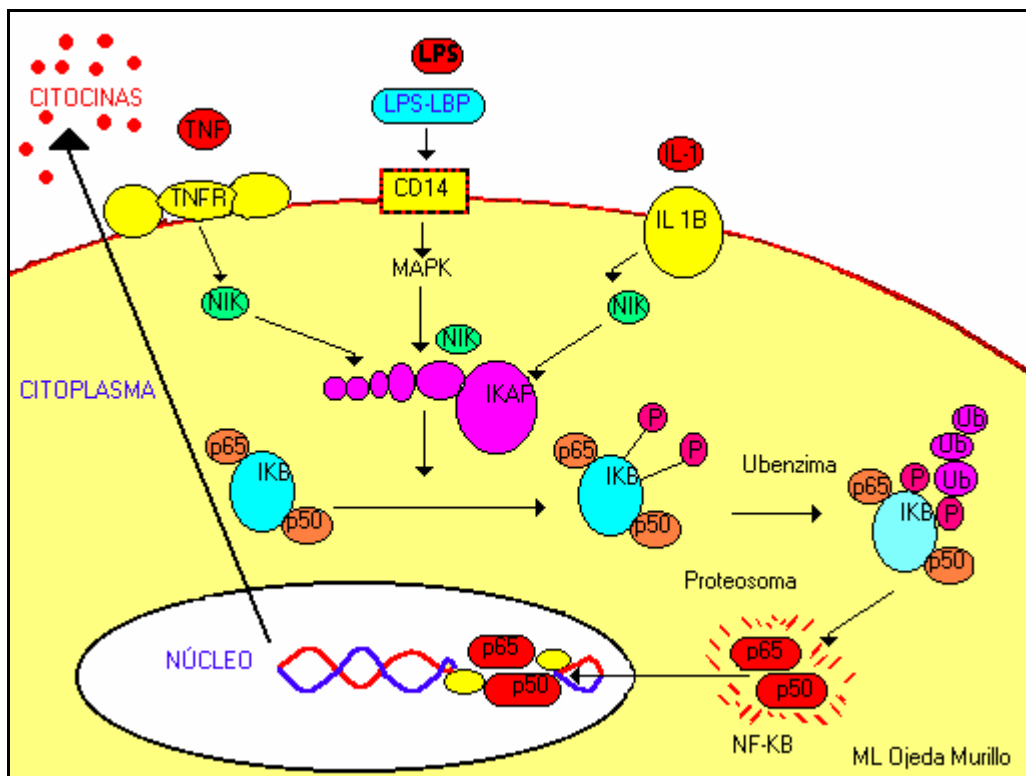
*La entrada en el organismo de pirógenos exógenos provoca un aumento de los niveles plasmáticos de diferentes PE. Como hemos mencionado anteriormente, el mecanismo de actuación del pirógeno exógeno mejor conocido es el del LPS, que además de producir fiebre, es capaz de provocar shock séptico y respuesta de fase aguda en diferentes especies animales incluida el hombre (19). Varios estudios han demostrado que tras la administración periférica de LPS, existe una activación cerebral que sugiere la existencia de un circuito neuronal completo y redundante que activa al hipotálamo neuroendocrino (núcleo*

paraventricular: Pa, núcleo supraóptico: SO, núcleo circularis: NC), al núcleo del tracto solitario (Sol) (20), y a otros sistemas incluidos la médula espinal (21-27).

Figura 1. Esquema de la fiebre modificado de Dinarello (9).



Cuando el LPS llega al torrente sanguíneo, se une a las proteínas de unión de LPS (LBP) o septinas. El complejo recién formado tiene afinidad para unirse a los receptores CD14 localizados en la superficie de células mioideas como monocitos, macrófagos o neutrófilos (28), esta unión provoca la estimulación de las proteínas kinasas activadoras de mitogénesis (MAPK), que junto con kinasas inducibles (NIK/IKK) en el citoplasma fosforilan la forma inactiva del factor nuclear kappa kinasa (IKB $\alpha$ ). El complejo fosforilado se ubiquitina y degrada por proteosomas citoplasmáticos, dejando libre al factor nuclear kappa kinasa (NF-K $\beta$ ) (29-30). El NF-k $\beta$  libre se transloca al núcleo celular donde se une a la secuencia de su receptor modulando la expresión de diferentes genes en su mayoría proinflamatorios como los responsables de la secuenciación de citocinas, es entonces cuando se liberan a sangre. (Fig. 2)



*Figura 2. Cascada bioquímica desencadenada por la llegada a la célula de sustancias proinflamatorias como citocinas y LPS. El factor nuclear kappa B (NF-kB) esta envuelto en esta respuesta, el p50 y el p65 son dos de sus subunidades con mayor capacidad para producir la transcripción de numerosos genes proinflamatorios.*

*Así, el NF-kB es un factor de transcripción que ayuda a gobernar la expresión de respuestas inmunológicas innatas y adaptativas, y que es necesario para la transcripción de un amplio espectro de mediadores pro-inflamatorios (citocinas pirogénicas) que son importantes en la generación de la respuesta de fase aguda. Dado que estas moléculas pro-inflamatorias están reguladas a nivel de la transcripción, por inferencia, el NF-kB desempeñaría un papel crítico de la respuesta febril.*

*Tras la administración de LPS el eje HPA se estimula 30 min antes de que aparezcan las citocinas en sangre, por tanto, es verdad que los LPS actúan a través de células humorales, pero para la estimulación neuronal, se ha demostrado por diferentes experimentos, que el LPS puede actuar sobre las neuronas sin necesitar la presencia de las citocinas. Recientemente se ha demostrado que el LPS puede actuar directamente sobre los receptores CD14 de células parenquimales y no parenquimales del cerebro. Actuando primero sobre estructuras accesibles desde la sangre como los CVOs, y después durante sepsis severas sobre estructuras centrales (31-34), produciendo la liberación de citocinas en el SNC. Así mismo se piensa que las citocinas actuarían también sobre los receptores CD14 y se comportarían como factores autocrinos y paracrinos moduladores de la acción de los LPS (35-37). En cualquier caso los mecanismos de acción (directa y/o indirecta) del LPS todavía están por clarificar, sobre todo en lo que respecta a su actividad pirogénica.*

#### ***I.3.4. PIRÓGENO ENDÓGENO: CITOCINAS***

*Los PE son polipéptidos producidos por diferentes células, especialmente monocitos y macrófagos en respuesta a una inflamación, infección o trauma; que terminan elevando el "set point" termorregulador del hipotálamo, y que, generalmente provocan un incremento rápido de Tc (12 min) tras su inyección intravenosa. En un principio se pensó que existía un solo PE que procedía de los leucocitos y se llamó pirógeno*

leucocitario (esta proteína es idéntica al IL-1). Actualmente se conocen multitudes de PE, la mayoría citocinas (CC) (38).

El término citocina se usa como nombre genérico para un grupo diverso de proteínas y péptidos solubles que actúan como reguladores humorales en concentraciones de nano a picogramos; modulando funciones de células individuales y de tejidos siempre implicados en el proceso inmune. Varían en tamaño de 8-26 kDa y se sintetizan en diferentes células. A pesar de su diversidad funcional y estructural presentan ciertas características comunes; tales como pleotropismo (pueden actuar sobre distintos tejidos produciendo múltiples efectos biológicos), redundancia (diferentes citocinas poseen la misma acción biológica) sinergismo o antagonismo (la exposición de las células a dos o más citocinas al mismo tiempo puede conducir a respuestas cuantitativamente distintas), entre otras propiedades (39).

Por tanto el concepto "una citocina → una célula diana" no es aplicable a estos péptidos, lo que dificulta su clasificación. Así, la clasificación de CC basada en su actividad biológica parece un poco problemática, sobre todo para aquellos grupos con una definición muy amplia. Por tanto, inicialmente se atendió a una clasificación de acuerdo a su origen celular, más que a una clasificación funcional, a la que posteriormente se le fueron añadiendo nuevas CC, así se dividió en: **Interleucinas (IL)**, producidas por leucocitos (IL-1 a IL-30), **Linfocinas**, sintetizadas por linfocitos (MAF, IMF, MCF, LMIF...), **Monocinas**, inicialmente se dijo que sólo las liberaban los monocitos (GM-CSF, mig, TNF- $\alpha$ , IL-1, 6, 8, 10, 15, 18), **Interferones**, implicados en procesos virales (IFN- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ ), **Factores estimuladores de colonias (CSF)**, facilitan el crecimiento de células en medios semisólidos (de granulocitos: G-CSF y de granulocitos y macrófagos GM-CSF), **Quimiocinas**, implicadas en la quimiotaxis (**CXC-quimiocinas**: IL-8, NAP-2, PF4; y **CC-quimiocinas**: MCP-1 y 3, MIP-1 $\alpha$  y  $\beta$ , RANTES) (38).

Las CC interactúan con el SNC de numerosas maneras. Estas moléculas se expresan en el SNC y juegan un papel importante en la muerte y supervivencia neuronal. Además las citocinas periféricas liberadas frente a la inflamación estimulan una serie de respuestas fisiológicas, neuroendocrinas y de comportamiento a nivel central. A cambio el SNC regula la respuesta inmune mediante diferentes vías

*sistémicas y locales, incluyendo caminos neuroendocrinos, y sistema nervioso autónomo (39, 40).*

*Entre las citocinas que son capaces de inducir una reacción febril destacan los siguientes: interleucina-1 $\alpha$  y  $\beta$  (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) (sólo produce fiebre por vía central), interferón alfa (INF $\alpha$ ), factor de necrosis tumoral o caquectina (TNF $\alpha$ ) y proteína inflamatoria de los macrófagos-1  $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ) (38).*

### ***I.3.5. INTERACCIÓN DE LOS PE CON EL SNC:***

*Una vez que el PE aparece en sangre tiene que llegar al SNC, tarea no fácil, ya que el SNC posee una estructura especializada, específica y única: la BHE. Esta barrera, restringe la migración de células inmunes y la difusión de moléculas solubles desde la sangre al SNC. Aunque la BHE no es el único mecanismo por el que se controla el intercambio de sustancias entre sangre y cerebro, ya que en esta tarea también están implicadas otras barreras como las leptomeninges y el líquido cefalorraquídeo (LCR), la BHE es la estructura más importante que dificulta el paso de moléculas (41, 42).*

*La BHE es una interfase dinámica entre la sangre y el cerebro que protege a neuronas y glia de cambios iónicos y permite la entrada de sustancias necesarias para el metabolismo neuronal mediante una serie de transportadores y receptores específicos, fundamentalmente para hexosas, ácidos monocarboxílicos, aminoácidos y D-glucosa (43-46).*

*El intercambio entre LCR y sangre tiene lugar en los plexos coroideos (pch) que están fenestrados y permiten la ultrafiltración del plasma dejando pasar sustancias solubles que no atraviesan la BHE. Esto también sucede en las membranas aracnoideas. Las células endoteliales de los vasos sanguíneos de los CVOs no poseen "uniones estrechas" y así carecen de BHE. A pesar de ello poseen una barrera para el LCR donde los astrocitos y tanicitos modificados se unen por "uniones estrechas" (47).*

*La BHE está formada por un endotelio microvascular muy especializado que se caracteriza por las "uniones estrechas" que presentan sus células. Las uniones estrechas dependen de dos procesos,*

de la aparición de la proteína de uniones estrechas y de las señales intracelulares que controlan el estado de fosforilación de dichas proteínas. Por tanto, la BHE puede variar en función de los estímulos que reciba (48). A su vez, las células endoteliales están rodeadas por células perivasculares que pertenecen a dos grupos, los pericitos y los astrocitos. Además la BHE también posee una membrana basal (49).

Los pericitos son células perivasculares con capacidad contráctil que se encuentran dentro de la membrana basal de los capilares. Posee tres funciones: contractilidad, regulación de la actividad de las células endoteliales y actividad macrófaga. Varias sustancias están implicadas en estas funciones, algunas de ellas sintetizadas por los propios pericitos, como neuromoduladores, péptidos vasoactivos, factores metabólicos, factores de crecimiento y citocinas. Estas células están emergiendo en la actualidad como una entidad implicada en diferentes procesos fisiológicos: control del flujo sanguíneo, regulación del desarrollo vascular y de la respuesta inmune (50).

Los astrocitos están en contacto físico con la superficie abluminal del endotelio microvascular mediante sus "pies chupadores", contribuyendo estructural y funcionalmente a configurar la BHE. Los pies astrocitarios cubren el 80-95% de la superficie capilar cerebral. Concretamente se sabe que en **condiciones basales** la glia produce factores solubles que restringen la inflamación, induce la formación de uniones estrechas y definen el fenotipo de las células endoteliales, sin afectar a la liberación de factores solubles por parte de las células endoteliales. Sin embargo, frente a la **inflamación**, la glia puede liberar factores solubles que incrementan la permeabilidad de la BHE y promueven la presencia de linfocitos (51). Los astrocitos, además, frente a determinadas agresiones proliferan con cambios morfológicos dando lugar a la astrogliosis que protege a las neuronas (52-54).

Estudios "in vitro" han demostrado que cuando se incuban células endoteliales con LPS se produce un incremento en la permeabilidad de estas células; sin embargo, cuando se hace en presencia de astrocitos no se altera la permeabilidad (55). También se ha demostrado que los astrocitos son capaces de provocar la aparición de "uniones estrechas" en células endoteliales de origen no cerebral (56).

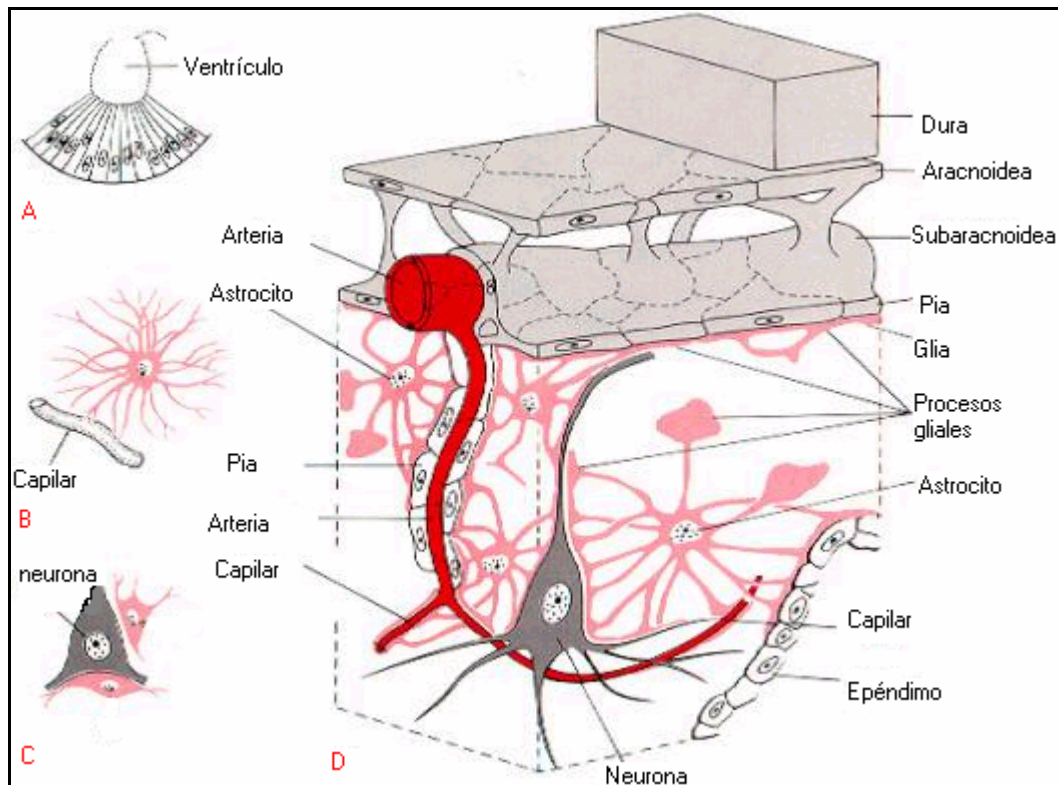
Sin embargo hasta la fecha no se ha esclarecido con exactitud el papel de los astrocitos in vivo con respecto a la BHE. De lo que no hay



duda es de la capacidad de los astrocitos para liberar diferentes tipos de **citocinas** (57) frente a diversas enfermedades (58-60). Con respecto a la administración de LPS, y a pesar de no poseer receptores CD14, en presencia de CD14 solubles, los astrocitos estimulan la liberación de MAPK, erk-1 y 2, p38, lo que provoca la síntesis de citocinas a nivel central (61).

Recientemente también se ha demostrado que los astrocitos son células excitables y que su excitabilidad se basa en variaciones de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , y que esta estimulación puede desencadenarse por la actividad neuronal, lo que demuestra la existencia de una comunicación neurona-astrocito (62).

Las células perivasculares de la BHE están bien situadas para interactuar con los linfocitos T activados y por tanto son de primera importancia para iniciar el proceso inmunológico en el cerebro.



**Figura 3.** Diferente disposición de los astrocitos, A. Disposición radial alrededor de los ventrículos, B. Disposición "pie chupador" en vasos, C. Disposición protectora junto a neurona, D. Disposición "estructural de BHE".

*Si bien es verdad que en determinadas circunstancias (edema cerebral, lesión cerebrovascular, lesión traumática, alteraciones en el entorno extracelular de neuronas y glia, tumores, esclerosis múltiple, respuesta inflamatoria aguda, epilepsia y toxicidad) la BHE se modifica alterando su permeabilidad, las citocinas han encontrado el punto débil de esta maquinaria y han desarrollado su propia estrategia (63).*

*Así, las CC pueden acceder de diferentes modos al SNC (Fig. 4):*

*A. Mediante interacción con las células endoteliales de los CVOs y plexos coroideos, estructuras muy vascularizadas con una BHE muy laxa (64). Esta interacción provoca una respuesta en cascada por parte de la célula, en la que están implicadas diferentes sustancias: MAP, NF-K $\beta$ , jano kinasas (JAK), señales de traducción, activadores de traducción... que terminan liberando sustancias proinflamatorias al cerebro. En esta "descarga" de mensajeros están implicados también los astrocitos (65). Cuando se inyecta sistémicamente LPS, IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  aparece el ARN m de c-fos expresado en células asociadas a microvasos que retrasan la respuesta dentro del parénquima, tanto en células neuronales como gliales. Esto también sucede en CVOs, plexos y meninges. Así VOLT/MPA, SFO, Arc/ME, AP, PB, Sol y VLM pueden contribuir a retrasar la información recibida desde la periferia para estimular el Pa y el HPA. Al Pa llegan PGs producidas por células vasculares que penetran en el hipotálamo endocrino (66). Las citocinas estimulan las células del SNC de un modo no selectivo. Puede ser que la selectividad aparezca porque exista una fina interacción entre la síntesis de factores solubles no parenquimales y la expresión de receptores específicos para estos ligandos en elementos parenquimales de diferentes núcleos.*

*B. Haciendo uso de transportadores específicos, aunque de forma limitada (67-69).*

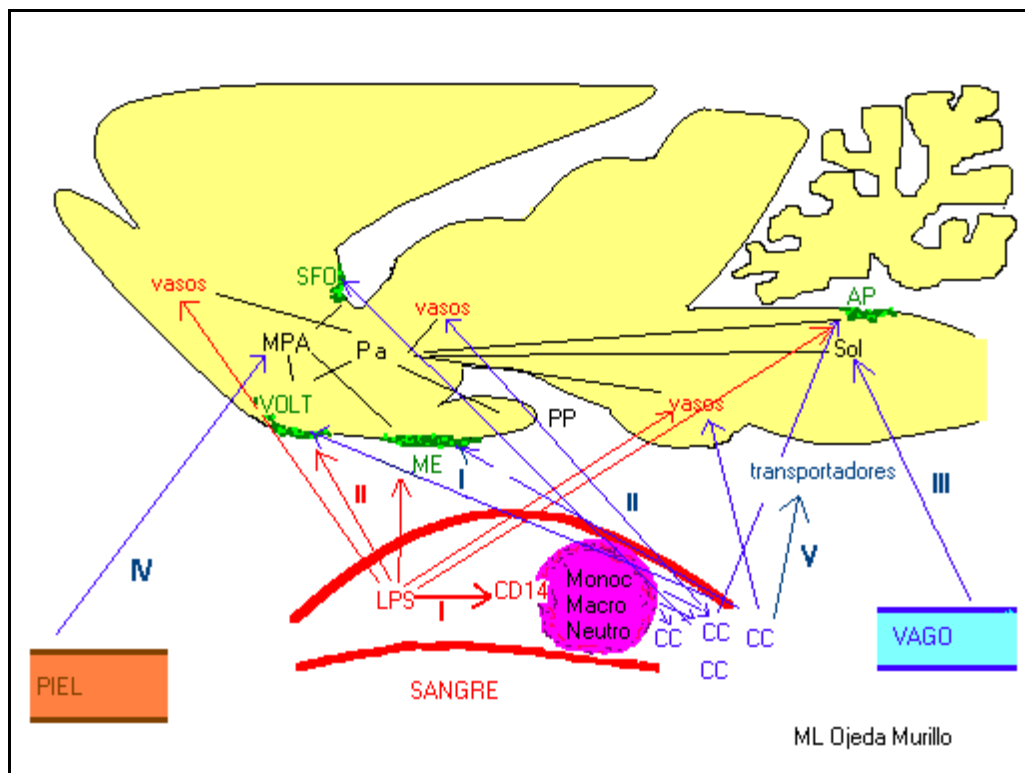
*C. A través de sitios de la BHE donde la permeabilidad está incrementada por cualquier causa (70).*

*D. Por la activación de mecanismos neurales. Se sabe que el transporte humoral no es el único que siguen las citocinas para llegar al cerebro. En los últimos años se han publicado muchos trabajos que indican que nervios vegetativos, concretamente las aferencias vagales participan en dicho transporte (71). Si bien es cierto que esta participación está limitada por*

el modo de administración del LPS y su dosis. Así la vagotomía puede disminuir la fiebre inducida por LPS, si éste se inyecta intraperitonealmente a bajas dosis, a dosis altas o moderadas, la vagotomía no presenta significación (66). En cualquier caso el Sol está implicado como detector de citocinas (72).

**E.** Mediante los nervios cutáneos, pues se ha demostrado que éstos pueden representar una ruta neural para las citocinas en su camino hacia el cerebro, concretamente se ha comprobado que la IL-1 puede provocar fiebre vía piel-cerebro, no así el TNF (73- 75).

**F.** Finalmente, 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 éstas en la periferia ante situaciones adversas, tales como las infecciones (76).



**Figura 4.** Diferentes rutas de acceso hacia el SNC de citocinas (CC) (I- V) y LPS (I-II). SFO: órgano subfornical, VOLT: lamina terminalis, ME: eminencia media, AP: área postrema, MPA: área preóptica anterior del hipotálamo, Pa: núcleo paraventricular, PP: hipófisis posterior, Sol: núcleo del tracto solitario.

*La síntesis de PGs a nivel central se considera el paso final de la génesis de la fiebre (77), y son precisamente los PE los que provocan la síntesis de PGE<sub>2</sub> en las zonas termorreguladoras. Por ello, se considera la IL-1 $\beta$  como el PE más importante que media el paso inicial en la inducción de fiebre, pues consigue inducir el ARNm de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) diez veces más que cualquier otro PE. La COX-2 activa a las fosfolipasas que liberan ácido araquidónico con la consiguiente síntesis de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) por las células endoteliales de los vasos cerebrales próximos al área hipotalámica termorreguladora (PO/HA, VOLT, Pa), ventrículos laterales, hipocampo dorsal (78) y astrocitos (79).*

*Sin embargo, otros PE como el MIP-1 $\beta$  actuarían a través de un mecanismo alternativo independiente de la síntesis de PGs, ya que se ha demostrado que el pretratamiento con inhibidores no selectivos (COX-1 y COX-2) de la síntesis de PGs, tales como la indometacina y el ibuprofen, y con inhibidores selectivo de la COX-2 como los glucocorticoides, no disminuye la fiebre originada por MIP-1 $\beta$  (80). Lo que explica, al menos en parte diferentes situaciones en donde la fiebre es resistente al tratamiento con antipiréticos tales como los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) o los glucocorticoides.*

*Teniendo en cuenta que los PE son producto de distintos genes, sintetizados y liberados tanto periféricamente desde los macrófagos y otros leucocitos, como desde el SNC por células gliales y neuronas; podemos concluir que la fiebre parece ser el resultado de mecanismos complejos en los que podrían estar implicados distintos PE, dependiendo de la causa que la originó (81, 82). Lo cual complica aún más el desarrollo de una teoría general que recopile todas las posibilidades.*

### **I.3.6. PROSTAGLANDINAS:**

*La acción de la PGE<sub>2</sub> está mediada por sus 7 receptores transmembrana, divididos en 4 grupos: EP1, EP2, EP3, EP4.*

*Se piensa que los receptores EP3 son los implicados en la respuesta febril frente a pirógenos exógenos o endógenos (83). Se han identificado 3 isoformas del EP3 (EP3 $\alpha$ , EP3 $\beta$  y EP3 $\delta$ ). Estudios de hibridación in situ*

*localizaron los EP3 en neuronas de numerosas regiones del cerebro de rata, incluyendo el área ventral septal (AVS), el Sol, la médula ventrolateral (MVL) y numerosas áreas y núcleos hipotalámicos (84-87).*

***Resumiendo**, cada vez resulta más evidente la existencia de una interconexión funcional entre el sistema inmunológico y el SNC en la inducción y regulación de la respuesta febril. Esta relación conlleva a múltiples interacciones entre mediadores solubles (citocinas, hormonas, neuropéptidos), y señales nerviosas tanto aferentes como eferentes.*

*En la fiebre, la respuesta **humoral** depende de los **PE**, ya que sus niveles sanguíneos coinciden con la respuesta febril, su neutralización en sangre provoca una disminución de ésta, y su administración exógena provoca fiebres de patrón y duración parecida a las provocadas por estímulos infecciosos o inflamatorios.*

*En los procesos febriles la respuesta **nerviosa** depende del **vago**, que recoge información periférica y la comunica al Sol, éste a su vez la comunica a las partes del cerebro involucradas en la respuesta a la inflamación e infección, y por los **nervios cutáneos**.*

*Analizando todo lo comentado anteriormente es comprensible pensar que la fiebre inducida por cada PE presente características diferentes (latencia, duración, intensidad...); por lo que se refuerza la hipótesis de que cada PE actúa mediante mecanismos distintos, posiblemente por unión a receptores específicos, e induciendo una respuesta febril acorde con el estado inmunológico del organismo y el agente casual implicado en el proceso. Lo cual nos lleva a un mecanismo de producción de fiebre complejo y difícil de dilucidar.*

*Esta situación se asemeja bastante a la del cuento indio del "Síndrome del elefante" (Fig. 5), en el que seis ciegos creen poseer la verdad absoluta a partir de una mínima porción de la realidad.*

*El "Síndrome del elefante" describe la actitud de seis ciegos que se encuentran frente a un elefante. Cada uno de ellos percibe la realidad (el elefante) de un modo distinto:*

*- El primero de ellos toca la trompa y afirma "Lo tengo, colegas, estamos frente a una serpiente".*

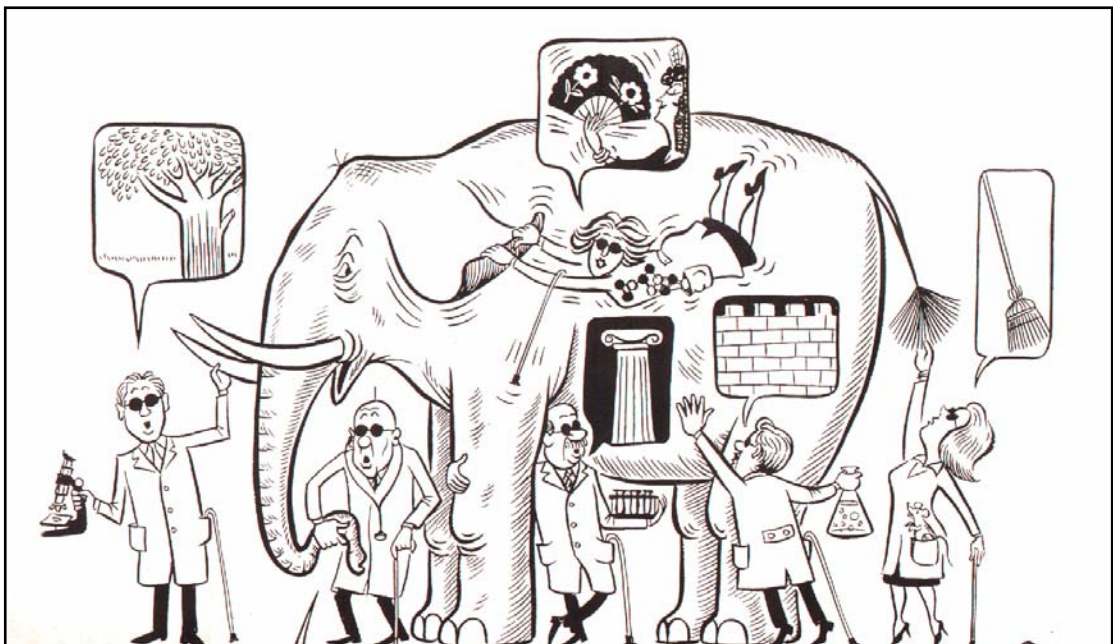
*- El segundo toca un colmillo y concluye "Compañeros, definitivamente esta estructura es el tronco de un árbol frondoso".*

*- El tercero palpa la oreja y tras las pruebas pertinentes decide "Esto es un abanico típico de las regiones del sur de España".*

*- El cuarto analiza la cola y dice "No hay duda, estos filamentos pertenecen simple y llanamente a una escoba".*

*- El quinto muy seguro de sí mismo toca el lomo del animal y exclama "Estoy frente a la pared de un castillo medieval".*

*- Por último, el sexto, con cierto espíritu artístico, al tocar la pata del animal, afirma "¡Que maravilla! Estoy junto a una columna griega".*



*Figura 5. "Síndrome del elefante" (Ann N Y Acad Sci. Vol. 766. New York; 1995. p. xiv.).*

#### **I. 4. MARCADORES DE INFLAMACIÓN**

*Aunque la fiebre no constituye el único signo presente en los procesos infecciosos, es probablemente el signo más 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 huésped 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 PE, como la IL-6 y el TNF, y otros marcadores inflamatorios como la procalcitonina (PCT), la proteína C reactiva (PCR), la neopterinina, la elastasa y la fosfolipasa A2 (PLA2).*

*Cada uno de estos parámetros tienen un perfil de inducción específico y características propias frente a las distintas enfermedades. Por ello los analizaremos uno a uno.*

##### **I. 4. 1. PROTEÍNA C REACTIVA (PCR).**

*Entre todas las moléculas liberadas en la inflamación, la PCR desempeña un papel esencial en la eliminación de gérmenes patógenos o de células necróticas a través de la activación del complemento, adherencia de fagocitos y activación de la síntesis y liberación de citocinas.*

*Los valores séricos de la PCR tras la administración de endotoxina iv a una dosis de 4mg/kg se caracterizan por una leve disminución a las 2 horas y un aumento progresivo de sus valores que alcanzan su valor máximo alrededor de las 30h y se mantiene en el tiempo (88). (Fig. 6)*

*La PCR se produce en el hígado durante varios días, incluso después de haber desaparecido el estímulo inflamatorio. Esta cinética*

*sitúa a la PCR como un buen marcador de la respuesta inflamatoria frente a bacteriemias gram negativas por su larga vida media, pero presenta la desventaja de que su incremento es bastante lento y no muy específico, lo que dificulta el diagnóstico del proceso inflamatorio, además de descartarla como marcador de la fase aguda. Es pues, un marcador muy sensible y poco específico.*

*Aunque se han descrito diferencias en los niveles de PCR entre pacientes febriles con o sin bacteriemia, dichas diferencias no parecen ser consistentes (89). Sin embargo, existen otros datos contradictorios, pues, parece no ser indispensable en la respuesta febril, ya que se han observado niveles plasmáticos normales en pacientes febriles, y elevados en pacientes sin fiebre.*

#### **I. 4. 2. CITOCINAS.**

*Es conocido que estas moléculas son los principales mediadores de la fiebre, de hecho forman parte de los PE, además de ser esenciales para desencadenar una buena respuesta inmune.*

*La vida media y estabilidad de la mayoría de las citocinas son relativamente cortas, ya que tienen que inducir en poco tiempo el cambio inmunológico necesario para la defensa del huésped. Valores altos y rápidos, aparecen y desaparecen en sangre frente al estímulo externo. Así, lo que es una ventaja para hacer frente a la agresión, se convierte en desventaja para los clínicos que quieran usarlas como marcadores. Precisamente esas son los inconvenientes que presentan las dos citocinas más usadas como marcadores inflamatorios, el TNF- $\alpha$  y la IL-6 (88). (Fig. 6)*

*Además no parece existir una diferencia significativa para discernir entre una bacteriemia por gérmenes Gram (-) de la producida por Gram (+). Son marcadores poco específicos y de corta vida media.*

#### **I. 4. 3. FOSFOLIPASA A2 (PLA2).**

*La PLA2 es una enzima que rompe las uniones fosfolípido-ácido-araquídico. La PLA2 libera al ácido araquídico de las membranas*



*fosfolipídicas, lo que desencadena la síntesis de eicosanoides, y con ellos el inicio de la respuesta inflamatoria. Los LPS estimulan la actividad de la PLA2 en sangre. Por tanto la enzima está inducida primariamente por LPS, pero también se activa frente a los virus. Lo que indica que no es un marcador específico.*

#### **I. 4. 4. ELASTASA.**

*Es una serin proteasa derivada de los granulocitos que puede romper varias proteínas plasmáticas. Aunque se han encontrado valores elevados de elastasa en sangre de pacientes con sepsis y se ha correlacionado con el grado de mortalidad, sin embargo es un marcador poco específico.*

#### **I. 4. 5. NEOPTERINA.**

*La neopterina es un producto de la degradación del trifosfato de guanosina y se produce principalmente por los monocitos estimulados por el IFN- $\delta$ . También es un marcador indirecto de la actividad citotóxica de los linfocitos T. Los valores de neopterina siguen un patrón parecido a los de la PCT, pero es mucho mas inespecífica que ésta frente a bacteriemias Gram (-).*

*Actualmente se usa como el indicador mas sensible frente a la activación de monocitos y linfocitos. En infecciones virales y por VIH, la neopterina es un indicador, mejor incluso, que los test serológicos, por lo que se utiliza como un parámetro de screening frente a donantes de sangre.*

#### **I. 4. 6. PROCALCITONINA (PCT).**

*La PCT es un pro-péptido de la calcitonina cuyo papel en la respuesta inflamatoria aún no ha sido definido, tampoco se conoce si guarda relación o no con la respuesta febril. Sin embargo está demostrado que los valores séricos de PCT aumentan drásticamente en pacientes con infecciones bacterianas y sepsis; y no se encuentran, o están levemente elevados, en infecciones víricas y enfermedades autoinmunes.*

*Sus características farmacocinéticas frente a la administración de endotoxina, le otorgan a este péptido unos valores como marcador clínico frente a bacteriemias Gram (-) muy halagadores, pues presenta un incremento inicial muy rápido y marcado (fácilmente detectable) y una vida media lo suficientemente larga para ser un marcador fiable (90, 91). (Fig. 6)*

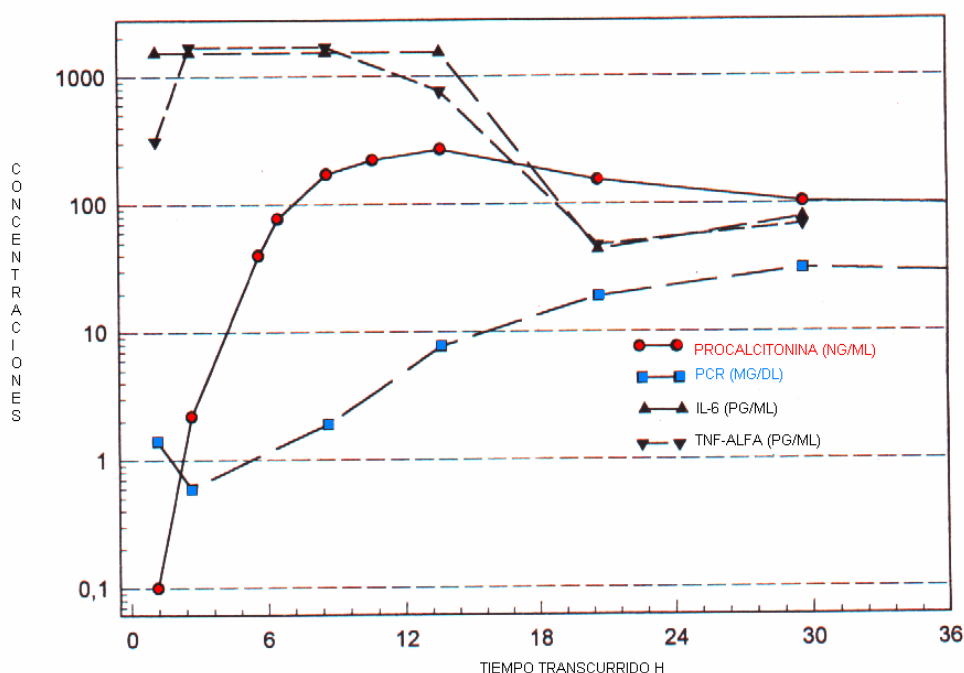
*Además sus niveles en sangre son proporcionales al grado de respuesta inflamatoria y disminuyen claramente cuando finaliza la inflamación, lo que permite usarla como un marcador del transcurso de la enfermedad, esto es, de su severidad, de su pronóstico y del éxito de la terapia elegida (90, 91).*

*El estudio de los niveles de PCT para predecir la causa de fiebre "inexplicada" o "de origen desconocido" frente a la que se presenta tras una infección puede ser de gran utilidad diagnóstica, dado que los niveles de PCT no parecen aumentar en fiebres de origen no bacteriano. Más aún, 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. Su eficacia 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- $\alpha$  (92-95).*

*En resumen, el perfil farmacocinético de la PCT se ajusta al de un buen marcador, es muy estable, y sus valores se correlacionan con la severidad de la infección, su curso y mortalidad. De hecho su uso se ha extendido en Europa, y está próxima su aprobación por la Food and Drug Administration (FDA) para su uso en EE.UU.*

#### **I.4.7. OTROS PARÁMETROS.**

*El conteo de leucocitos, la velocidad de sedimentación de eritrocitos y el incremento de temperatura son otros indicadores de la actividad inflamatoria. Estos parámetros son muy sensibles pero poco específicos. Su valor diagnóstico en medicina intensiva y cirugía a menudo está limitado*



**Figura 6.** Cinética de algunos de los marcadores anteriormente citados tras la administración i.v. de endotoxina a una dosis de 4mg/kg (88).

**Tabla 1:** Sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos de diferentes marcadores frente a sepsis (96).

Parámetros	PCR	TNF- $\alpha$	IL-2	IL-6	IL-8	PCT
Sensibilidad (%)	58	55	63	51	68	85
Especificidad (%)	58	66	55	53	57	91
Valor negativo predictivo (%)	68	65	65	56	69	95
Valor positivo predictivo (%)	53	54	50	42	53	89

Los resultados obtenidos del análisis de todos estos marcadores inflamatorios supondrían un avance no sólo en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento específico en pacientes con infección de etiología desconocida, sino en el conocimiento de la patogénesis de la fiebre. Concretamente hay mucho que decir del papel que juega la PCT en la

*inflamación y en la fiebre ya que la PCT proporciona información sobre el transcurso de la enfermedad, su severidad, pronóstico y el éxito de la terapia elegida (97, 98). Así la detección de PCT abre un campo tremendo en la investigación clínica, pero ¿Qué es la PCT, cuál es su papel fisiológico y fisiopatológico, cuándo, cómo y dónde se sintetiza, por qué se comporta como un marcador? Muchos investigadores han trabajado y trabajan sobre dichos aspectos pero aún hay mucho que aclarar.*

## **I.5. PROCALCITONINA, MARCADOR o MEDIADOR**

### **I.5.1. MARCO HISTÓRICO:**

*La procalcitonina (PCT), descubierta hace 25 años por ser el péptido de la hormona calcitonina (CT), salta a la palestra del mundo científico en 1989 (99). Es en el Instituto G. Roussy cuando en la búsqueda de nuevos marcadores tumorales, se usa la CT como marcador eficaz de los tumores tiroideos, para afinar las propiedades de dicha hormona se trabaja con anticuerpos monoclonales de CT, y de entre toda la batería encontrada aparece un anticuerpo de PCT. En la aplicación de estos marcadores vieron que la PCT aumentaba en tumores de tiroides y de pulmón. Pero no será esto lo que marque la trayectoria investigadora de la PCT.*

*Meses antes de la guerra del Golfo (1991) un grupo de físicos de la armada francesa se interesaron por marcadores del daño pulmonar para paliar los efectos dañinos provocados por la inhalación de gases tóxicos, entre todas las sustancias elegidas aparece la PCT. Así se vió, que en algunos de estos pacientes (la mayoría quemados y traumatizados) los niveles de PCT en sangre eran mayores incluso que los que presentaban individuos con tumores pulmonares. La característica común de casi todos radicaba en una sepsis severa y/o shock séptico (100). A partir de este momento surgieron diferentes estudios para verificar la relación entre PCT y sepsis. Es en 1993 cuando Assicot y col (101) encuentran valores elevados de PCT (y no de CT) en suero de pacientes con infección bacteriana.*

*Especialmente clarificador fue el estudio del profesor Dandona en 1994, que administró un bolus de endotoxina (4ng/kg) a voluntarios sanos, a los que posteriormente les midió los niveles séricos de PCT y diferentes*

*citocinas a diversos intervalos. La PCT apareció a las 3h, alcanzó su meseta a las 6h, y se mantuvo a estos niveles hasta las 24h (102) (Fig. 7). A partir de ahí, un gran número de investigadores valoraron los niveles séricos de PCT en diferentes modelos. Así también se han encontrado valores séricos elevados en pacientes con trauma (103), quemaduras (104, 105), sometidos a cirugía (106), con shock cardiogénico (107, 108), pancreatitis (109, 110), neumonía bacteriana (107, 111), meningitis (93, 112, 113), sepsis (114, 115), shock séptico (107), endotoxemia (102), neutropenia (116), infecciones fúngicas (117, 118), malaria (119, 120), daño hipóxico cerebral (121), politraumatismos (122) y en recién nacidos durante su primer día de vida (123). Sin embargo no se encuentra, o está poco elevada en infección vírica (112, 124), enfermedades autoinmunes (125) o neoplasias (126-128).*

*Muchas investigaciones señalan a la PCT como un marcador de infección en situación de diagnóstico difícil (cuando otros marcadores tradicionales fallan), que permite diferenciar entre inflamación grave e infección. Es de especial interés la medición de PCT en : 1) inflamación , para ver si existe infección bacteriana o no, 2) infección, para diferenciar una etiología bacteriana o vírica, 3) infección bacteriana, para controlar la terapia elegida, 4) infección bacteriana, para ver la evolución del proceso, 5) la detección y pronóstico de sobreinfección.*

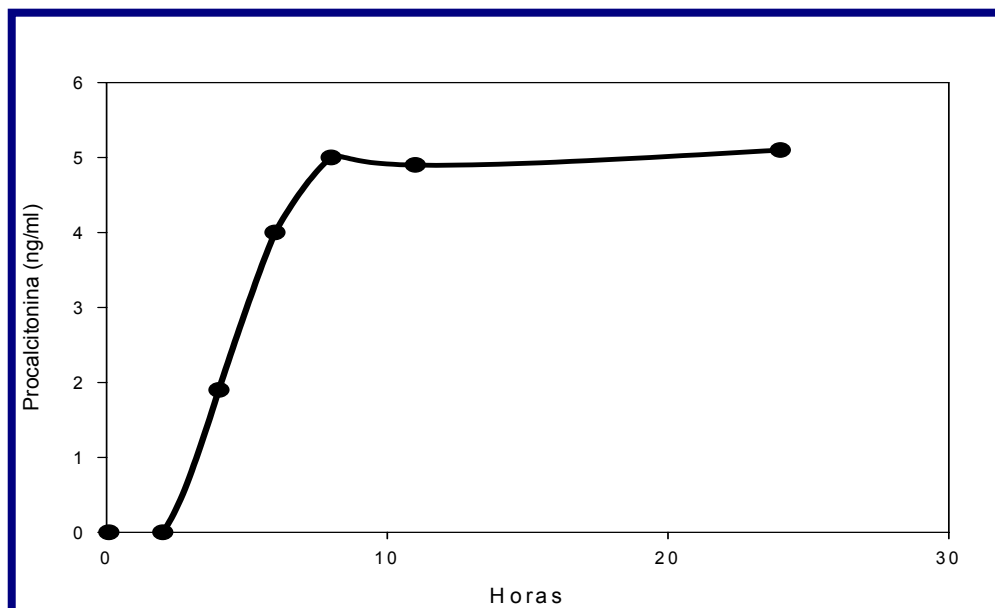


Figura 7. Concentraciones de procalcitonina tras la inyección de endotoxina. Tomada de Dandona et al (102).

### I.5.2 ¿QUÉ ES LA PCT?

Estructuralmente la PCT es un propeptido glicopeptídico de 116 aminoácidos codificado por el gen *Calc-1*, cuyo peso molecular es de 12793 Da (129). (Fig. 8)

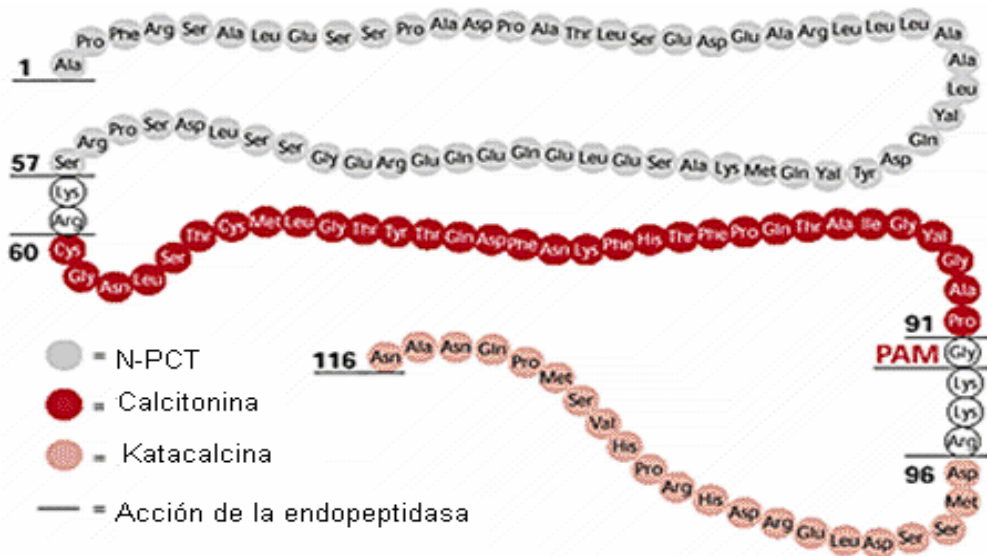
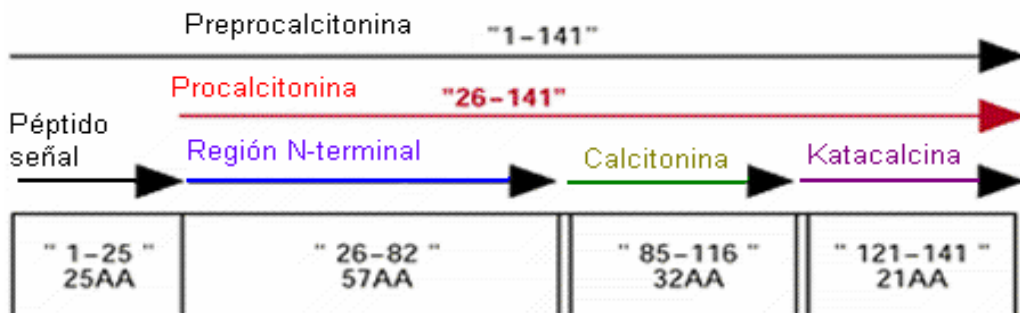


Figura 8. Estructura aminoacídica de la molécula de PCT (90).

A su vez la PCT se encuentra dentro del propeptido preprocalcitonina (141 aa). La PCT es el precursor de la hormona hipocalcemiante CT. Dentro de este polipéptido la secuencia de aminoácidos que codifica a la CT se sitúa en la posición 60 a 91. Esta secuencia está flanqueada por aa polibásicos, señales para la proteólisis específica de la enzima prohormona convertasa (PC), que da lugar a la N-PCT (57aa), la CT (32aa), la katalcalcina (21aa) y sus combinaciones.



**Figura 9.** Estructura de la PCT comparada con la preprocalcitonina, la calcitonina y la katalcalcina (90).

*La proteólisis de la PCT se lleva a cabo en el aparato de Golgi (130), esta actividad se suprime por la acción de las citocinas y endotoxinas, por ello la PCT permanece en sangre durante procesos infecciosos. Así mismo la transcripción del ARNm de PCT se aumenta por los estímulos inflamatorios (131), y al contrario que la CT (cuya vida media es de pocos minutos), la PCT es muy estable en sangre. Además la excreción renal de PCT juega un papel poco importante ya que los datos clínicos demuestran que la PCT no se acumula en casos de fallo renal (132), recayendo todo el peso de su eliminación sobre el metabolismo.*

*Estos cambios en el metabolismo de la PCT frente a procesos infecciosos, han complicado la comprensión de esta molécula, que ha pasado cronológicamente por distintas denominaciones, acorde con los conocimientos adquiridos, pasando por: PCT prehormona de CT, marcador de cáncer medular de tiroides (99), marcador de infección bacteriana (101), proteína segregada ante estímulos infecciosos (133), mediador y marcador de inflamación relacionado con citocinas (134), proteína de fase aguda (135-137) y recientemente **hormocina** (97, 98).*

### **I.5.3. INDUCCIÓN Y SÍNTESIS DE PCT:**

*La PCT pertenece a un grupo de proteínas relacionadas entre sí, como son los péptidos relacionados con la CT (CGRP I y II), la amilina, la adrenomedulina, y la CT y sus precursores, a este conjunto de proteínas se las conoce como la "familia de las proteínas CAPA" (138, 139). El ARNm de la PCT se sintetiza por el gen Calc-I durante la sepsis y la inflamación, no se conoce ningún otro gen productor de PCT durante estado de inflamación. Este ARNm se detecta en diferentes tejidos humanos (principalmente en el hígado, pero también en pulmón, riñón y testículos (140)) aunque solo una débil cantidad de Calc-I se transcribe extratiroideamente en ausencia de infección. Así los niveles plasmáticos de PCT en individuos sanos son muy bajos, normalmente no alcanzan los 0.05ng/ml. En hamsters se ha detectado la presencia de dicho ARNm en los pulmones de animales controles y en todos los tejidos de animales que*

*sufrieron sepsis, aunque el grado de expresión varió en los distintos órganos (141). Algo parecido sucedió en monos, que tras la administración de LPS, y mediante una técnica ILMA modificada, presentaron valores significativos de PCT en pulmón, riñón, hígado, páncreas, colon, aorta, grasas, ovarios, vejiga y glandula adrenal (142). También en monos, se encontró, la expresión de ARNm CT en pulmón, hígado, riñón, médula adrenal, colon, piel, bazo, cerebro y páncreas (142). Así, bajo circunstancias de sepsis el organismo entero se comporta como una glándula endocrina.*

*Recientemente la baja presencia de PCT en sangre de monos tratados quirúrgicamente para extraerles el hígado junto con una administración intravenosa de endotoxina, confirman que el hígado es la principal fuente de producción de PCT durante el shock séptico (143).*

*La expresión de ARNm de PCT está más regulada que las de citocinas. La mayor síntesis de PCT por las células parenquimales que por las circulantes, indican una base de producción tisular. Así se llega a la idea de que la PCT es un prototipo de **hormocina** mediadora que puede seguir un mecanismo de expresión hormonal clásico o un camino de expresión parecido al de las citocinas (98, 144).*

*Durante la sepsis, el eje hipotalámico-hipofisario-adrenérgico se ve estimulado tras la administración de LPS. La expresión de ARNm de CT se eleva significativamente a las 6h en este eje (145), lo que indicaría que la hipófisis está implicada en el incremento de los valores séricos de PCT en sepsis.*

*La presencia de PCT en los diferentes líquidos corporales se ha estudiado en varias ocasiones, encontrándose tan sólo en líquidos ascíticos valores significativos (146). Se han detectado valores elevados de PCT en leche humana de madres sanas, pero no de CT (147). También se ha detectado PCT en el plasma seminal de hombres normales y con problemas de fertilidad (148), sin existir diferencias significativas entre ambos grupos. En cuanto al LCR, se ha detectado la presencia de PCT en LCR de adultos (149) y niños con meningitis (150), y en el LCR de niños con traumas craneoencefálicos (151).*

*El mecanismo de inducción por excelencia de la síntesis de PCT "in vivo" es la inyección de endotoxinas bacterianas (102). Estudios in vitro*



de detección de ARNm mediante técnicas de PCR usando cultivos celulares o células sanguíneas corroboran dichos resultados (152). Por orden decreciente el TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-2 y fitohemaglutinina, también estimulan la producción de ARNm de PCT en células sanguíneas mononucleares periféricas (153).

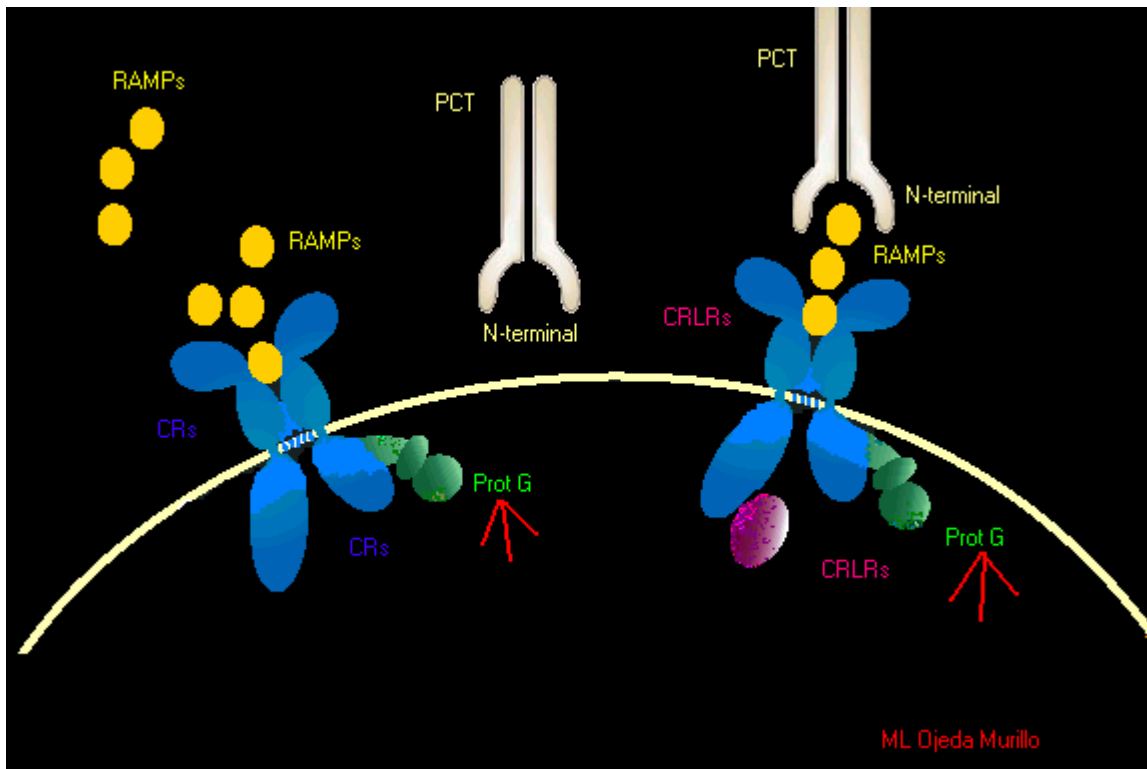
#### **I.5.4. MECANISMO DE ACCIÓN:**

Como la actividad biológica de la PCT se desconoce no podemos definir las estructuras necesarias para constituir una molécula activa. Se sabe que el extremo N-terminal de la CT es fundamental para unirse al receptor, y que las CT truncadas pueden funcionar incluso como antagonistas (154). Existen dos subgrupos de receptores para la familia de proteínas relacionadas con la CT, los receptores de CT (CRs) y los receptores parecidos a los receptores de CT (CRLRs).

Estos receptores pertenecen a la subfamilia de siete dominios de transmembrana "receptor nucleótido unido a proteína G" (GPCRs), que incluye a los receptores de secretina, hormona paratiroidea, glucagón, péptido vasoactivo intestinal y hormona liberadora de hormona de crecimiento. La estimulación de los CRs producen el acoplamiento de varias proteínas G que estimulan la adenil ciclasa y la fosfolipasa C (155). Cada miembro de la familia se une con diferente afinidad a cada tipo de receptor.

Para complicar aún más la situación existen unas proteínas accesorias llamadas proteínas modificadoras de la actividad de los receptores (RAMPs) que alteran el fenotipo del receptor (156). La presencia y concentración (sujeta a las influencias humorales) de dichas proteínas favorecerá la unión o no, de los diferentes miembros de la familia, según las necesidades ambientales. Así tanto en la salud como en la enfermedad, este sistema tan sofisticado dará lugar a una respuesta u otra (157).

Para visualizar este complejo mecanismo es conveniente remitirse a la figura 10.



**Figura 10.** Modelo hipotético del mecanismo de acción de la PCT. PCT: procalcitonina, N-terminal: fracción N-terminal de la PCT, RAMPs: proteínas modificadoras de la actividad de los receptores, CRs: receptores de calcitonina y CRLRs: receptores parecidos a los receptores de calcitonina.

La PCT puede sufrir además una desaminación perdiendo los dos aminoácidos N-terminales (Ala-Pro) por la enzima dipeptidil peptidasa IV (DP IV) o CD26 apareciendo en sepsis como PCT truncada (3-116) (158). La DP IV es una glicoproteína de 110 kDa que cataliza la liberación de dipéptidos N-terminal de oligo y polipéptidos preferentemente con prolina, hidroxiprolina o alanina en la penúltima posición. Concretamente la posición penúltima de la prolina se encuentra en muchos péptidos originados por el sistema neuroendocrino, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y trombopoyetina. Este residuo de prolina protege a dichos péptidos de la degradación inespecífica por parte de aminopeptidasas. La DP IV se encuentra soluble en el plasma sanguíneo y en la superficie de células epiteliales, renales, endoteliales y hematopoyéticas, especialmente en linfocitos T, y está inducida por mediadores proinflamatorios y endotoxinas (159). Aunque la acción de dicha enzima sobre la PCT es lenta (135 pmol/h) debido a la gran longitud de la molécula, hay gran cantidad de la enzima en pacientes con sepsis

*severas, que dan lugar a grandes cantidades de PCT (3-116) en plasma, aunque en ocasiones severas, como la enzima tiene muchos sustratos inflamatorios durante la sepsis, existe grandes cantidades de PCT (1-116) y (3-116) (160, 97). Esta pérdida de sus dos aminoácidos N-terminales hace que la PCT tenga menor poder de activación de los receptores, mientras que incrementa su afinidad por el receptor, manteniéndose así más tiempo unida a éste.*

*La PCT y la CT poseen un sitio de glicosilación de 5aa (sobre el que actúa la PC), situado entre los dos residuos de cisteína de la posición 60 y 66 de la PCT, y, 1 y 7 de la CT. Este sitio tiene capacidad para unirse covalentemente por un puente disulfuro. Pero la PC no actúa sobre la PCT en procesos sépticos o infecciosos.*

#### **I.5.5. ACTIVIDADES FISIOLÓGICAS Y FISIOPATOLÓGICAS:**

*Al día de hoy, todavía se especula sobre el papel biológico que juega la PCT en individuos tanto sanos como afectados por infecciones bacterianas. Varias son las acciones (Fig. 11) que se le achacan a la molécula:*

*1) La PCT es la precursora de la hormona hipocalcemiante CT. En pacientes con infección y sepsis se encuentran a menudo valores aumentados de PCT en sangre (pero no de CT) junto con hipocalcemia. Además la hipocalcemia es proporcional al incremento de infección y es paralela a los valores de PCT en sangre (161). Sin embargo los valores de CT se mantienen normales o minimamente elevados en sepsis (101, 114, 160). A pesar de que la PCT es parcialmente reactiva con los receptores de CT, no se le conoce papel como reguladora del metabolismo del calcio en hueso. Cuando la N-PCT se pone en contacto con los osteoblastos y preostoblastos clonados de rata, ninguna de las células sufre cambios ni en su fenotipo ni en sus factores de crecimiento (162). La relación directa entre PCT y la hipocalcemia por ahora se mantiene desconocida.*

*2) Dandona y col (102) demostraron por primera vez que tras la administración de endotoxina bacteriana (2ng/kg) en individuos sanos voluntarios, existía un incremento inicial de TNF- $\alpha$  e IL-6 seguido por un aumento mantenido de los niveles de PCT (Fig. 7). En principio se pensó que el incremento de PCT se estimulaba directamente por la endotoxina,*

*pero anecdóticamente se vio que al administrar IL-2 a pacientes con cáncer renal se incrementaban los valores de PCT, TNF- $\alpha$  e IL-6, sugiriendo que las citocinas podían producir PCT independientemente de la endotoxina (163). Nijsten and cols (135) demostraron por primera vez que tanto in vivo como in vitro, la IL-6 y el TNF- $\alpha$  incrementan los valores de PCT directa o indirectamente. Existen varios trabajos que inciden en la relación existente entre la PCT y las citocinas y sus mutuas activaciones e inhibiciones (136), como veremos mas adelante, pero estos valores "in vivo" carecen de significado. En general los resultados obtenidos indican que la PCT puede ser un mediador secundario que incrementa o amplifica, más que inicia la respuesta séptica (131, 165, 166).*

**3)** *Se ha observado que en cultivos de células musculares, valores moderados de PCT suprimen la acción estimuladora del TNF- $\alpha$  y del IFN- $\delta$  sobre la producción de ácido dexosirribonucleico para sintetizar la enzima inducible de la oxido nítrico sintetasa (iNOS) (167). Así la PCT regularía la gran producción de NO que existe durante la sepsis, disminuyendo la hipotensión que sufren los pacientes con sepsis y shock séptico.*

**4)** *La PCT juega cierto papel inmunológico ya que se une a los receptores de CT localizados en los linfocitos B y T (168), que estimulan la fosfatidilcolin fosfolipasa específica C (PC-PLC), enzima llave en la activación del proceso inflamatorio (169).*

**5)** *La PCT contribuye en gran medida a deteriorar los efectos de la infección sistémica. La administración de PCT a hamsters sépticos dobla el rango de muerte provocado por la infección, llegando incluso al 90%, y el tratamiento con anticuerpo anti-PCT en cerdos sépticos, mejora la fisiopatología y los parámetros metabólicos incrementando su supervivencia hasta un 80% (170, 171). Además experimentos recientes han demostrado que tal inmunoneutralización es incluso efectiva cuando se administra en animales moribundos. Durante la sepsis la PCT juega un papel potencial como mediador dañino envuelto en la respuesta séptica (172-174).*

**6)** *Recientemente se ha descrito a los péptidos de esta familia: CGRP, N-PCT, PCT... como una familia antiinflamatoria, que actúa suprimiendo la propagación de la inflamación mediante la inhibición de diferentes*

procesos involucrados durante la respuesta a estímulos bacterianos. Concretamente la PCT disminuye de modo dosis-dependiente la expresión de CD11b (una de las mayores integrinas envueltas en la quimiotaxis de monocitos y neutrófilos durante procesos infecciosos) por parte de los LPS. Esto lo hace supuestamente a través de un mecanismo en el que está involucrado el AMPc (175). Sin embargo no se ha encontrado ningún efecto de la PCT sobre la expresión de los receptores inflamatorios: CD14, CD54, CD64, CD80 y CD86 en leucocitos (176).

Sea como fuere, en las distintas hipótesis la PCT juega un papel crítico como mediador de infecciones sistémicas, y posiblemente influya en la microcirculación y en la vasomotilidad. Su facilidad de medición y su larga vida media en suero de pacientes con sepsis, indican que su inmunoneutralización es posible tanto al inicio como al final del curso de la enfermedad. Recientemente se demostró que esta terapia es efectiva incluso en animales moribundos. Es necesario por tanto avanzar en el conocimiento de las acciones biológicas que ejerce la PCT durante la sepsis, para así abrir nuevos campos en la terapéutica frente a esta enfermedad en humanos.

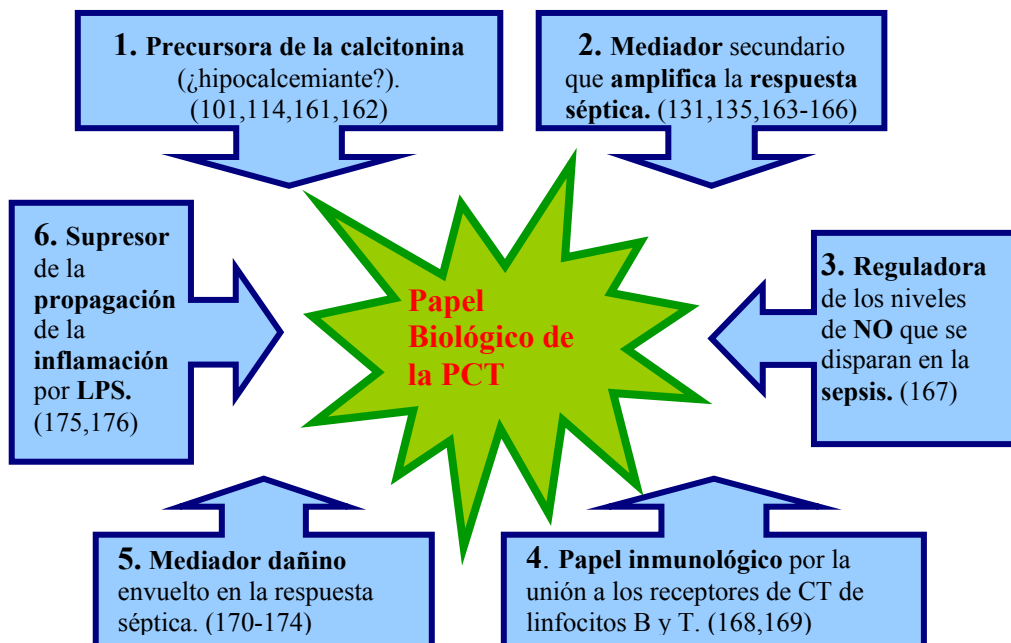


Figura 11. Papel biológico de la procalcitonina.

### **I.5.6. NIVELES PLASMÁTICOS DE PCT**

*La PCT es una molécula muy estable tanto "in vitro" como "in vivo", ya que presenta una vida media de 24-30h, mucho mayor que la mayoría de las citocinas que se usan como marcadores de inflamación, las cuales tienen una vida media máxima de 2 h. Además durante la infección se mantiene intacta, por diversos mecanismos que se activan durante la inflamación como explicamos anteriormente. Así, no se transforma en CT ni en sangre, ni en plasma, ni en suero a temperatura ambiente. Por ello es un marcador muy fiable.*

*En personas sanas los valores plasmáticos de PCT son mínimos, hablamos de niveles de picogramos. De hecho valores menores de 0.5ng/ml se consideran valores de individuos normales (90, 91). Como demostró Dandona, en voluntarios inyectados con E.coli se detectan valores de PCT a las 3h de la inyección. Los valores sufren un **incremento rápido y elevado** de 4-8 h y a partir de las 14 h comienza a disminuir progresivamente manteniéndose algo elevados incluso a las 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. Se especula que esta regulación de los valores de PCT se debe a la regulación de la estimulación de TNF- $\alpha$  por las repetidas inyecciones de la endotoxina. Clínicamente, este hecho es importante porque 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), así, la PCT es **proporcional al grado de infección**. Además, los niveles de PCT se **correlacionan con diferentes estados patológicos**: niveles en sangre de 0.5-2ng/ml indican procesos inflamatorios crónicos, enfermedades autoinmunes, infecciones virales o infecciones moderadas bacterianas localizadas, valores de 5-20ng/ml delatan quemaduras, SIRS o traumas múltiples, y de 10-100ng/ml se relacionan con una infección bacteriana severa, sepsis o un fallo multiorgánico (91).*

*La ruta específica de eliminación de PCT todavía no está establecida, probablemente como otras proteínas plasmáticas se degrade por proteólisis. Se ha demostrado clínicamente que la excreción renal de PCT juega un papel mínimo, pues no se acumula en casos de insuficiencias*

renales severas. Por tanto la PCT se puede usar como marcador inflamatorio en pacientes con fallo renal o sometidos a diálisis (91).

### **I.5.7. PCT Y CITOCINAS**

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- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-2 (no ocurre así con la IL-10), sugiere, que la estimulación de PCT está muy relacionada con los procesos inflamatorios (131, 177-179).

El incremento de los valores sanguíneos de PCT tras la inyección iv de LPS (4mg/kg) en voluntarios humanos, ocurre tras el aumento de los valores de TNF- $\alpha$  e IL-6, concretamente, como vimos anteriormente, sus valores empiezan a aumentar de las 3-6h, y alcanza sus valores máximos a las 12 h manteniéndose constantes durante 24h. Sin embargo, los valores máximos de dichas citocinas 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 (88). Lo que hace pensar que el TNF- $\alpha$  y la IL-6 pueden ser inductores de la PCT (Fig. 6). De hecho, se ha demostrado que al inyectar TNF- $\alpha$  o IL-6 iv se produce un incremento en los valores de PCT, directa o indirectamente. 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. Sin embargo, al administrar anticuerpo antiTNF en monos, 2h antes de endotoxina, los niveles de PCT también se elevaron a las 4h demostrando que la expresión de PCT no depende exclusivamente del TNF (172).

Cuando inyectamos diferentes dosis de PCT i.p. (intraperitoneal) en animales sanos, éstos no se ven afectados ni presentan signos de inflamación o infección, por tanto la PCT no es iniciadora de la cascada inflamatoria por sí misma (170).

La estimulación directa de PCT sobre citocinas no se ha demostrado. Pero indirectamente se ha visto que en sangre humana la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-6 está inhibida en un 20-30% por la PCT respecto a los controles. En hamsters sanos se ha visto que la PCT no aumenta la respuesta a citocinas, sin embargo en animales con sepsis los

valores de IL-1 $\beta$  se veían ligeramente disminuidos a las 3h tras la administración de PCT, pero son unos valores tan bajos que parecen no tener importancia "in vivo" (165).

### **I.5.8. INDICACIONES CLÍNICAS:**

La PCT está indicada **principalmente** para el diagnóstico de **infecciones bacterianas** que provocan reacciones inflamatorias **sistémicas** en el organismo: sepsis, shock séptico y síndrome de disfunción multiorgánica, alcanzando valores séricos cercanos a los 1000 ng/ml (180-182). Por eso se usa para monitorizar el curso y la terapia de estas inflamaciones (183-189). En ocasiones la PCT aparece elevada en shock de origen no bacteriano, así, los niveles iniciales de PCT en pacientes con shock cardiogénico son bajos, sin embargo si el shock se prolonga, se encuentran valores de PCT parecidos a los provocados por shock séptico (107, 190, 191).

Por el contrario las infecciones locales y los abscesos encapsulados aumentan poco los niveles de PCT en sangre. Sin embargo, siempre existen valores elevados de PCT en **peritonitis** ya que el peritoneo tiene gran actividad inmune, es una zona muy amplia e irrigada y provoca una respuesta sistémica. Se sabe que la extensión anatómica de la infección es directamente proporcional a la cantidad de PCT en plasma. Por ello, la PCT se presenta como un marcador del pronóstico y evolución de la peritonitis (192).

En algunos casos en los que existe inflamación, pero no infección, como tras **cirugía mayor, trauma múltiple, quemados o en recién nacidos**, la PCT puede elevarse inespecíficamente hasta valores de 5ng/ml. Al contrario que otros parámetros inflamatorios, la PCT no se eleva en los periodos post-operatorios de cirugías menores sin sobreinfección, pero sí en intervenciones mayores: operaciones abdominales, operación a corazón abierto y resección de esófago (106, 193). Durante las primeras 24 horas, los pacientes con traumas múltiples presentan valores elevados de PCT. Así, valores altos se correlacionan con la severidad, tipo y pronóstico de la herida, y se usa como marcador para evaluar los posibles riesgos que presentan estos enfermos (103, 122). La PCT se eleva rápidamente en pacientes que sufren quemaduras en vías respiratorias, y existe una alta correlación entre tamaño de zona



dañada, muerte prematura y niveles altos de PCT (104). Los recién nacidos presentan valores de PCT anormalmente altos, pero aún así existen diferencias significativas en sus valores durante sepsis y meningitis, con una sensibilidad del 92,6% entre las 0 y 48h de vida que llega a ser del 100% en recién nacidos de 3 a 30 meses (123).

La sensibilidad de la PCT, la hace especialmente útil para diagnósticos diferenciales. En casos de **meningitis** los valores de PCT son significativamente distintos según sea de origen bacteriano o viral (194-197). Tras un **transplante**, el aumento de PCT diferencia de forma temprana la infección (bacteriana, micótica, parasitaria) del rechazo. El rechazo agudo o crónico no va acompañado de un aumento de PCT. La determinación de PCT en el postoperatorio temprano está indicada en estos casos, por ser más frecuentes las infecciones bacterianas o micóticas (118, 198-201). Varias experiencias sugieren que el incremento temprano de los valores séricos de PCT tras diversas afecciones, son signos de complicaciones potenciales. Esto se observa en el **periodo post-operatorio** (106, 202), **traumas múltiples** (103), **quemados** (104) y otras enfermedades. En la **pancreatitis** el diagnóstico temprano de la etiología obstructiva es muy importante para instaurar el tratamiento adecuado y evitar posibles complicaciones (203). La PCT es capaz de diferenciar necrosis estériles (valores insignificantes) de infectadas (109, 204). También discrimina si la etiología de la obstrucción es biliar o tóxica (205). En el **Síndrome del distrés respiratorio agudo (SDRA)** la PCT diferencia entre la etiología tóxica y bacteriana, aumentando en las enfermedades infecciosas (107). En cuanto a las **neumonías**, los niveles de PCT están más elevados en neumonías bacterianas que en víricas (97, 99, 111).

De todo esto, concluimos que las infecciones bacterianas son el estímulo principal para la inducción de síntesis de PCT sérica. No ocurre así en infecciones víricas (sida, hepatitis B o meningitis vírica) donde los valores de PCT se mantienen bajos. Por ello la medición de PCT es especialmente útil para diferenciar la etiología de una infección y detectar posibles superinfecciones (112, 113, 206-208). Sin embargo los niveles de PCT se encuentran elevados, en diferentes **infecciones fúngicas** como candidiasis y aspergilosis (127) y en pacientes infectados por **Plasmodium falciparum**. De hecho, concentraciones mayores de 25ng/ml indican un alto riesgo de mortalidad (129). Los niveles de PCT se encuentran elevados también en pacientes con **meloidosis** (209). Esta

*selectividad es especialmente útil en desórdenes autoinmunes, inflamaciones crónicas de origen no bacteriano y enfermedades neoplásicas, ya que, no se han encontrado valores elevados de PCT en estos pacientes, y solo aparece elevada cuando existe una sobreinfección bacteriana (126-128, 210).*

*Algo parecido ocurre en pacientes inmunosuprimidos. Todos los estudios demuestran que la PCT se sintetiza y libera en respuesta a un estímulo apropiado en presencia de inmunosupresión y leucopenia (127, 211). Si estos valores se encuentran elevados, sabemos que nos encontramos con una sobreinfección (212). Aunque hay que tener en cuenta que algunos tumores sólidos pueden producir la síntesis y liberación de PCT y otros precursores de la CT de forma paraneoplásica (213).*

*Todas las indicaciones clínicas para las que está recomendada la PCT, y sus respectivos valores séricos se encuentran en la Tabla 2.*

#### ***I.5.9. PCT Y SNC:***

*Existen numerosos estudios de los valores sanguíneos de PCT en personas sanas y en pacientes que sufren un proceso inflamatorio, pero poca bibliografía podemos encontrar sobre los valores de PCT en 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.*

*En 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  $> 0.5\text{ng/ml}$  tiene carácter diagnóstico para decir que nos encontramos frente a una meningitis bacteriana (214). En pacientes con traumatismo craneoencefálico, los valores de PCT en LCR de individuos se triplicaron ( $\text{PCT} = 0.41\text{ng/ml}$ ) frente a los controles ( $\text{PCT} = 0.15\text{ng/ml}$ ) (215-217). Poco se conoce de la farmacocinética de la PCT en LCR. La vida media de PCT en LCR se desconoce así como cuando alcanza su concentración máxima, su meseta y cuando desaparece del LCR.*

*Tabla 2: Indicaciones clínicas y valores séricos de PCT*

<b>INDICACIONES CLÍNICAS</b>	<b>PCT(ng/ml)</b>	<b>REF. BIBLIOG</b>
Marcador de sepsis, shock séptico, inflamación sistémicas síndrome de disfunción multiorgánica	>5-10	203
Marcador de shock cardiogénico, disfunción circulatoria y resucitación frente a infarto de miocardio: Infartomiocardio/shock cardiogénico /resucitación	<0.5/ <5/ <130	108
Transcurso clínico de peritonitis	>10	192
Postoperatorios: cirugía no abdominal/ abdominal/ cardiaca/torácica/colecistectomía/resección intestinal	0.4/ 0.5/ 0.6/ 0.6/ 0.5/ 1.5	106
Presencia de infección o de rechazo tras realización de transplantes: infección/rechazo	2-40/ <0.5	199
Evaluación de riesgo que presentan pacientes con traumas múltiple:trauma+SIRS/trauma+SIRSsevero/trauma+sepsis	0.1-0.5/ 1.5-3.5/ 0.3-35	122
Predicción de complicaciones tras diferentes afecciones	>0.5	105,106,111 113,199
Diagnóstico diferencial de pancreatitis : infecciosa/ biliar/ tóxicas	2/ 61/ 0.4	109,205
Diagnóstico diferencial de síndrome de respiratorio agudo: etiología infecciosa/tóxica	>5/ <3	107
Diagnóstico diferencial de neumonía: adquirida en comunidad/nosocomial/aspirativa/ enfermedad pulmonar crónica	1/ 7/ 2/ <0.5	111
Desórdenes autoinmunes, inflamación crónica de origen no bacteriano y desórdenes neoplásicos	<0.5	126
Diagnóstico diferencial entre meningitis bacteriana y viral:	1.8/ 0.25	113
Infecciones fúngicas	0.5-1	117
Detección y evolución de malaria : sin complicaciones/ severa/con desenlace fatal	1-2.5/ 11/ >25	119
Presencia de sobreinfección en pacientes inmunosuprimidos, con leucopenia, neutropenia y procesos oncológicos.	>0.5	127
Evolución de quemados y heridos por inhalación: supervivientes/ no supervivientes	3/ 7	105
Infecciones en recién nacidos:sanos/con infección invasiva	0.3/ 14.5	197

Los resultados obtenidos en ocasiones varían ligeramente, dependiendo de las variaciones interindividuales, la agudeza y severidad del cuadro clínico, o el tiempo de toma de muestra y la metodología de procesamiento.

*Aunque la PCT no se ha localizado en núcleos concretos del cerebro, tras la administración de LPS 5mg/kg i.p. la expresión del ARNm de CT se incrementa significativamente en la hipófisis de ratas, este incremento está asociado con una elevación de los niveles séricos de CT inmunoreactiva, lo que implica que la hipófisis es una de las fuentes de producción de PCT sérica durante la sepsis (145).*

*Recientemente se ha demostrado por una técnica ILMA modificada, la existencia de PCT en cerebro de monos tratados con LPS 100µg/kg, concretamente en el cortex, cerebelo e hipófisis, a distintas horas: 5, 6, 24 y 48 h (142). En este mismo estudio se confirma la expresión de ARNm de CT en cerebro de monos expuestos a un proceso séptico.*

*Teniendo en cuenta que parece ser que la PCT se une a los CRs y CRLRs, la presencia de dichos receptores en el SNC, podría implicar la presencia de la prehormona. De hecho, se sabe por estudios de hibridación in situ que el ARNm de los receptores de CT se localizan en el núcleo acumbens (Acb), las áreas preópticas y preópticas mediales (MPO, MPA, LPO), el núcleo paraventricular del hipotálamo (Pa) y el núcleo arcuato (Arc), en menor cantidad también se encontró en el mesencéfalo y en el bulbo olfatorio (OB), pero no en la glándula pituitaria (PP) (218).*

*Por otro lado la hormona paratiroidea (PTH) actúa como hipercalcemiente, y en cierto modo contrarresta los efectos de la CT. Entendiendo su relación con el SNC, quizás se saquen conclusiones de la relación de la PCT y el cerebro. Se sabe que las proteínas relacionadas con la PTH (PTHrP) y sus receptores se localizan en diferentes tejidos incluido el cerebro. En individuos sanos las PTHrP solo se encontraron en neuronas, pero ultimamente también se han localizado en astrocitos de fetos humanos, astrocitos transformados malignos y en astrocitos reactivos frente a endotoxina y frente a daño cerebral (219, 220). Parece ser que dichas proteínas actúan inhibiendo la proliferación celular a través de un mecanismo dependiente del AMPc, además se sabe que el TNF- $\alpha$  estimula la producción de PTHrP en astrocitos. Así mismo las PTHrP inducen la expresión de IL-6 (citocina neuroprotectora) por parte de los astrocitos, por lo que se piensa que juegan un papel como mediadores en la respuesta inflamatoria cerebral, en la que existe relación entre neuronas y glia. Curiosamente la correlación entre los valores de PCT en LCR y los de IL-6, parecen ser paralelos. 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 (215).*



## ***PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA***

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

*Como vimos anteriormente, el mecanismo de génesis de la fiebre actualmente aceptado, se basa en la síntesis y liberación de PGE<sub>2</sub> a nivel central, concretamente en la pared anterior del 3V y en el PO/HA. Si la PCT actúa como mediador de la respuesta séptica, o como supresor de la propagación de la inflamación, debe estar implicada en los mecanismos de control de la fiebre, tendiendo a disminuir el aumento de temperatura. Si por el contrario es un mediador dañino de la sepsis debe esperarse un incremento en la respuesta frente a la fiebre.*

*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 tienen valor diagnóstico en este tipo de pacientes (198, 221).*

*Por otro lado varios autores clínicos recomiendan el uso de la PCT para diferenciar las fiebres de origen bacteriano de las víricas, citotóxicas, de las provocadas por rechazo, y de las provocadas por enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso (222-225). La eficacia de este parámetro como marcador de episodios febriles en pacientes neutropénicos ha demostrado ser claramente superior a la de otros parámetros (95, 226, 227).*

*Por su papel como marcador febril y según los estudios citados anteriormente, podríamos pensar que la PCT está implicada en los mecanismos de la producción de fiebre. De hecho, cuando pretratamos a animales con PCT periféricamente (2, 3 y 4 µg/kg i.p.) se produce un efecto de inhibición de la fiebre inducida por E.coli (228). 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 y en todas las zonas donde se localizan los PE (CVOs, 3V, Pa,*

*Arc). Por tanto si la PCT verdaderamente tiene alguna acción antipirética, es conveniente estudiar su acción sobre 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) Corroborar la presencia de PCT en plasma en ratas tratadas con LPS 100 µg/kg.*
- 2) Estudiar el efecto de la microinyección de PCT en el Ventrículo Lateral (icv) sobre la temperatura corporal.*
- 3) Analizar el efecto de la PCT administrada icv en la fiebre inducida por endotoxina bacteriana (LPS).*
- 4) Estudiar la presencia y localización de la PCT en el SNC, especialmente en el PO/HA y en las zonas de acceso de los PE, tanto en condiciones normales como tras estímulos pirogénicos (LPS).*





---

## ***METODOLOGÍA***

## **III. METODOLOGÍA**

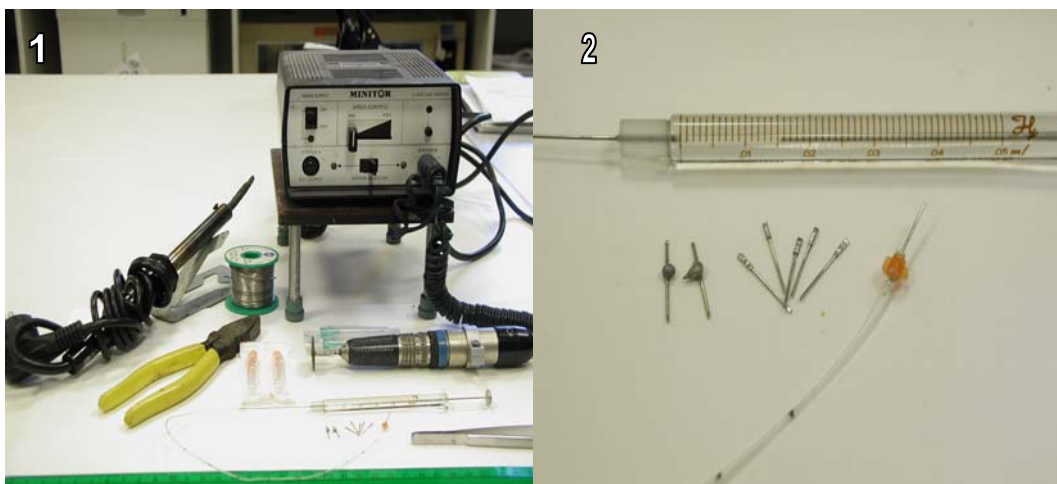
### **III.1. ANIMALES.**

*Se utilizarán ratas Wistar adultas (200-250 g) mantenidas en jaulas individuales de plástico en el interior de una habitación con temperatura controlada mantenida a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  (zona termoneutral para ratas), y con ciclos día-noche de 12 h (luz: 07:00-19:00).*

*El agua y la comida (pellets Purina) serán suministradas "ad libitum". Para evitar las posibles variaciones del ritmo circadiano sobre la temperatura corporal, los experimentos se iniciarán entre las 8:00 y 10:00 a.m.*

### **III.2. CONSTRUCCIÓN DE LAS CÁNULAS GUÍAS**

*Para la construcción de cánulas guías de implantación crónica, para posteriores microinyecciones, se emplearon tubos de acero inoxidable con un diámetro externo de 23 ga (Small Parts Inc., FL, OR, USA). El extremo de localización intracerebral fue biselado y redondeado, con el fin de minimizar al máximo la lesión tisular durante su implantación.*

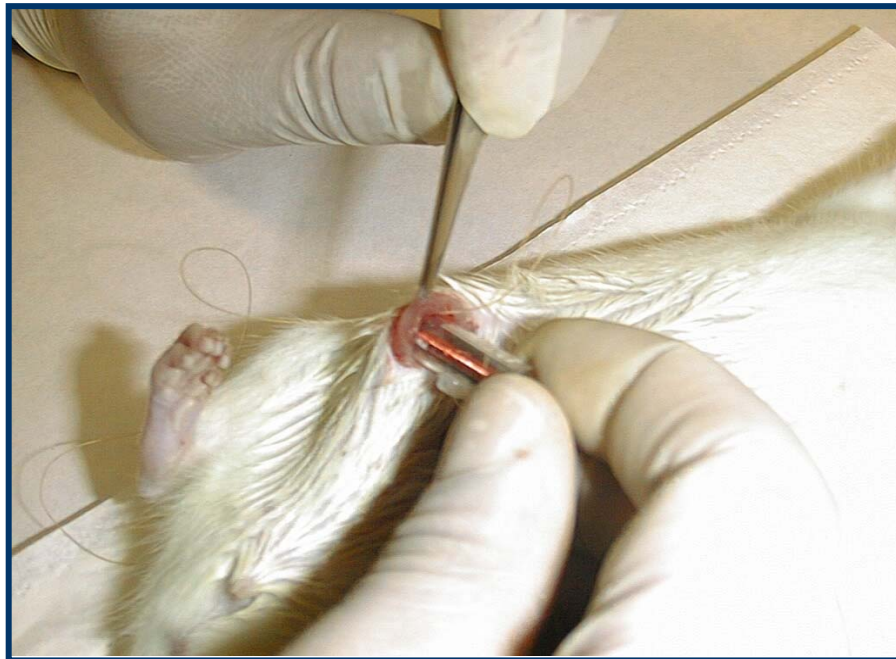


**Figura 12.** 1) Material usado para la construcción de cánulas guías, inyectoras y estiletes. 2) Detalle de cánulas y estiletes finalizados, junto a jeringa Hamilton.

### **III.3. REGISTRO DE LA TEMPERATURA CORPORAL**

*La temperatura corporal de los animales se ha medido 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. (Fig. 13)*

**Figura 13.** *Implante intraperitoneal del transmisor de frecuencia VH-FH*



*Las señales emitidas por estos transmisores (Hz) fueron recogidas a través de un procesador periférico (VitalView system, Mini-Mitter) situado bajo la jaula de cada animal, y conectado a su vez a un ordenador personal (Fig. 14). Tanto la temperatura como la actividad de cada animal fueron registradas y guardadas a intervalos de 5 min, para su posterior análisis.*



*Figura 14. Sistema de medición de temperatura corporal, la rata lleva implantado un transmisor de frecuencia y la placa es el procesador periférico que recoge las transmisiones, que son recogidas por el ordenador que las procesa y almacena.*

### **III. 4. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO E IMPLANTACIÓN DE LAS CÁNULAS GUÍAS.**

*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 con una mezcla de ketamina (100mg/kg i.p.) y xilazina (5mg/Kg i.p.) y se colocaron en una mesa estereotáxica, con el cráneo perfectamente fijado en los planos verticales y horizontales. (Fig. 15 y 16)*



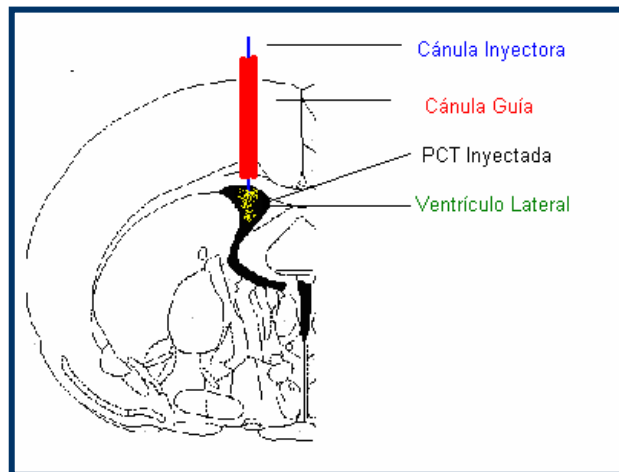
*Fig 15. Mesa estereotáxica de intervención.*

*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, procediéndose a la localización de bregma, como punto de referencia para la obtención de las coordenadas estereotáxicas, correspondientes al ventrículo lateral, según el atlas estereotáxico para ratas Wistar de Paxinos y Watson (229). Las coordenadas utilizadas para la microinyección icv con fijación del maxilar superior 3 mm por debajo del plano horizontal cero, fueron desde Bregma:*

*Antero-posterior: -0.3 mm a - 0.9 mm*

*Lateral: 1.4 mm*

*Vertical: 3.2 mm a 4 mm*



**Figura 16.** Esquema: Localización del implante icv

*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. (Fig. 17)*



**Figura 17.** Exposición de la calota y visualización de bregma

*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*

*(Figs. 19, 20). 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.*



**Figura 18.** *Implante de tornillos para la fijación de la cánula guía.*



**Figura 19.** *Fijación con cemento dental de cánula guía y estilete*

*Finalizado el proceso quirúrgico, los animales se colocaron en jaulas individuales, hasta su completa recuperación postquirúrgica (entre 6-8 días). Durante este periodo los animales fueron habituados a los procedimientos experimentales con el fin de disminuir el estrés en posteriores experimentos. Con el mismo fin, y para evitar posibles infecciones, durante este periodo y diariamente, se les retiró el estilete para cambiarlo por otro estéril. Tanto el agua como la comida fueron suministrados "ad libitum" durante todo el experimento. Todos estos pasos se encuentran reflejados en la Figura 20.*

### **III.5. TÉCNICA DE MICROINYECCIÓN**

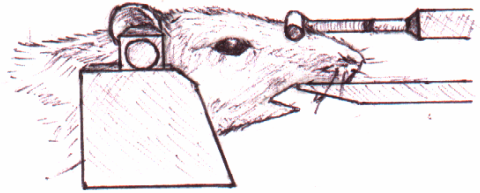
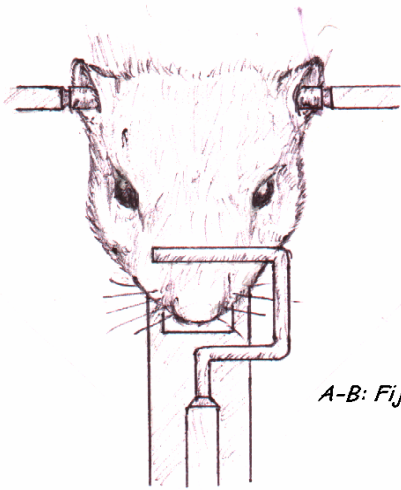
*Todas las inyecciones se realizaron en animales despiertos, con libertad de movimientos y habituados a los procedimientos experimentales. Para ello se utilizó una cánula inyectora, de acero inoxidable (26 ga) con 1mm de longitud superior a la cánula guía, para evitar la retrodifusión del fármaco, acoplada mediante un tubo de polietileno (PE: 50) lleno de la sustancia a inyectar que fue impulsada por una jeringa Hamilton de 50  $\mu$ l. La microinyección se realizó, inyectando un volumen de 5  $\mu$ l en cada animal; la perfusión de este volumen duró un tiempo de 5 min.*

*Antes de proceder a la inyección de las sustancias, se procedió a la esterilización de los materiales de inyección para evitar la posible contaminación de los mismos y la alteración de los resultados. El proceso de esterilización se realizó calentando la cánula inyectora a 180°C (30min), posteriormente, los materiales de microinyección se introdujeron en alcohol de 70%. Antes de inyectar, se comprobó que tanto la sonda de polietileno como la cánula inyectora eran permeables, infundiendo a través de las mismas suero fisiológico estéril con una jeringa Hamilton (esterilizada).*

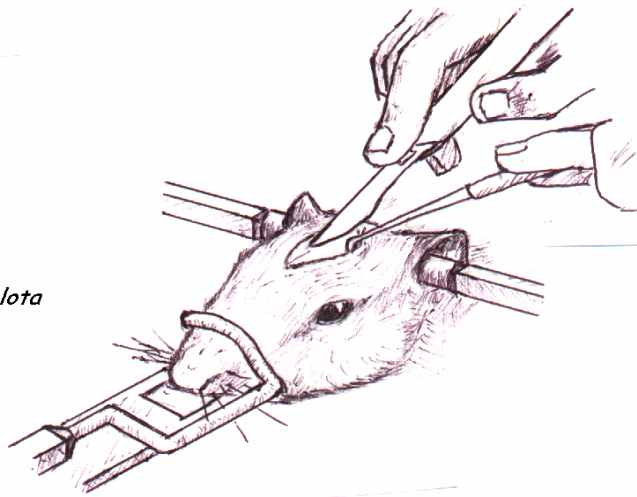
*A continuación, se procedió a la extracción del estilete y a la introducción de la cánula inyectora, infundiendo así la sustancia elegida. Tras la perfusión se dejó la cánula inyectora dos minutos en el lugar de la inyección para evitar el reflujo del líquido inyectado, se extrajo y se introdujo un estilete estéril. Finalmente, el animal es devuelto a su jaula, libre de ruidos y otros estímulos. (Fig. 21).*



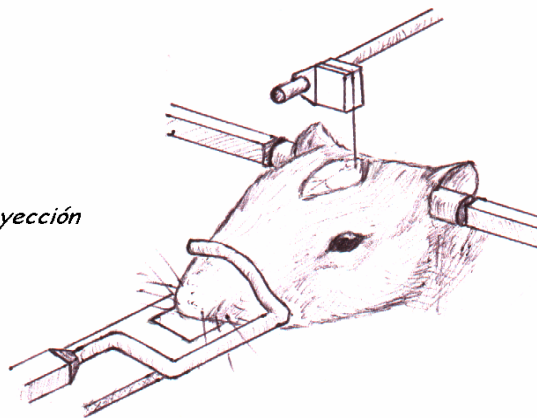
*Figura 20. A-B: Fijación del animal al equipo estereotáxico, C: Exposición de la calota, D: Localización del punto de inyección, E: Perforación del orificio para posterior implante icv, F: Implantación de los tornillos para la fijación de la cánula guía, G: Detalle de la distribución de tornillos alrededor del orificio para el implante, H: Colocación estereotáxica de la cánula guía y estilete, I: Animal tras el periodo de recuperación. (Santiago López Herrero)*



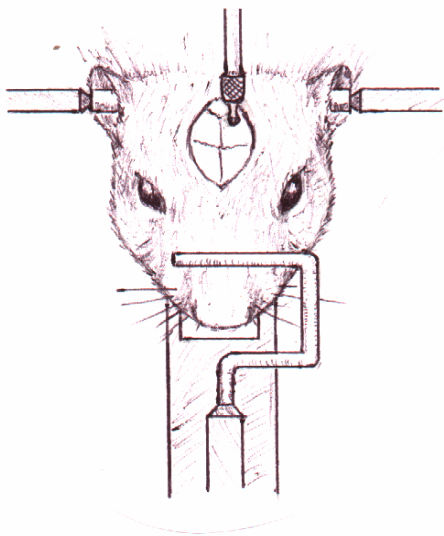
*A-B: Fijación del animal al equipo estereotáxico*



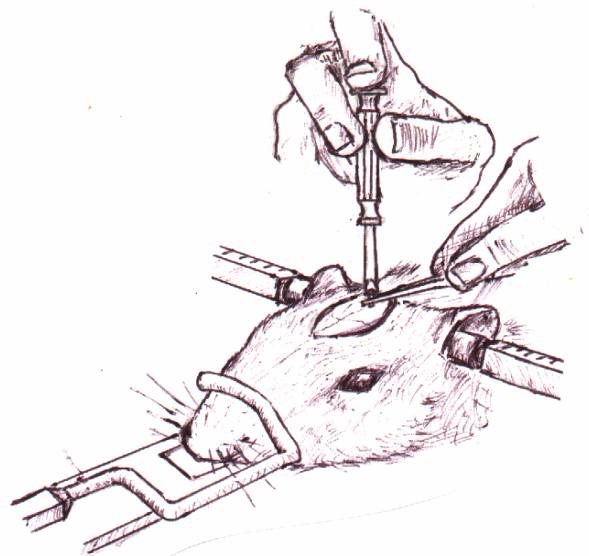
*C: Exposición de la calota*



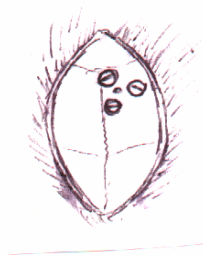
*D: Localización del punto de inyección*



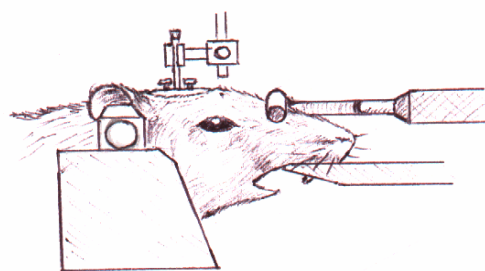
*E: Perforación del orificio para posterior implante icv*



*F: Implantación de los tornillos para la fijación de la cánula guía*



*G: Detalle de la distribución de tornillos alrededor del orificio para implante*



*H: Colocación estereotáxica de la cánula guía y estilete.*



*I: Animal tras el periodo de recuperación*



*Figura 21. Proceso de microinyección.*

### **III.6. FÁRMACOS**

#### PROCALCITONINA:

*Se ha empleado Calcitonin N-Terminal Flanking Peptide (BACHEM AG) reconstituida en buffer fosfato salino (PBS) con 0.1% de albumina sérica bovina (BSA) pasado a través de un filtro 0.22 micras (Millipore Co, USA), llevándola a una concentración stock de 1mg/ml, a partir de la cual se prepararon con LCR (Harvard) distintas alícuotas, almacenadas a -20°C durante un máximo de tres meses, evitando así múltiples procesos de congelación y descongelación. Las distintas dosis: 2, 4, 10, 100, 1000ng/5µl se prepararon con LCR estéril en el momento de su uso. La composición del LCR es similar eletrolíticamente a la de la rata, siendo la concentración final en mM: Na 150, K 3.0, Ca 1.4, Mg 0.8, P 1.0, Cl 155.*

#### E. COLI (LPS 0111:B4):

*Se han empleado LPS de E. coli (lote 110K4060, serotipo 0111:B4, Sigma), disueltos en suero salino y administrados a una dosis de*

50 $\mu$ g/Kg/ml i.p. En el caso de la inmunoluminometría y la inmunohistoquímica, para asegurarnos la expresión de PCT se duplicó la dosis (100  $\mu$ g/Kg/ml i.p.).

### **III.7. 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 con una mezcla de ketamina (100 mg/Kg i.p.) y xilazina (5mg/Kg i.p.). A continuación, mediante una punción en el vértice cardíaco, 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 300ml paraformaldehído (PAF) al 4% de uso inmediato Merck.*

*Finalizado este paso, se extrajeron los cerebros de forma cuidadosa, y para completar la fijación de los tejidos se almacenaron en PAF a 4°C durante un par de horas. A continuación para fomentar la crioprotección de las muestras, los cerebros se sumergieron en tampón fosfato 0.1M / sacarosa (Sigma) al 30% a 4°C, donde permanecieron de 24 a 48h, una vez sumergidos, se atemperaron a temperatura ambiente (TA) y se seccionaron en bloques. Los bloques que contenían la zona de microinyección, se introdujeron en tampón fosfato 0.1M/sacarosa 20%/gelatina (Sigma) 7.5% a 37°C durante 30min. Los bloques se orientaron en moldes y se rellenaron con gelatina a 4°C, manteniéndose así hasta que se endurecieron. A continuación se sacaron de sus correspondientes moldes y se congelaron por inmersión en isopentano líquido (Panreac) a -60°C durante aproximadamente 1min, y se almacenaron a -80°C para su posterior uso.*

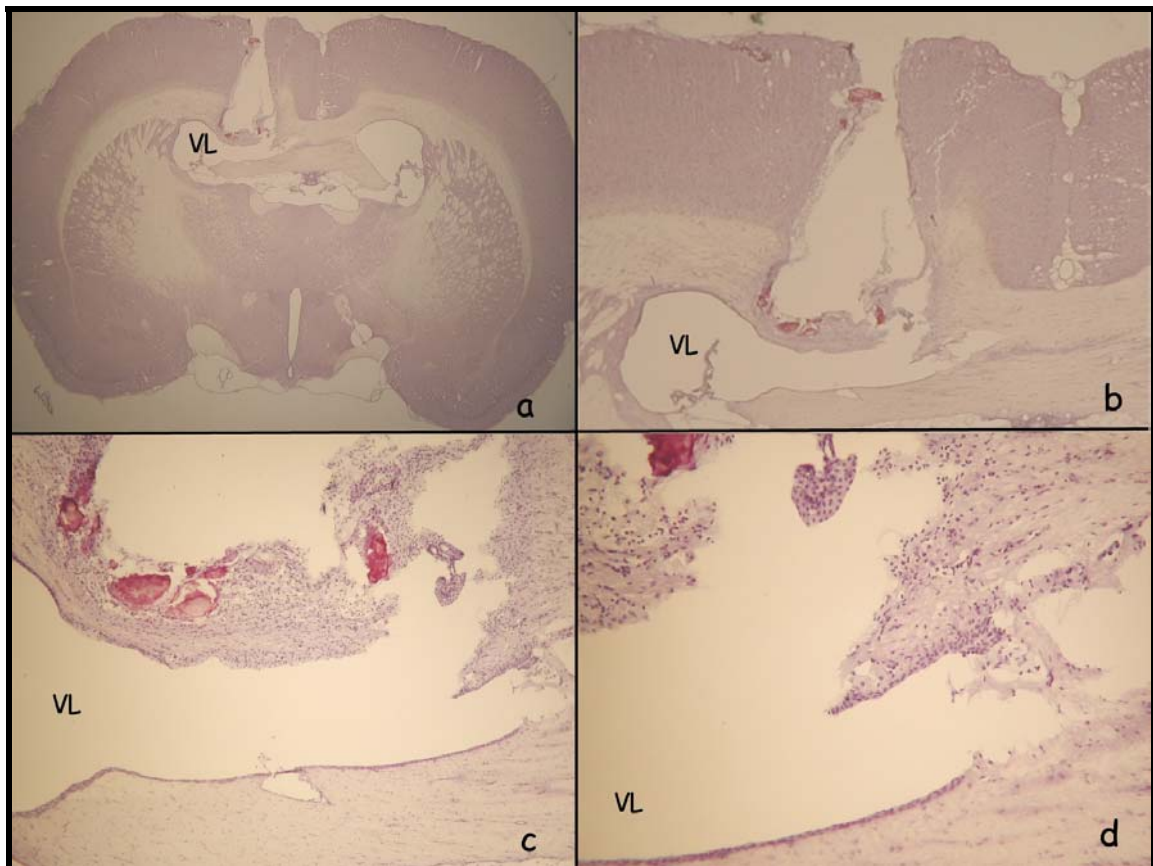
*Los cortes seriados en secciones coronales de 20  $\mu$ m se realizaron con un microtomo de congelación Leica CM 1100 a una temperatura de -20°C. Una vez secos los cortes a T.A. procedimos a su fijación, montaje y tinción, mediante la técnica básica de tinción hematoxilina-eosina. Dicho método está basado en la tinción diferencial de estructuras catiónicas y aniónicas. La hematoxilina es una solución acuosa alcalina, que en*

*presencia del mordiente adecuado funciona como un catión y tiñe de azul tejidos aniónicos como los núcleos celulares. Como contratinción se usa la eosina, una sustancia aniónica de coloración anaranjada que se une a los elementos catiónicos. La técnica consta de varias etapas consecutivas que describiremos esquemáticamente:*

- *Inmersión de los portas en una solución etanol 95% durante 2s.*
- *Tinción con Hematoxilina de Harris filtrada, 30s.*
- *Lavado en agua destilada.*
- *Inmersión en el mordiente alcohol ácido (etanol 96% + ácido clorhídrico 0.4%), 5s.*
- *Lavado en agua destilada.*
- *Inmersión en el diferenciador agua amoniacal (1ml agua destilada + 3ml de amoniaco 28%), 5s.*
- *Lavado en agua destilada.*
- *Contratinción con Eosina filtrada (Merck), 1min.*
- *Inmersión en dos soluciones sucesivas de etanol 95%, 5 min.*
- *Deshidratación con etanol 100% en dos sucesivas sesiones, 5 min.*
- *Inmersión en dos soluciones sucesivas del clarificante xilol (Panreac), 5min.*
- *Montaje inmediato de portas con medio de montaje permanente (EUKITT, O. Kindler GMBH and col).*
- *Localización de los sitios de inyección.*

*Los lugares de inyección fueron identificados y localizados anatómicamente con la ayuda de un microscopio óptico Olympus BX41 y de un atlas estereotáxico de cerebro de rata Wistar (Paxinos y Watson. 1996).*

Los lugares de microinyección se caracterizaron 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. (Fig. 22)



**Figura 22.** Análisis histológico del punto de inyección icv: **a:** corte coronal de cerebro de rata implantada crónicamente en el ventrículo lateral (VL), 10x, **b:** localización de la zona dañada por el implante crónico de cánula guía, 100x, **c:** 200x, y **d:** 400x.

### **III. 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos de todos los experimentos fueron analizados mediante el programa Sigma Plot. Todos los resultados se representan como media  $\pm$  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.*

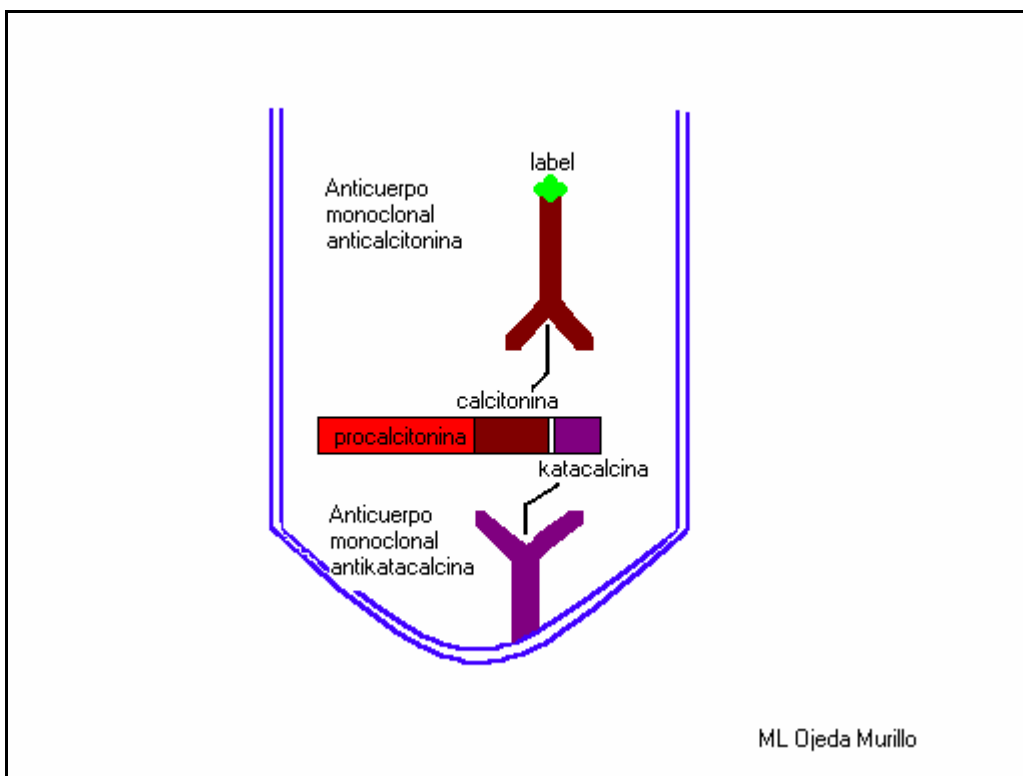
### **III.9. ESTUDIO DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE PCT:**

*La sangre se obtuvo mediante punción cardiaca en ratas anestesiadas con una mezcla de ketamina xilacina a las 1, 3, 6, 12 y 24h tras la inyección de LPS 100µg/kg ip. Se centrifugó inmediatamente tras su recogida a 3000 r.p.m. a 4°C. El sobrenadante se recogió en tubos eppendorf de 200µl y se almacenó a -80°C para su posterior uso. La molécula de PCT es muy estable y puede permanecer almacenada a esta temperatura durante meses.*

*Las muestras se procesaron por duplicado, con sus respectivos controles y estándares mediante la técnica cuantitativa de inmunoluminometría (LUMItest PCT, Brahms diagnostica) con sensibilidad aproximada de 0.1ng/ml. Los anticuerpos monoclonales que se unen a la PCT son específicos de los segmentos de calcitonina y katalcalcina. Uno de ellos está marcado con luminiscencia (el marcador) y el otro está fijado a las paredes internas de los tubos de detección. Durante el periodo de incubación ambos reaccionan con la PCT presente en las muestras formando complejos sándwich. (Fig. 23)*

*Así la PCT marcada queda adherida a las paredes de los tubos y se cuantifica midiendo la señal de luminiscencia mediante el luminómetro LB 952 o BERILUX ANALYZER 250, y los reactivos del LUMItest Basiskit (Brahms diagnostica). La intensidad de la luminiscencia es directamente proporcional a la concentración de PCT en la muestra. Tras establecer la curva estándar con diferentes estándares de concentración conocida (calibrados frente a PCT humana intacta), los valores desconocidos de las muestras se cuantifican comparándolos con los valores de la curva.*





**Figura 23.** Esquema del tubo usado en la inmunoluminometría (LUMItest PCT, Brahms diagnostica). EL anticuerpo monoclonal anticalcitonina está marcado con luminiscencia (el marcador) y el que se une a la katalcalcina está fijado a las paredes internas del tubo. Durante el periodo de incubación ambos reaccionan con la PCT presente en las muestras formando complejos sándwich.

### III.10. INMUNOHISTOQUÍMICA

Las técnicas inmunohistoquímicas (IHC) son técnicas de inmunolocalización que utilizan un enzima como trazador del marcaje: por este motivo, el lugar de la reacción antígeno-anticuerpo, se visualiza añadiendo al final de la reacción el sustrato del enzima más una sustancia denominada cromógeno. El producto originado al actuar el enzima sobre sustrato interacciona a su vez sobre el cromógeno y da lugar a un precipitado insoluble y coloreado, al igual que ocurre en todas las reacciones histoenzimológicas. Pueden emplearse distintos tipos de enzimas como trazadores; el más usado es la peróxidasa (es el que se usó en este estudio), a la que siguen la fosfatasa alcalina y, a gran distancia, la glucosa oxidasa.

En este estudio se usaron dos técnicas inmunohistoquímicas:

1. Para detectar el daño cerebral inducido por la introducción crónica de cánulas guías en las ratas implantadas. Así nos aseguramos que las posibles variaciones de la temperatura corporal de los animales se deba sólo a la administración icv de PCT.

2. Para localizar la PCT en el cerebro de los animales no implantados crónicamente con cánulas guías. Así vemos si la PCT tiene acción "per sé" en el cerebro de los animales tratados.

Así mismo de todas las series se montaron series paralelas con hematoxilina-eosina para determinar el buen estado del tejido y de los diferentes núcleos y estructuras.

### III. 10.1. LOCALIZACIÓN DEL DAÑO CEREBRAL INDUCIDO POR LA INTRODUCCIÓN CRÓNICA 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 (Ac1°) antiglial, Rabbit Anti-cow Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), DAKO.

La extracción y congelación de tejidos se realizó de igual modo que en el análisis histológico, en este caso los cortes seriados a 20µm (coronales y sagitales) se guardaron en la solución de crioprotección Hoffman (para 1L: 500ml tampón fosfato 0.2M + 300ml etilenglicol + 300g sacarosa + 10 g polivinil pirrolidona + 9g NaCl + agua destilada csp) a -20°C para ser usados posteriormente en free-floating.

Antes de proceder a la incubación, para permeabilizar las membranas celulares y favorecer la entrada del Ac a las células, las muestras se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) 0.01M/saponina 0.1% pH 7.4 durante 3min, tres veces consecutivas. Así mismo, para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena que pudiera interferir con la peroxidasa exógena marcadora, se usó peróxido de hidrógeno al 6% 15min

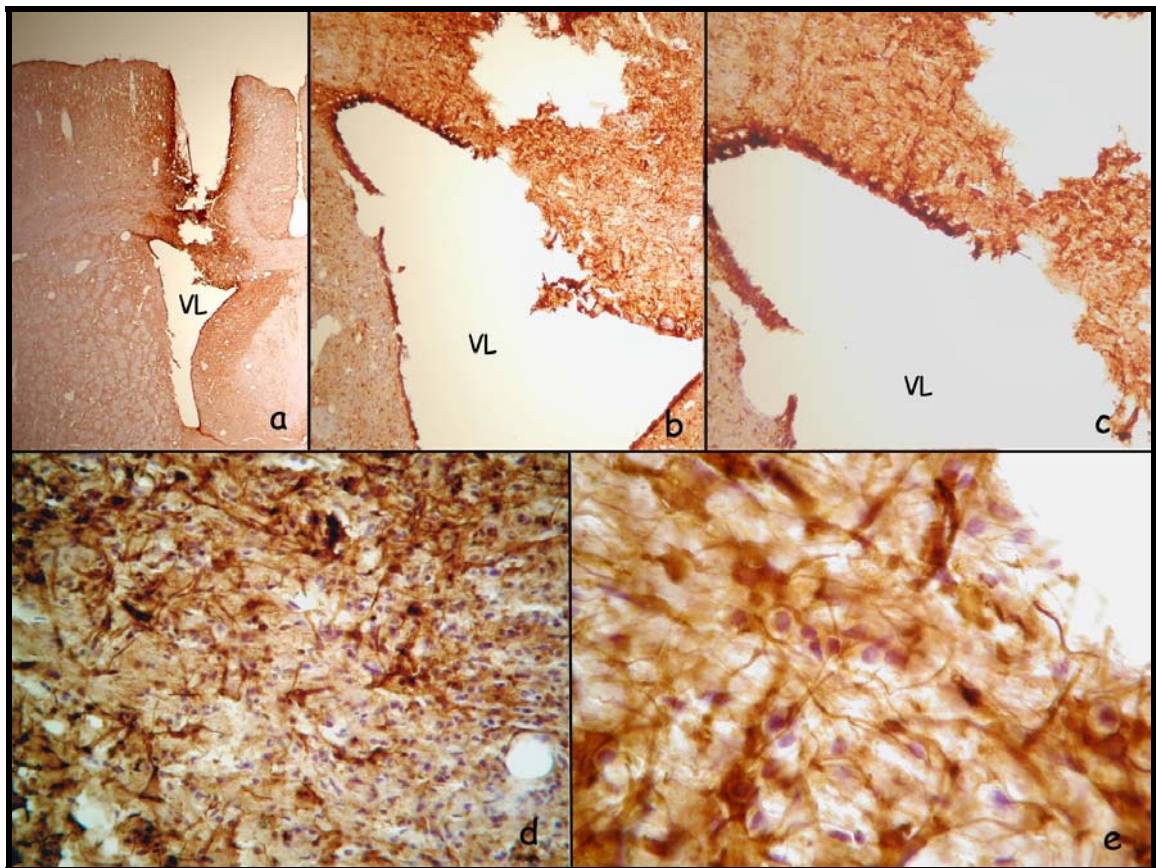
*en oscuridad. Las secciones se lavaron en PBS/saponina 0.1% 3min, tres veces. Para evitar posibles reacciones cruzadas del Ac 2º con proteínas endógenas, se usó como bloqueante de proteínas (suero de cabra no inmunizado al 5% en PBS) durante 30min. Los tejidos se lavaron en PBS/saponina 0.1% 3min, tres veces. Para prevenir la aparición de interferencias con el sistema de visualización estreptavidina/peroxidasa se bloqueó la actividad endógena de la biotina (el cerebro presenta alta actividad de biotina endógena) con un bloqueante de biotina 30 min. La dilución de biotina (4 gotas por ml) se suplementó con un 5% de suero de cabra no inmunizado. Lavado en PBS/saponina 0.1% 3min, tres veces.*

*Los tejidos se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche, con 50µl/sección del Ac 1º (GFAP) diluido al 1/4000 en PBS/saponina 0.1%, unido a un 5% de suero de cabra no inmunizado; o con 50µl/sección de 5% suero de cabra como control negativo (ausencia de Ac 1º). La dilución usada para el Ac 1º, se consideró la idónea, después de varias pruebas, ya que se observó la mayor intensidad de la reacción de forma específica, sin marcaje de fondo. Lavado en PBS/saponina 0.1% 3min, tres veces e incubación a temperatura ambiente durante 30min con 50µl/sección del Ac 2º biotinizado (DAKO) diluido al 1/200 en PBS/saponina al 0.1%. Lavado en PBS/saponina 0.1% 3min, tres veces.*

*Como sistema de detección se usó estreptavidina/peroxidasa 15 min, y como cromógeno tetracloruro de diaminobencidina (DAB) 8min. Para parar la reacción se hicieron lavados sucesivos con agua destilada.*

*La enzima peroxidasa forma un complejo con el sustrato peróxido de hidrógeno, este complejo reacciona con un donante de electrones para conseguir el producto final de la reacción, una molécula coloreada y agua. Así, la enzima peroxidasa se halla libre para reaccionar con más moléculas de peróxido de hidrógeno y formar más moléculas coloreadas. Por ello la mayor sensibilidad de las técnicas de inmunoperoxidasa frente a las de inmunofluorescencia, radica en el factor amplificador de ésta. Además en estas técnicas, el producto coloreado final se precipita en el mismo lugar donde se ha producido la reacción. La DAB produce un color marrón insoluble en alcohol, por lo que los cortes pueden ser deshidratados y cubiertos con medios de montaje convencionales.*

*Seguidamente se hicieron dos series, una contrateñida y otra sin contrateñición. Para la contrateñición se usó hematoxilina 30s, lavado en agua destilada, alcohol ácido 5s, agua destilada, agua amoniacal 5s y agua destilada. Ambas series concluyeron en una deshidratación de tejidos mediante una batería seriada de alcoholes: etanol 95% 5min, 95% 5 min, 100% 5min, 100% 5min, xilol 5min y 5min. Inmediatamente después se procedió montaje de los tejidos en medio permanente. Tras lo cual, los tejidos ya están preparados para ser observados al microscopio. (Fig. 24)*



**Figura 24.** *Marcaje de los astrocitos localizados en el área dañana alrededor de la zona del implante crónico y de la microinyección en cortes coronales de cerebro de rata: a: 10x, b: 100x, c: 200x, d: 400x y e: 1000x.*

### III. 10.2. INMUNOLocalización CEREBRAL DE LA PCT

Para ver la posible localización de la PCT en el cerebro se usó un estudio IHC de marcaje de dicha molécula. Para ello se utilizó el Ac 1º anti-Human Procalcitonin Mouse Monoclonal Antibody PCT-N1, Protein G Purified, Bio Vendor. Este anticuerpo pertenece al isotipo IgG1k y su especificidad compromete a los 17 aminoácidos situados entre la posición 60-77.

La extracción, fijación, congelación y corte de los cerebros en este caso se hicieron de igual modo que en el anterior, incluido toda la fase previa de bloqueo de reacciones inespecíficas anterior a la incubación del Ac 1º. Así mismo se usaron los mismos sistemas de detección y marcaje con los mismos volúmenes y tiempos de reacción, haciéndose también dos series con/sin contrateñir.

La incubación se realizó a temperatura ambiente durante toda la noche, con 50µl/sección del Ac 1º (anti PCT) diluido al 1/200 en PBS/saponina 0.1%, unido a un 5% de suero de cabra no inmunizado; o con 50µl/sección de suero de cabra no inmunizado al 5% como control negativo. La dilución usada para el Ac 1º, se consideró la idónea, después de probar diluciones 1/60000, 1/8000, 1/2000, 1/1000, 1/500, 1/300, 1/200 y 1/100 ya que demostró la mayor intensidad de la reacción de forma específica y la menor reacción de fondo. Tras lavar en PBS/saponina 0.1% 3min, tres veces se procedió a la incubación a temperatura ambiente durante 15min con 50µl/sección del Ac 2º biotinizado (Bio\_Genex) de uso inmediato. Lavado en PBS/saponina 0.1% 3min, tres veces.

Los **reactivos** usados en ambas técnicas de IHC fueron:

- Avidina/Biotina: Blocking Kit Avidin/Biotin Vector, Bio\_Genex.
- Peróxido de hidrógeno al 30%, Sigma.
- Tampón buffer salino (PBS) 0.01M, y Saponina, Sigma.
- Sistema cromógeno-sustrato: Peroxidase Conjugated Streptavidin, y sistema de detección: Tetracloruro de diaminobencidina (DAB), Bio\_Genex.
- Suero normal de cabra, Vector laboratories.

*Lo importante de esta técnica, es que es la primera vez que se usa un anticuerpo antiPCT en IHC y en cerebro. Por tanto el tratamiento de este anticuerpo en cuestión requiere unos estudios específicos para asegurar la especificidad de su marcaje.*

*En los estadios iniciales de la puesta a punto de la técnica se probó a profundir los cerebros con SSF frío (en base a otros estudios inmunohistoquímicos con citocinas en SNC (230)), cortar a 6  $\mu$ m, montar en portas, postfijar con acetona a 10°C y usar una concentración de Ac1° 1/4000 (tras probar varias concentraciones). Después de serias dificultades en el mantenimiento de las estructuras, procedimos a perfundir con paraformaldehido al 4% y a crioproteger con sacarosa al 20%. Aún así, la reacción del anticuerpo no terminaba de completarse. Se procedió a aumentar las concentraciones del Ac1° (1/200) y a alargar los tiempos de incubación del anticuerpo secundario y de la estreptavidina/peroxidasa, pero tampoco la reacción terminaba de realizarse; por ello se dio un cambio a la técnica y todo el procedimiento se realizó en freefloating.*

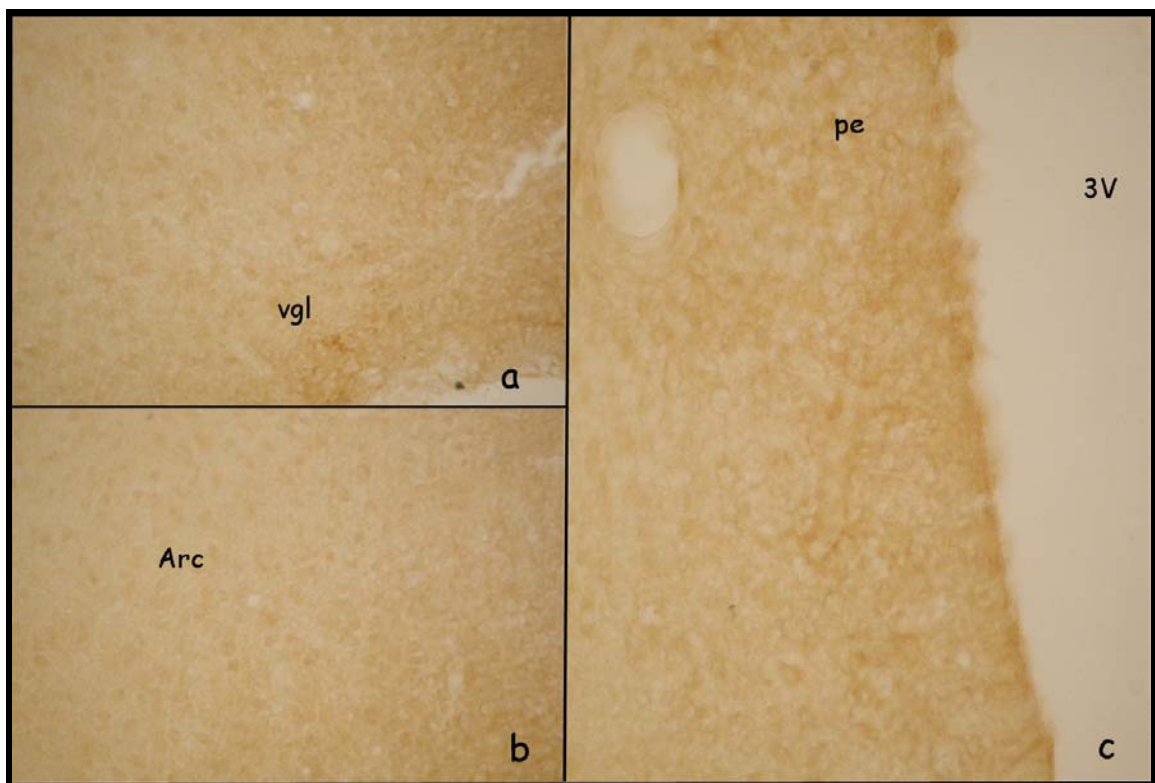
*Teniendo en cuenta que este anticuerpo es específico para PCT humana (homóloga a la de la rata en un 75%), que es monoclonal IgG1k de ratón, lo que puede provocar (y de hecho, provoca, en otros muchos anticuerpos comercializados para inmunohistoquímica) reacciones cruzadas de fondo con el tejido de rata, y la falta de criterios comunes que concreten las zonas en las que existe presencia de PCT (con lo cual es difícil encontrar una zona de control positivo); nos dimos cuenta de que nos enfrentabamos a un difícil reto, demostrar que servía como marcador específico de la presencia de PCT en cerebro de ratas. Para ello se realizaron tres estudios paralelos, el estudio IHC de la presencia de IgG1k en cerebro de ratas, la absorbancia y la aplicación del Animal Research Kit (DAKO) que evita los marcajes cruzados del propio anticuerpo primario.*

### **III.10.2.a. PRESENCIA DE IgG1k EN TEJIDOS:**

*Con el fin de asegurar que el marcaje presente en los tejidos tras tratarlos con el Ac1°, era fruto exclusivo de la fracción ligera específica de nuestro Ac antiPCT, y no de la fracción pesada monoclonal IgG1k de*

ratón; se procedió a la diferenciación directa del marcaje inespecífico que provocaba dicha inmunoglobulina en las secciones. Para ello se suprimió la aplicación del Ac1° y se sustituyó por IgG1k (Mouse IgG1k (MOPC 21), Clarified Ascites, Sigma) a una concentración de 1/20 (acorde con el porcentaje de Ig en el Ac1° concentrado). El resto de la técnica se mantuvo inalterada.

La Ig marcó inespecíficamente diferentes células neuronales, pero dicho marcaje estuvo totalmente ausente en los astrocitos de los tejidos tratados, demostrando que la cadena pesada del Ac1° presenta cierto marcaje inespecífico con el tejido de rata, totalmente diferente al de la cadena ligera específica de PCT (centrado específicamente, como veremos en la fase IV de nuestro estudio, en los astrocitos). (Fig. 25)

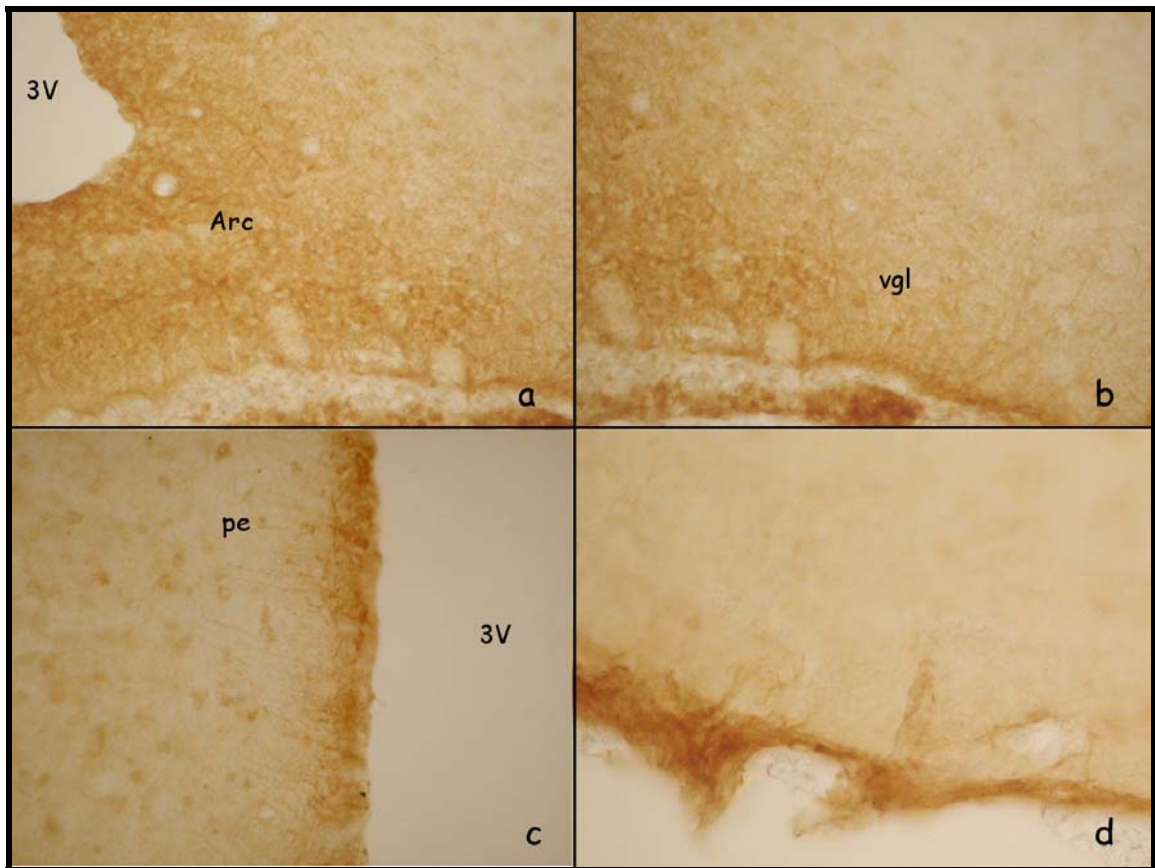


**Figura 25.** Marcaje de IgG1k de ratón en cerebros coronales de ratas normales. **a:** marcaje neuronal de fondo en el hipotálamo lateral y en la zona de la limitante glial ventral (vgl), 200x, **b:** inmunorreactividad cruzada en el núcleo arcuato (Arc), 200x, **c:** marcaje inespecífico en la zona del núcleo periventricular hipotalámico (pe), alrededor del tercer ventrículo (3V), 400x

### **III. 10.2.b. ADSORBANCIA:**

*Para cerciorarnos de que nuestro Ac1° se une específicamente a PCT, se procedió a preincubar el Ac1° 1/200 con PCT humana (Bachem) al 1/20 durante 2h a TA. A continuación se incubó durante toda la noche con los tejidos. El resto de la técnica se mantuvo inalterada.*

*El Ac1° se unió mayoritariamente a la PCT humana, disminuyendo notablemente el marcaje de PCT sobre los tejidos, probándose así la especificidad de la cadena ligera del Ac-antiPCT. Sin embargo, la parte inespecífica de la cadena pesada, continuó provocando reacciones de fondo. (Fig. 26)*



**Figura 26.** *Marcaje del Ac-antiPCT preincubado durante 2h a TA con PCT humana en cortes coronales de ratas normales. a: marcaje débil de los astrocitos arciformes presentes en el núcleo arcuato (Arc), 400x, b: discreto marcaje de la limitante glial ventral (vgl), 400x, c: ligera inmunorreactividad de los endimocitos cercanos al núcleo periventricular hipotalámico (pe), que rodean al tercer ventrículo (3V), 400x, d: discreto marcaje de los astrocitos piales, 400x.*



### **III. 10. 2. c. ANIMAL RESEARCH KIT, DAKO:**

*Este kit permite el uso de anticuerpos primarios de ratón del isotipo IgG e IgM en cualquier tejido, ya que evita las reacciones cruzadas que puedan existir entre distintas especies. El kit contiene una antiIg de ratón biotinizada y suero normal de ratón Ig. Así, indirectamente sabemos si existe algún marcaje inespecífico de la cadena pesada del Ac1°.*

*Con una sencilla ecuación, en la que es necesaria saber la concentración de la Ig del Ac1° concentrado y la dilución del Ac1°, sabemos la cantidad del anticuerpo secundario biotinizado y de suero normal de ratón a usar.*

*Con nuestro anticuerpo las ecuaciones quedan así:*

---

**Volumen de trabajo:**  $n^{\circ}$  de tejidos (6)  $\times$  volumen de Ac1° (100 $\mu$ l) = 600 $\mu$ l

**Volumen de Ac1° concentrado:**

*Volumen de trabajo (600 $\mu$ l)  $\times$  dilución final del Ac1° (1/200) = 3 $\mu$ l*

**Volumen de reactivo biotinizado:**

*Concentración de Ig (100)/100  $\times$  volumen Ac1° concentrado (3 $\mu$ l) = 3 $\mu$ l*

**Volumen de reactivo bloqueante:**

*Volumen de trabajo (600 $\mu$ l) / 25 = 24 $\mu$ l*

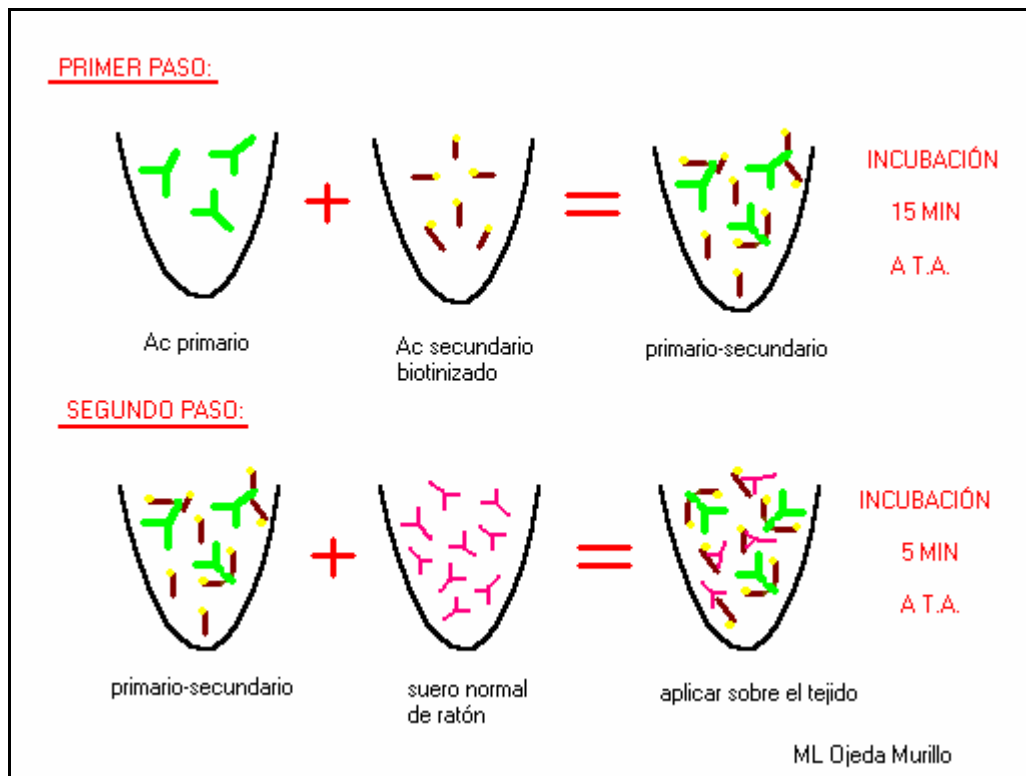
**Volumen de diluyente:**

*Volumen de trabajo (600 $\mu$ l) - Volumen de Ac1° concentrado (3 $\mu$ l) - Volumen de reactivo biotinizado (3 $\mu$ l) - Volumen de reactivo bloqueante (24 $\mu$ l) = 570 $\mu$ l*

---

*Así, se preincubaron los 570 $\mu$ l de diluyente con los 3 $\mu$ l del Ac1° y los 3 $\mu$ l del Ac2° biotinizado durante 15 min a TA. A continuación se unieron con los 24 $\mu$ l del suero de ratón durante 5min. (Fig. 27)*

Dicha mezcla se dispuso sobre los tejidos y se incubaron durante toda la noche. Igualmente se hicieron controles negativos usando IgG1k al 1/20 en lugar de nuestro Ac1°.

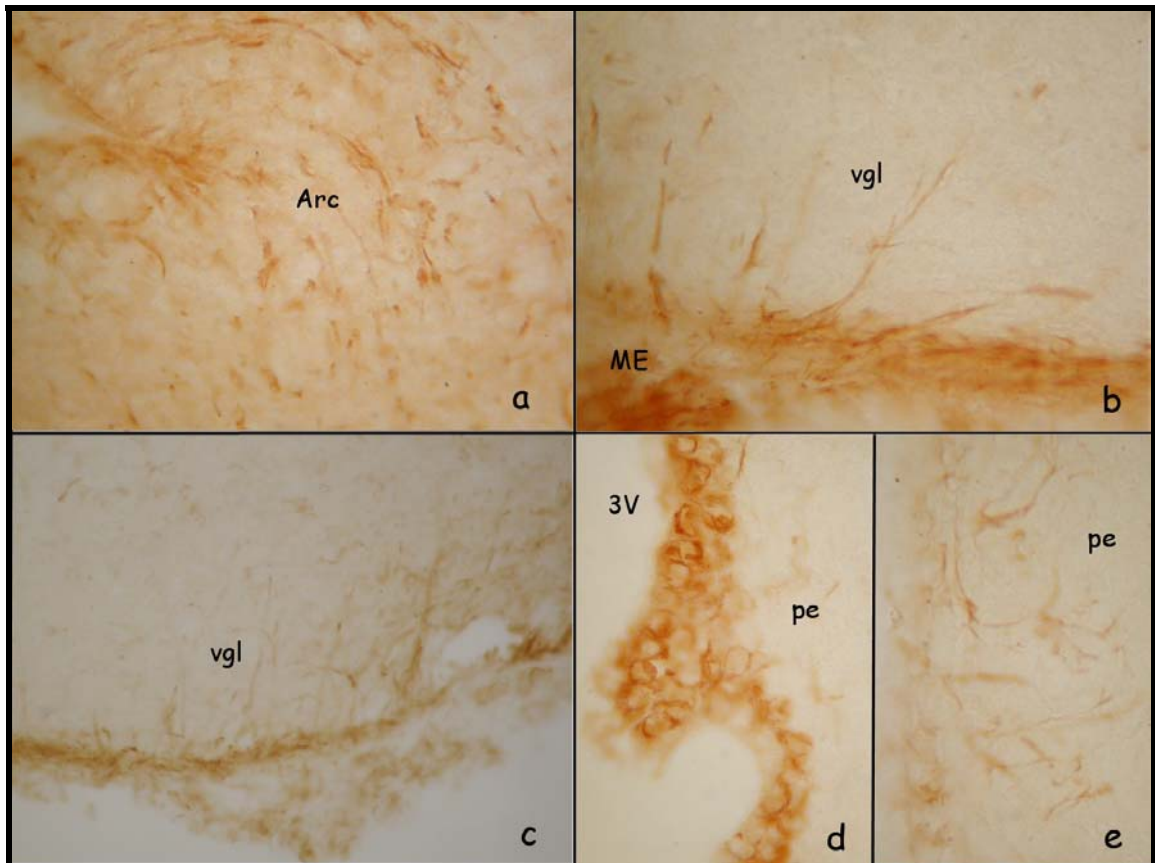


**Figura 27.** Esquema de la preparación de los reactivos usados para la realización de IHC de detección de PCT, con el kit "Animal Research Kit" de DAKO

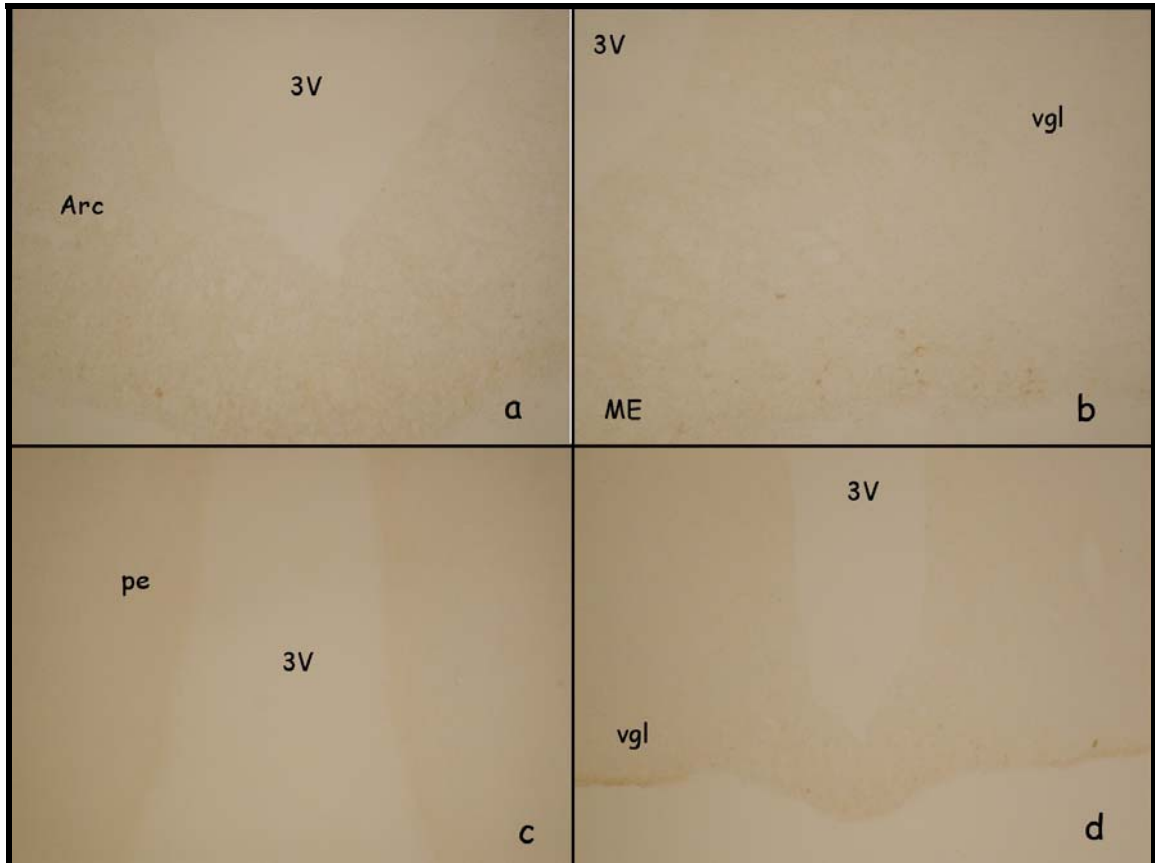
El resto de la técnica fue similar a la usada con anterioridad, a excepción de que en este caso el Ac2° se añadió antes del primario, como hemos expuesto anteriormente.

Los resultados obtenidos bloquearon toda reacción inespecífica de la cadena pesada de nuestro Ac1°, mostrando sobre los tejidos exclusivamente el marcaje específico de la cadena ligera, es decir de PCT. Dicho marcaje corroboró los resultados obtenidos tras la aplicación de IgG1k, diferenciándose así claramente las reacciones inespecíficas de las específicas. (Fig. 28)

Los controles negativos con IgG1k al 1/20 en lugar del Ac1°, presentaron total ausencia de inmunreactividad, corroborando la reactividad específica de la cadena ligera del Ac-antiPCT por los astrocitos. (Fig. 29)



**Figura 28.** Inmunorreactividad del Ac-antiPCT sin el marcaje de fondo provocado por la IgG1k de su cadena pesada, mediante la utilización del Animal Research Kit de Dako, en cortes coronales de ratas normales. **a:** marcaje de los astrocitos arciformes presentes en el núcleo arcuato (Arc), 400x, **b:** inmunorreactividad positiva de PCT en la limitante glial ventral (vgl) colindante con la eminencia media (ME), 1000x, **c:** marcaje de los astrocitos de la limitante glial ventral (vgl) lateral, 400x, **d:** ependimocitos inmunorreactivos que rodean al tercer ventrículo (3V), 1000x, y **e:** marcaje de los astrocitos del núcleo periventricular hipotalámico (pe), 1000x.



**Figura 29.** Marcaje de IgG1k de ratón en cerebros coronales de ratas normales, tratados con Animal Research Kit, Dako. **a:** ausencia de inmunorreactividad en el núcleo arcuato (Arc), 400x, **b:** ausencia de marcaje inespecífico en la zona de la eminencia media (ME), 400x, **c:** inmunorreactividad inespecífica negativa en la zona del núcleo periventricular hipotalámico (pe), 200x, **d:** ausencia de marcaje en la limitante glial ventral (vgl), 100x.

### **III.11. PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

**-FASE PRIMERA:** ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE PCT EN SANGRE de animales con endotoxemia, y análisis de la correlación entre los niveles plasmáticos de PCT y la fiebre inducida por LPS. Para ello:

*Se determinarán los niveles plasmáticos de PCT en sangre y se correlacionarán con la magnitud y duración de la respuesta febril inducida por LPS. La sangre se extraerá intracardiamente a las ratas a diferentes intervalos de tiempo: 1, 3, 6, 12, y 24 h tras la inyección de LPS 100 µg/kg i.p., y se medirán los valores plasmáticos de PCT mediante una técnica cuantitativa de inmunoluminometría.*

*Las horas elegidas para la determinación de los niveles de PCT en plasma, coinciden con el tiempo de latencia, de inicio de la primera fase, de inicio de la segunda fase, de descenso y de recuperación de la fiebre provocada por bacterias gram negativas en ratas (228).*

*Se harán 5 grupos (n=6 animales) por tiempo, lo que sumado a un grupo control hace un total de 6 grupos (n= 36).*

**-FASE SEGUNDA:** ESTUDIO DOSIS/RESPUESTA, para ver la relación a nivel central existente entre temperatura corporal y PROCALCITONINA en animales sanos. Lo cual consiste en:

*Hacer un estudio de la curva Dosis/Respuesta de la PCT frente a los cambios de temperatura registrado en animales sanos. Para ello microinyectaremos diferentes dosis de PCT: 2, 4, 10, 100 y 1000ng/5µL icv y mediremos los cambios de temperatura en animales sanos.*

*A pesar de ser especies distintas, debida a las extensas referencias de los valores séricos de PCT en humanos, y las escasas en animales, las dosis se eligieron en base a los valores de PCT humanos encontrados en: infecciones virales (0.2ng/ml), periodos postquirúrgicos, shock*

cardiogénicos y otros procesos no infecciosos (0.4ng/ml), infecciones bacterianas (2ng/ml), infecciones bacterianas severas (20ng/ml) y sepsis (200ng/ml) (Tabla 2). Al administrarse centralmente, las dosis de PCT se calcularon teniendo en cuenta trabajos previos, que demuestran que las dosis necesarias de una sustancia endógena con neuroactividad, son aproximadamente mil veces menores en SNC que en la periferia para ejercer la misma acción.

Se administrará una dosis control (LCR) y dos dosis de PCT por cada grupo de animales (n=6), lo que sumará un total de 3 grupos y 18 animales. En todos los grupos experimentales se estudiaron los cambios temporales de temperatura durante el tiempo que duró el experimento.

**-FASE TERCERA: 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 (-). Para ello se procedió a:

Administrar PCT 2, 4, 10, 100 y 1000ng icv media hora antes de la inyección de LPS 50µg/kg/ml i.p. (para ver su efecto profiláctico) y ver los cambios de temperatura producidos en el animal.

Administraremos una sola dosis de LPS en cada experimento, pues su administración repetida produce tolerancia frente a la fiebre (76, 231). Por tanto haremos seis grupos, uno control (LCR icv + LPS i.p.) y los demás con PCT a las distintas dosis (PCT icv + LPS i.p.), lo que hace un total de 36 animales. En todos los grupos experimentales se estudiaron los cambios temporales de temperatura durante el tiempo que duró el experimento

La dosis elegida (LPS 50µg) fue en base a diversos trabajos que demuestran que esta dosis es suficiente para provocar cambios en el estado normal de la rata (15, 80, 232, 233).

**-FASE CUARTA: ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO**, para detectar la presencia y localización de la PCT en el SNC. Esta fase consiste en:

*Administrar LPS 100µg/kg i.p. a ratas para provocarles fiebre, y luego perfundirlas a las 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, que son los tiempos correspondientes al tiempo de latencia, de inducción, de valor máximo, de estabilización y de recuperación de los niveles plasmáticos de PCT en ratas con infección por bacterias gram negativas (234). A continuación se les extraerá el cerebro para su estudio inmunohistoquímico.*

*En total, habrá diez grupos (n= 4), dos cerebros cortados en coronal y otros dos en sagital, en total 40 animales:*

*Grupo 1: ratas tratadas con LPS 100 µg/kg i.p. y perfundidas a la hora.*

*Grupo 2: ratas tratadas con LPS 100 µg/kg i.p. y perfundidas a las 3h.*

*Grupo 3: ratas tratadas con LPS 100 µg/kg i.p. y perfundidas a las 6h.*

*Grupo 4: ratas tratadas con LPS 100 µg/kg i.p. y perfundidas a las 12h.*

*Grupo 5: ratas tratadas con LPS 100 µg/kg i.p. y perfundidas a las 24h.*

*Grupo 6: ratas controles tratadas con SSF y perfundidas a la hora.*

*Grupo 7: ratas controles tratadas con SSF y perfundidas a las 3h.*

*Grupo 8: ratas controles tratadas con SSF y perfundidas a las 6h.*

*Grupo 9: ratas controles tratadas con SSF y perfundidas a las 12h.*

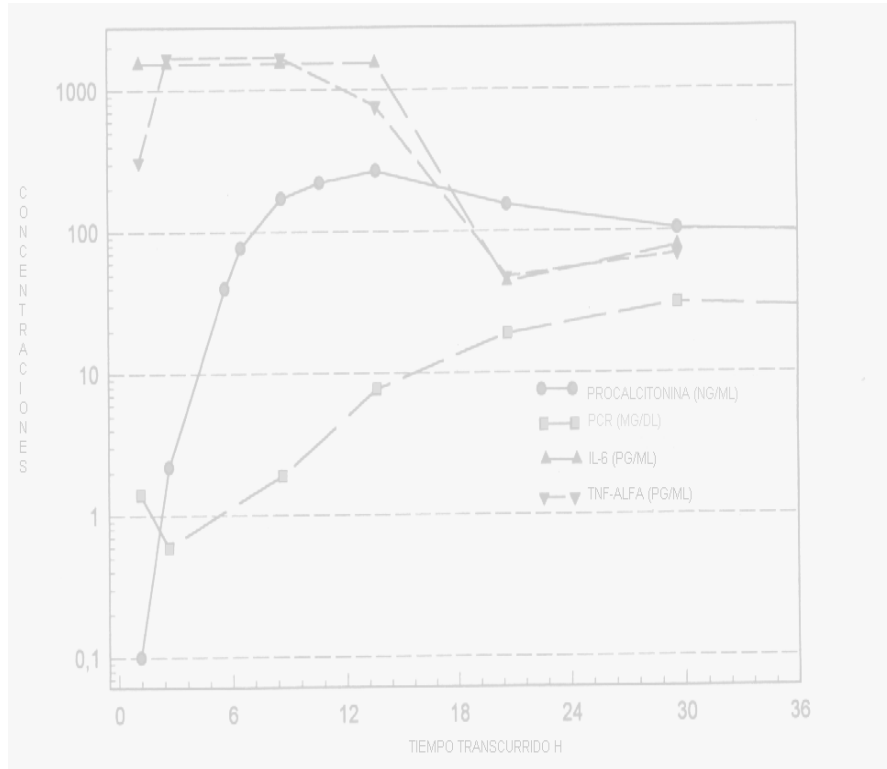
*Grupo 10: ratas controles tratadas con SSF y perfundidas a las 24h.*

**ESQUEMA PROTOCOLO DE TRABAJO**

FASE I	FASE II	FASE III	FASE IV
<b>NIVELES PLASMÁTICOS</b>	<b>ESTUDIO D/R SOBRE TC</b>	<b>ESTUDIO D/R SOBRE FIEBRE</b>	<b>IHC</b>
<i>n=6</i>	<i>n=6</i>	<i>n=6</i>	<i>n=4</i>
LPS 1h	PCT 2 y 4ng	LPS+PCT 2ng	LPS 1h
LPS 3h	PCT 10 y 100ng	LPS+PCT 4ng	LPS 3h
LPS 6h	PCT 1000ng	LPS+PCT 10ng	LPS 6h
LPS 12h	SSF	LPS+PCT 100ng	LPS 12h
LPS 24h		LPS+PCT 1000ng	LPS 24h
SSF		LPS+LCR	SSF
<b>N=36</b>	<b>N=24</b>	<b>N=36</b>	<b>N=40</b>

**N = 136**





## RESULTADOS

## **IV. RESULTADOS**

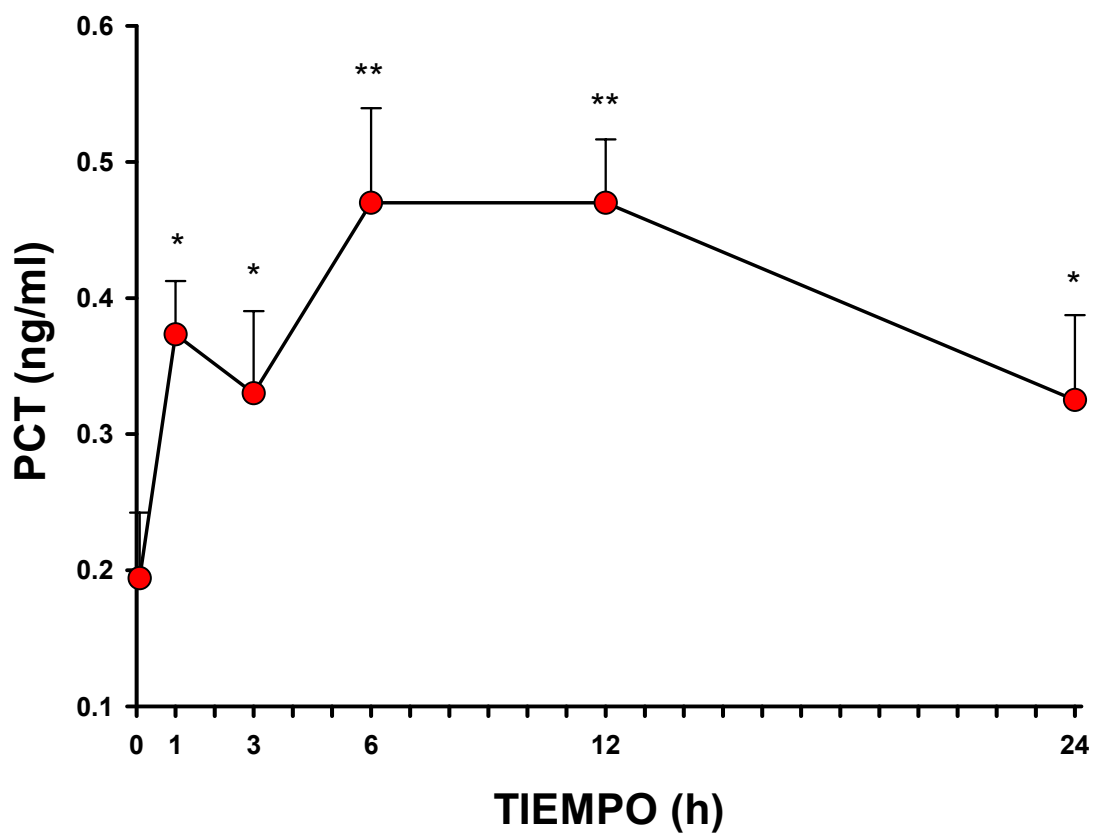
### **IV.1. NIVELES PLASMÁTICOS DE PCT EN RATAS NORMALES Y TRATADAS CON LPS 100 $\mu$ g/kg ip.**

*El estudio de los niveles plasmáticos de PCT en ratas tratadas con LPS (100 $\mu$ g/kg i.p.) a diferentes horas (1, 3, 6, 12, 24 h) presentó significación versus los niveles de PCT en ratas normales.*

*Los niveles plasmáticos de PCT en ratas normales fueron de  $0.19 \pm 0.048$  ng/ml.*

*La administración de LPS (100 $\mu$ g/kg i.p.) en ratas, provocó un aumento rápido y significativo ( $p < 0.05$ ) de los niveles plasmáticos de PCT a la primera hora ( $0.37 \pm 0.04$  ng/ml). Este incremento significativo se mantuvo a las 3h ( $0.34 \pm 0.04$  ng/ml) y alcanzó su valor máximo ( $0.47 \pm 0.07$  ng/ml) a las 6h manteniéndose en meseta hasta las 12h ( $0.47 \pm 0.046$  ng/ml) tras la inyección de LPS. El nivel plasmático máximo fue significativamente mayor que el presentado por el grupo control (ratas normales), ( $p < 0.01$ ). Como demuestra la figura 30, a partir de las 12h ( $0.47 \pm 0.046$  ng/ml) y hasta las 24h ( $0.32 \pm 0.04$  ng/ml), los niveles plasmáticos de PCT comenzaron a disminuir progresivamente.*

*Así, los valores plasmáticos de PCT de muestras sanguíneas recogidas a la 1h, 3h, 6h, 12h y 24h en ratas tratadas periféricamente con una dosis de LPS 100 $\mu$ g/kg i.p., demostraron comportarse de un modo parecido a los valores de PCT en humanos afectados por bacteriemias, aunque los valores plasmáticos en ratas fueron inferiores a los humanos.*



*Figura 30. Cambio de los valores plasmáticos de PCT (ng/ml) registrados en ratas antes (0h) y después de ser tratadas periféricamente con LPS 100 $\mu$ g/kg i.p. a la 1, 3, 6, 12 y 24h. (n= 6 animales por grupo). La significación se representó: \*= p< 0.05 y \*\*= p< 0.01 .*

#### IV.2.EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE PCT SOBRE LA TEMPERATURA CORPORAL. ESTUDIO DOSIS RESPUESTA.

El estudio dosis/respuesta de la administración icv de diferentes dosis de PCT (2, 4, 10, 100, 1000ng/5 $\mu$ l) modificó significativamente la temperatura corporal ( $T_c$ ) en comparación con el grupo control tratado con LCR.

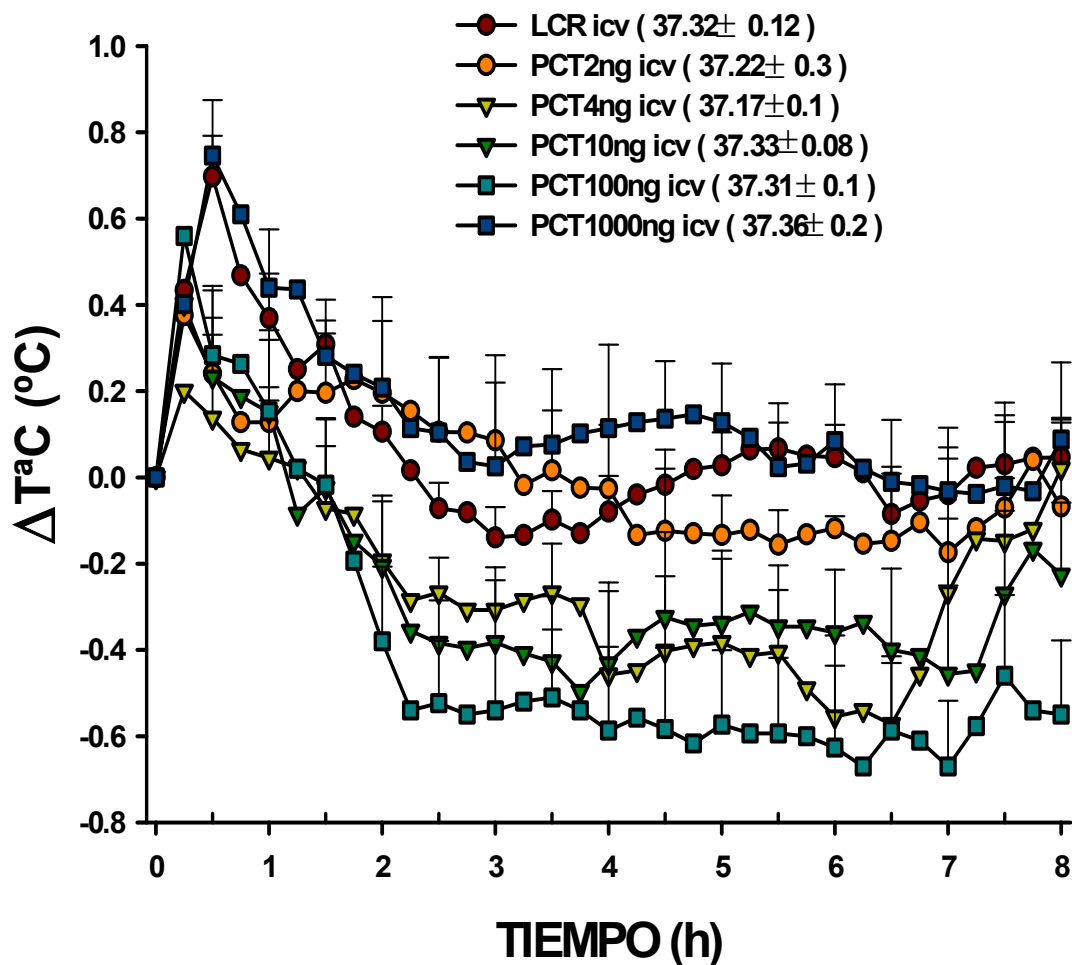


Figura 31. Efecto sobre la  $T_c$  de la microinyección icv de: LCR y PCT: 2, 4, 10, 100 y 1000ng/5 $\mu$ l (n=6). Entre paréntesis, en esta y las siguientes figura, se representa la  $T_c$  de cada grupo de animales previo a la administración de cualquier sustancia ( $^{\circ}$ C).

*La figura 31 demuestra que la administración icv de PCT a dosis 2ng/5µl en ratas con una Tc de  $37.22 \pm 0.3$  °C, no produjo cambios significativos en la Tc a lo largo de las 8h que duró el experimento, en comparación con el grupo control (LCR).*

*Sin embargo, esta dosis presentó significación en cuanto a la Tc de los grupos tratados con 4ng ( $p < 0.0001$ ), 10ng ( $p < 0.001$ ), 100ng ( $p < 0.0001$ ) y de 1000ng ( $p < 0.01$ ) de PCT administrados icv.*

*La inyección icv de PCT a dosis 4ng/5µl, en animales con una Tc de  $37.17 \pm 0.1$  °C, modificó significativamente la Tc durante las 8h que duró el experimento, en comparación con el grupo control ( $p < 0.0001$ ).*

*La dosis central de 4ng/5µl de PCT, también presentó significación con las dosis de 100 ( $p < 0.05$ ) y 1000 ( $p < 0.0001$ ) ng/5µl de PCT administrada icv. Sin embargo, no modificó significativamente la Tc en comparación con el grupo de animales tratados con 10ng de PCT icv.*

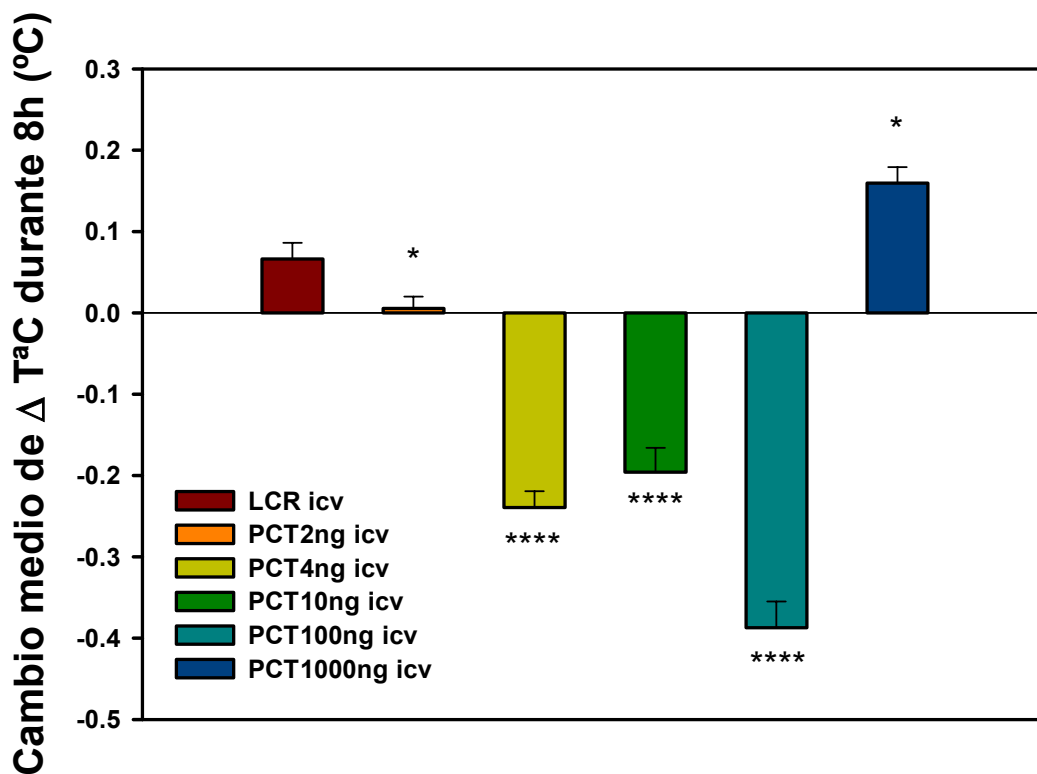
*La dosis 10ng/5µl de PCT icv, en ratas con Tc de  $37.33 \pm 0.08$  °C, durante las 8h que duró el experimento, disminuyó significativamente la Tc en comparación con los animales controles ( $p < 0.0001$ ).*

*La administración de 10ng de PCT icv, presentó significación con la Tc de los grupos tratados con 100ng ( $p < 0.05$ ) y 1000ng ( $p < 0.0001$ ) de PCT icv.*

*La microinyección icv de 100ng de PCT, en animales con Tc de  $37.31 \pm 0.1$  °C, modificó significativamente la Tc en comparación con el grupo control, durante las 8h que duró el experimento ( $p < 0.0001$ ).*

*Esta dosis de 100ng/5µl icv, también presentó significación con la Tc de los animales tratados con 1000ng de PCT icv ( $p < 0.0001$ ).*

*El tratamiento central con 1000ng de PCT en animales con Tc  $37.36 \pm 0.2$  °C, no provocó cambios significativos en la Tc en comparación con los animales controles, durante las 8h que duró el experimento.*



**Figura 32.** Histograma de los valores medios de  $\Delta T_c \pm SEM$  durante 8h tras la inyección icv de: LCR y PCT (2, 4, 10, 100 y 1000 ng/5 $\mu$ l) (n=6). La significación versus grupo control se representó: \* =  $p < 0.05$  y \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ .

Como demuestra la figura 32, las ratas tratadas con 2ng de PCT presentaron un incremento de la  $T_c$  media, a lo largo de las 8h que duró el experimento de  $0.005 \pm 0.015$  °C. El análisis comparativo del grupo control (LCR) respecto a la dosis 2ng/5 $\mu$ l reveló la existencia de diferencias significativas en la  $T_c$  media ( $p < 0.05$ ).

Así mismo, la  $T_c$  media alcanzada por las ratas tratadas con 2ng de PCT también mostró significación respecto a la  $T_c$  media alcanzada por los animales tratados con dosis 4, 10, 100 y 1000ng/5 $\mu$ l de PCT icv ( $p < 0.0001$ ).

Los animales tratados con **4ng** de PCT icv, presentaron, durante las 8 h que duró el experimento, una disminución de la Tc media de  $-0.24 \pm 0.02$  °C, significativamente menor que el presentado por la administración icv de LCR ( $0.066 \pm 0.02$  °C) ( $p < 0.0001$ ).

Del mismo modo, la Tc media alcanzada por las ratas tratadas icv con **4ng** de PCT, también presentó significación con las Tc medias de los grupos microinyectados con **100ng** ( $p < 0.01$ ) y **1000ng** ( $p < 0.0001$ ) de PCT icv. No así, con la Tc media de los animales tratados con **10ng** de PCT icv.

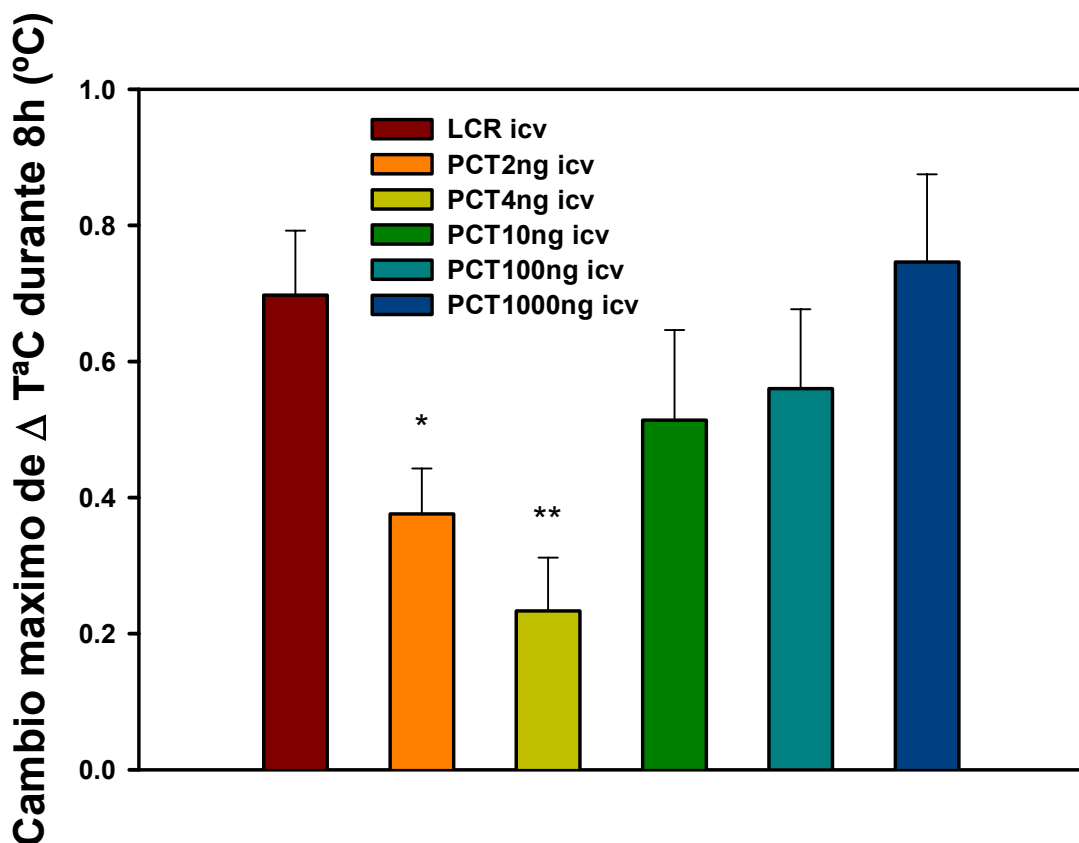
Los animales inyectados icv con **10ng** de PCT, presentaron una disminución de la Tc media, a lo largo de las 8h que duró el experimento, de  $-0.19 \pm 0.03$ °C, significativamente menor que el del grupo control ( $p < 0.0001$ ).

La Tc media de estos animales presentó significación con los valores de Tc media de las ratas tratadas con **100ng** ( $p < 0.01$ ) y **1000ng** ( $p < 0.0001$ ) de PCT icv.

Los animales tratados con **100ng** de PCT icv, presentaron, durante las 8 h que duró el experimento, una disminución de la Tc media de  $-0.38 \pm 0.03$  °C, por tanto la Tc media de este grupo fue significativamente menor que la Tc media de las ratas controles ( $p < 0.0001$ ).

Como demuestra la figura 32 esta Tc media también presenta significación con respecto a la Tc media de los animales microinyectados con **1000ng** de PCT icv ( $p < 0.0001$ ).

Las ratas tratadas con **1000ng** de PCT icv, presentaron un aumento de la Tc media, a lo largo de las 8h que duró el experimento, de  $0.16 \pm 0.02$  °C. Este valor fue ligeramente significativo con respecto al de los animales controles ( $p < 0.05$ ).



**Figura 33.** Histograma del incremento máximo (media  $\pm$  SEM) de la Tc tras la inyección icv de: LCR y PCT (2, 4, 10, 100 y 1000 ng/5 $\mu$ l) (n=6). La significación versus grupo control se representó: \* =  $p < 0.05$  y \*\* =  $p < 0.01$ .

El incremento máximo de Tc en animales tratados con **2ng** de PCT icv ( $0.37 \pm 0.06$  °C), como demuestra la figura 33, fue significativamente menor que el  $\Delta Tc$  máxima alcanzada por el grupo de animales controles, tratados con LCR icv ( $0.69 \pm 0.09$  °C) ( $p < 0.05$ ).

La Tc máxima alcanzada tras la administración icv de 2ng de PCT, también presentó significación con la Tc máxima que presentaron los animales tratados con 1000ng de PCT icv ( $p < 0.05$ ); con respecto a las demás dosis no existió significación.

El incremento máximo de temperatura corporal del grupo tratado con **4ng** de PCT icv ( $0.23 \pm 0.09$  °C), fue significativamente menor que el incremento máximo de Tc de ratas controles ( $p < 0.01$ ).



*La Tc máxima alcanzada tras la administración icv de 4ng de PCT, también presentó significación con la Tc máxima que presentaron los animales tratados con 100ng ( $p < 0.05$ ) y 10ng de PCT icv ( $p < 0.01$ ); con respecto a las demás dosis no existió significación.*

*Como demuestra la figura 33, el incremento máximo de Tc en animales tratados con 10ng de PCT icv fue de  $0.51 \pm 0.13$  °C. El análisis comparativo de los valores máximos de Tc a esta dosis con el grupo control, no reveló la existencia de diferencias significativas.*

*El incremento máximo de la Tc del grupo microinyectado con 100ng de PCT icv ( $0.56 \pm 0.11$  °C) no presentó diferencias significativas con respecto a los animales controles.*

*Tras la administración de 1000ng de PCT icv, los animales presentaron un valor de incremento máximo de Tc de  $0.74 \pm 0.13$  °C. El análisis comparativo del control con esta dosis no reveló la existencia de diferencias significativas.*

#### **IV.2.A. DOSIS 2 ng/5 $\mu$ l:**

*La administración icv de PCT a dosis 2ng/5 $\mu$ l, en ratas con una Tc de  $37.22 \pm 0.3$  °C, no modificó significativamente la Tc. En la figura 34 se observa la disminución de Tc (con respecto al LCR) desde media hora hasta la hora tras la administración de PCT ( $p < 0.05$ ), siendo esta diferencia máxima a los 30 minutos ( $p < 0.05$ ). Igualmente también se encontró disminución de Tc desde las cinco horas y cuarto hasta las seis horas y cuarto ( $p < 0.05$ ). La Tc alcanzó su valor mínimo a las cinco horas y media.*

*A esta dosis, la PCT presenta un tiempo de latencia de aproximadamente una hora.*

Las ratas tratadas con 2ng de PCT icv, presentaron un aumento en la Tc media, a lo largo de las 8h que duró el experimento de  $0.005 \pm 0.015$  °C. Como se ve en la figura 32, la Tc media alcanzada por las ratas tratadas con 2ng de PCT mostró significación con respecto a la Tc media alcanzada por los animales tratados LCR icv ( $p < 0.05$ ) y con dosis 4, 10, 100 y 1000ng/5µl de PCT icv ( $p < 0.0001$ ).

El incremento máximo de Tc en los animales tratados con 2ng de PCT, se alcanzó al cuarto de hora ( $0.37 \pm 0.06$  °C). Como demuestra la figura 33, este incremento de Tc presentó significación ( $p < 0.05$ ) con el alcanzado tras la administración icv de LCR ( $0.69 \pm 0.09$  °C) que apareció a la media hora. El incremento máximo de Tc alcanzado tras la administración de 2ng de PCT icv, también presentó significación con el de los animales tratados con PCT 1000ng ( $p < 0.05$ ); con respecto a las demás dosis no existió significación.

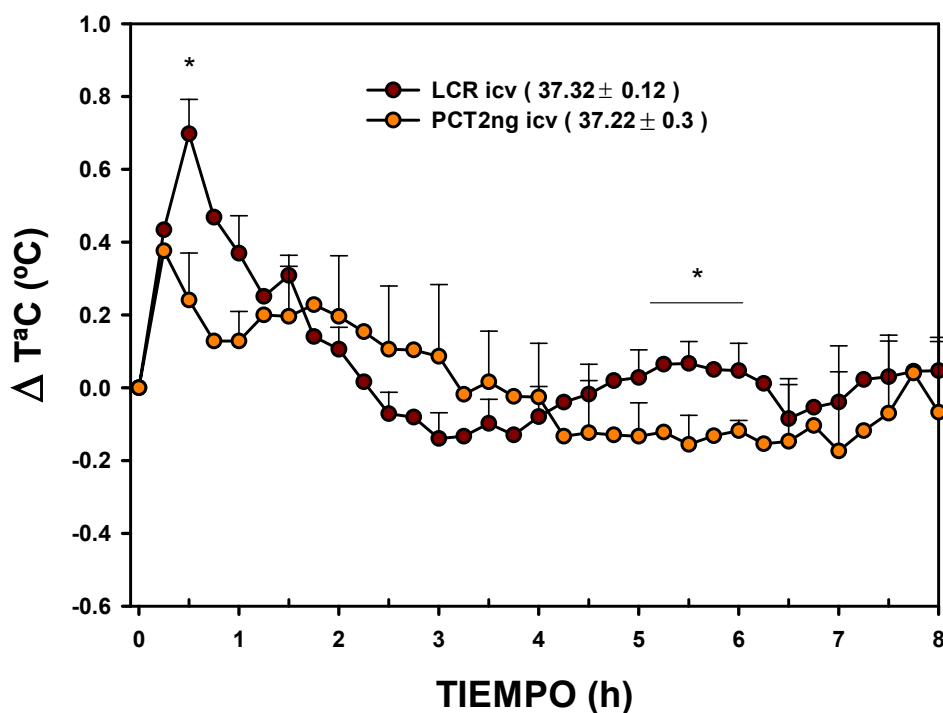


Figura 34. Efecto sobre la Tc de la microinyección icv de: LCR y PCT 2ng/5µl (n=6). La significación se representó: \* =  $p < 0.05$ .

*Esta dosis además de presentar diferencias en la Tc, durante las 8h que duró el experimento, con los animales controles ( $p < 0.05$ ), presentó significación con la administración de 4ng ( $p < 0.0001$ ), 10ng ( $p < 0.001$ ), 100ng ( $p < 0.0001$ ) y 1000ng ( $p < 0.01$ ) de PCT icv.*

#### **IV.2.B. DOSIS 4ng/5 $\mu$ l:**

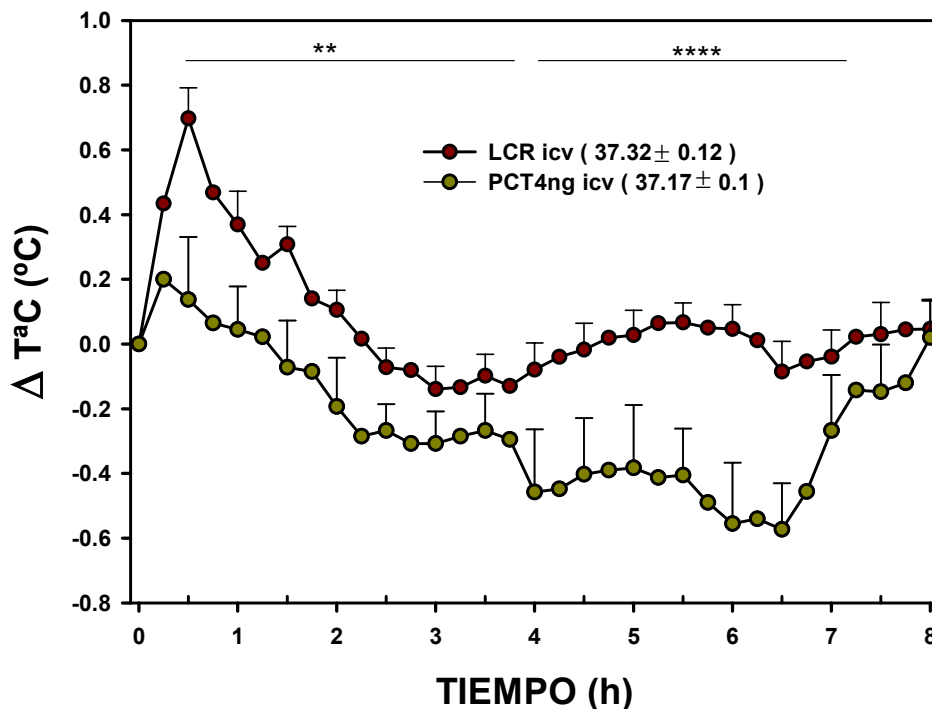
*La inyección icv de PCT a dosis 4ng/5 $\mu$ l, en animales con una Tc de  $37.17 \pm 0.1$  °C, modificó significativamente la Tc ( $p < 0.0001$ ). En la figura 35 se observa una ligera disminución de la Tc (con respecto al LCR) desde la primera media hora hasta las dos horas ( $p < 0.01$ ), apareciendo la máxima significación a la media hora ( $p < 0.01$ ). De 2 a 4h se mantuvo esa disminución ( $p < 0.01$ ) y de 4 a 7h se hizo más patente ( $p < 0.0001$ ). Con esta dosis, el valor mínimo de Tc se alcanzó a las seis horas y media.*

*Al administrar esta dosis observamos un tiempo de latencia de aproximadamente una hora.*

*Los animales tratados con 4ng de PCT icv, presentaron, durante las 8h que duró el experimento, una modificación de la Tc media ( $-0.24 \pm 0.02$  °C) significativamente menor que la presentada por la administración icv de LCR ( $p < 0.0001$ ). Así mismo, la Tc media alcanzada a esta dosis, también guardó significación con la Tc de los grupos tratados con 2ng ( $p < 0.0001$ ), 100ng ( $p < 0.01$ ) y 1000ng ( $p < 0.0001$ ) de PCT icv. No así, con la dosis PCT 10ng/5 $\mu$ l. (Fig. 32).*

*El incremento máximo de Tc a esta dosis, se alcanzó al cuarto de hora ( $0.23 \pm 0.09$  °C) y fue el menor de todos los grupos. Como se observa en la figura 33, este valor máximo de Tc fue significativamente menor que la Tc máxima alcanzada por los animales controles ( $p < 0.01$ ), y los tratados con 100 ( $p < 0.05$ ) y 1000ng ( $p < 0.01$ ) de PCT icv.*

*La dosis de PCT 4ng/5 $\mu$ l además de provocar diferencias en la Tc durante las 8h que duró el experimento, con los animales controles ( $p < 0.0001$ ), presentó significación con la administración de 2ng ( $p < 0.0001$ ), 100ng ( $p < 0.05$ ) y 1000ng ( $p < 0.0001$ ) de PCT icv. No así con la dosis PCT 10ng/5 $\mu$ l. (Fig. 31).*



**Figura 35.** Efecto sobre la Tc de la microinyección icv de: LCR y PCT 4ng/5µl (n=6). La significación se representó: \*\*= p< 0.01 y \*\*\*\*= p< 0.0001.

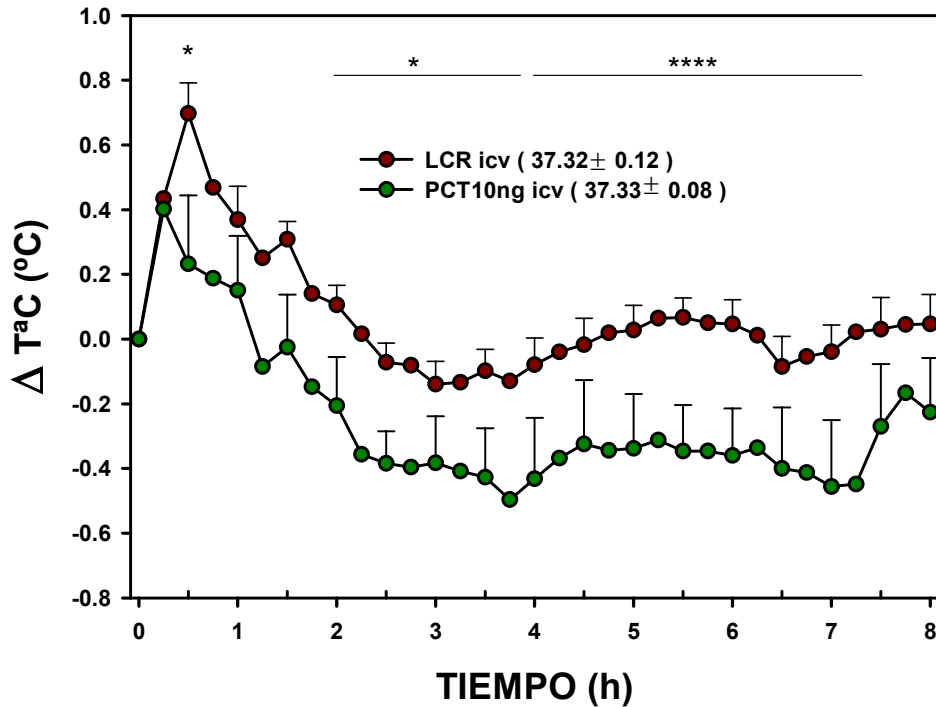
#### **IV.2.C. DOSIS 10ng/5µl:**

La administración de PCT a dosis 10ng/5µl icv, en ratas con Tc de  $37.33 \pm 0.08$  °C, es capaz de producir un cambio significativo en la Tc con respecto al grupo control (p< 0.0001). En la figura 36 se observa una disminución de la Tc a la media hora (p< 0.05). Desde las dos a las cuatro horas la Tc disminuyó significativamente (p< 0.05), disminución que se hizo más significativa de cuatro a siete horas y media (p< 0.0001). El valor mínimo de Tc se alcanzó a las 4h.

A esta dosis, la PCT presenta un tiempo de latencia de aproximadamente 60 min.

Los animales tratados con 10ng de PCT, presentaron una modificación de la Tc media, a lo largo de las 8h que duró el experimento, de  $-0.19 \pm 0.03$  °C, significativamente menor que la del grupo control (p< 0.0001). Así mismo, estas modificaciones de la Tc media presentaron significación

con los valores de animales tratados con dosis de 2 ( $p < 0.0001$ ), 100 ( $p < 0.01$ ) y 1000 ng/5 $\mu$ l ( $p < 0.0001$ ) de PCT icv. No así, con la de ratas microinyectadas con 4ng de PCT icv. (Fig. 32)



**Figura 36.** Efecto sobre la  $T_c$  de la microinyección icv de: LCR y PCT 10ng/5 $\mu$ l ( $n=6$ ). La significación se representó: \*= $p < 0.05$  y \*\*\*\*= $p < 0.0001$ .

El incremento máximo de  $T_c$  con esta dosis se alcanzó a la media hora ( $0.51 \pm 0.13$  °C). Como se ve en la figura 33, el análisis comparativo de los valores máximos de  $T_c$  de esta dosis con las demás y el control, no reveló la existencia de diferencias significativas.

Los animales tratados con 10 ng de PCT icv, presentaron diferencias significativas en la  $T_c$  durante las 8h que duró el experimento, con el grupo control ( $p < 0.0001$ ) y los tratados con PCT 2 ( $p < 0.0001$ ), 100 ( $p < 0.05$ ) y PCT 1000 ( $p < 0.0001$ ) ng/5 $\mu$ l icv. No así con la dosis PCT 4ng/5 $\mu$ l icv. (Fig. 31)

#### **IV.2.D. DOSIS 100ng/5 $\mu$ l:**

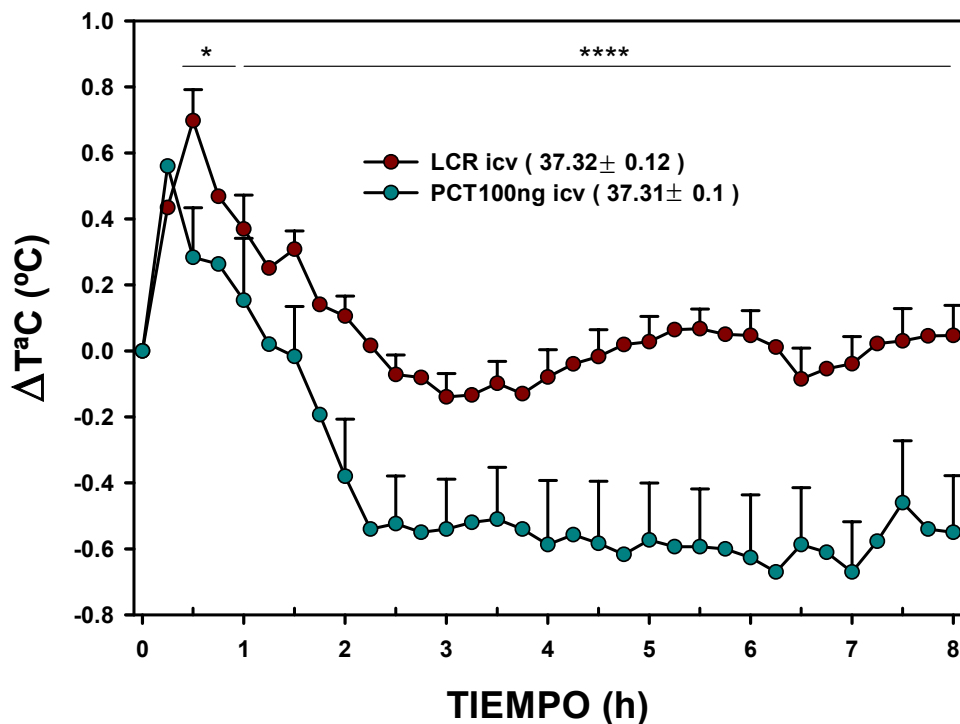
*La inyección icv de PCT a dosis 100ng/5 $\mu$ l, en animales con Tc de  $37.31 \pm 0.1$  °C, modificó significativamente la Tc con respecto al grupo control ( $p < 0.0001$ ). En la figura 37 se observa una disminución de la Tc provocada por esta dosis desde la primera media hora hasta la hora y media ( $p < 0.05$ ), alcanzando la máxima significación a los 30min ( $p < 0.05$ ). La disminución de la Tc se hace más patente desde la primera hora y media a las ocho horas ( $p < 0.0001$ ). A esta dosis la Tc alcanzó su valor mínimo a las 7 h.*

*Al administrar esta dosis observamos un tiempo de latencia de aproximadamente media hora, el menor registrado hasta el momento a todas las dosis utilizadas.*

*Los animales tratados con 100ng de PCT, presentaron, durante las 8 h que duró el experimento, un valor medio de incremento de Tc de  $-0.38 \pm 0.03$  °C, significativamente menor que los presentados al administrar LCR icv ( $p < 0.0001$ ). Esta modificación de la Tc media también presentó significación con las de los grupos tratados con 2ng ( $p < 0.0001$ ), 4ng ( $p < 0.01$ ), 10ng ( $p < 0.01$ ) y 1000ng ( $p < 0.0001$ ) de PCT icv. De todas las dosis administradas, es la dosis 100ng/5 $\mu$ l la que presenta un  $\Delta Tc$  media menor.*

*El incremento máximo de la Tc ( $0.56 \pm 0.11$  °C) apareció al cuarto de hora tras la administración de 100ng de PCT icv. El análisis comparativo de este incremento máximo de Tc con el del resto de los grupos (incluido el control), tan solo fue significativamente mayor que el incremento de Tc máxima de los animales tratados con 4ng de PCT icv.*

*Los animales tratados con 100 ng de PCT icv, presentaron diferencias significativas en la Tc durante las 8h que duró el experimento, con los animales controles ( $p < 0.0001$ ), y con los animales tratados con 2ng ( $p < 0.0001$ ), 4ng ( $p < 0.05$ ), 10ng ( $p < 0.05$ ) y 1000ng ( $p < 0.0001$ ) de PCT icv. (Fig. 31)*



**Figura 37.** Efecto sobre la Tc de la microinyección icv de: LCR y PCT 100ng/5 $\mu$ l (n=6). La significación se representó: \*= p< 0.05 y \*\*\*\*= p< 0.0001.

#### **IV.2.E. DOSIS 1000 ng/5 $\mu$ l:**

En la figura 38 se observa que la administración de 1000ng de PCT icv, en animales con Tc  $37.36 \pm 0.2$  °C, no modificó significativamente la Tc con respecto al grupo control. La Tc mínima con este tratamiento se alcanzó a las 7h. El tiempo de latencia fue aproximadamente de 1h.

Las ratas tratadas con 1000ng de PCT, presentaron un aumento de la Tc media, a lo largo de las 8h que duró el experimento, de  $0.16 \pm 0.02$  °C, significativamente distintos a los encontrados en ratas tratadas con LCR icv. Este valor fue el mayor registrado en todos los grupos. Como demuestra la figura 32 la Tc media de las ratas tratadas con 1000ng de PCT fue significativamente mayor que las de animales inyectados con 2ng

( $p < 0.0001$ ), 4ng ( $p < 0.0001$ ), 10ng ( $p < 0.0001$ ) y 100ng ( $p < 0.0001$ ) de PCT icv.

A esta dosis, el incremento máximo de Tc se alcanzó a la media hora, siendo  $0.74 \pm 0.13$  °C, el mayor de todos los grupos. El análisis comparativo de la Tc máxima del grupo tratado con 1000ng de PCT con la Tc máxima del tratado con 2ng de PCT icv presentó significación ( $p < 0.05$ ). Esta Tc máxima también fue significativamente mayor que la Tc máxima de los animales tratados con 4ng de PCT icv. (Fig. 33)

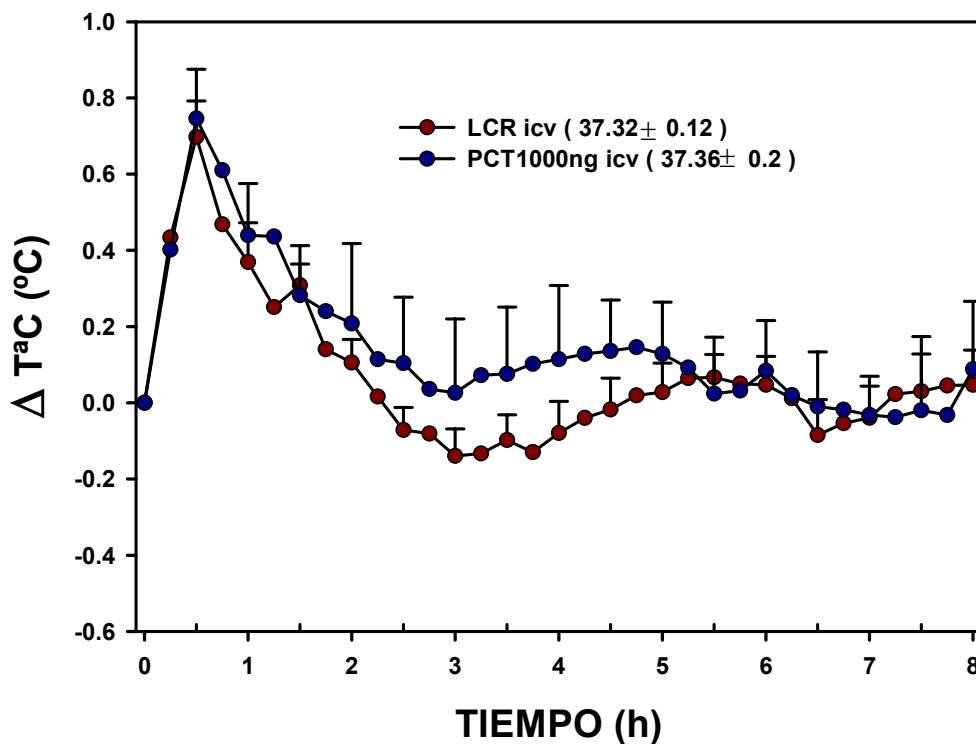


Figura 38. Efecto sobre la Tc de la microinyección icv de: LCR y PCT 1000ng/5μl (n=6).



**Tabla 4.** Cuadro resumen de los diferentes tiempos (t) a las distintas dosis de PCT y LCR icv en ratas sanas. La significación de los valores presentados a las distintas horas versus el grupo control, fueron: \*= p< 0.05, \*\*= p< 0.01, \*\*\*= p< 0.001 y \*\*\*\*= p< 0.0001.

	<b>LCR icv</b>	<b>PCT2ng icv</b>	<b>PCT4ng icv</b>	<b>PCT10ng icv</b>	<b>PCT100ng icv</b>	<b>PCT1000ng icv</b>
<b>t de latencia</b>		1h	1h	1h	30min	1h
<b>t de Tc máxima</b>	30min	15min*	15min**	30min	15min	30min
<b>t de Tc mínima</b>	3h	<b>6.5h</b>	<b>5.5h</b>	<b>4h</b>	<b>7h</b>	<b>7.5h</b>
<b>Acción sobre la Tc</b>	=	↓	↓	↓	↓	=
<b>t de acción sobre la Tc</b>		0.5-1h* 5-6h*	0.5-4h** <b>4-7h****</b>	0.5* 2-4h* <b>4-7.5h****</b>	0.5-1.5h* <b>1.5-8h****</b>	

### IV.3.EFECTO CENTRAL DE LA PCT SOBRE LA FIEBRE INDUCIDA POR ENDOTOXINA BACTERIANA (GRAM NEGATIVA).

La administración icv de PCT a distintas dosis (2, 4, 10, 100, 1000ng/5 $\mu$ l) produjo cambios significativos sobre la Tc. Dichos cambios no respondieron a un modelo dosis-respuesta propiamente dicho.

Por ello, para estudiar el posible efecto de la PCT sobre la fiebre de origen bacteriana Gram (-), el pretratamiento icv con PCT 30 min previa a la administración periférica de LPS (50 $\mu$ g/kg i.p.), se hizo con todas las dosis usadas en la fase anterior del experimento. (Fig.39)

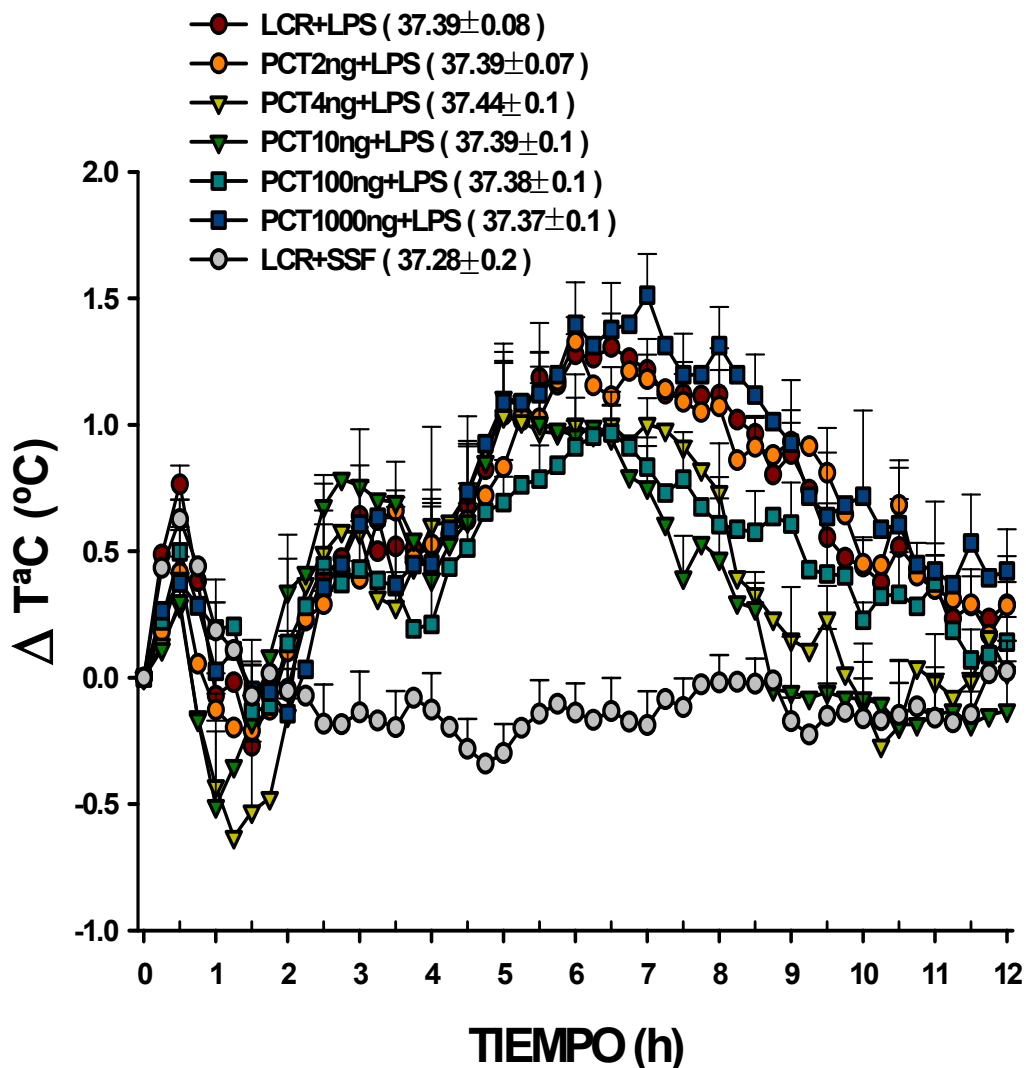


Figura 39. Efecto del pretratamiento icv con LCR y PCT (2, 4, 10, 100, 1000ng/5 $\mu$ l), sobre la fiebre en ratas inyectadas con LPS (50 $\mu$ g /kg i.p.) (n= 6).

*Como demuestra la figura 39, el pretratamiento central con 2, 4, 10, 100 y 1000ng de PCT, modificó significativamente la Tc en ratas tratadas con endotoxina, en comparación con el grupo control de animales endotoxémicos pretratados con LCR icv.*

*La administración icv de PCT a dosis 2ng/5µl 30 minutos previa a la inyección de LPS en ratas con una Tc de  $37.39 \pm 0.07$  °C, no produjo cambios significativos en la respuesta febril, a lo largo de las 12h que duró el experimento, en comparación con el grupo control pretratado con LCR.*

*Sin embargo, la variación de la Tc en animales tratados con esta dosis, presentó significación con las ratas endotoxémicas pretratadas con 4ng ( $p < 0.01$ ), 10ng ( $p < 0.01$ ), y 100ng de PCT ( $p < 0.01$ ).*

*El pretratamiento icv con PCT a dosis 4ng/5µl previo a la administración de endotoxina, provocó en animales con Tc de  $37.44 \pm 0.1$  °C, diferencias significativas en la Tc durante las 12 horas que duró el experimento, con respecto al grupo control ( $p < 0.01$ ).*

*Igualmente, el grupo pretratado con esta dosis, también presentó significación con respecto a la Tc del grupo microinyectado con 1000ng de PCT icv y LPS i.p. ( $p < 0.001$ ).*

*El pretratamiento icv con PCT a dosis 10ng/5µl previo a la administración de endotoxina, provocó en animales con Tc de  $37.39 \pm 0.1$  °C, diferencias significativas en la respuesta febril durante las 12 horas que duró el experimento, con respecto al grupo control ( $p < 0.001$ ).*

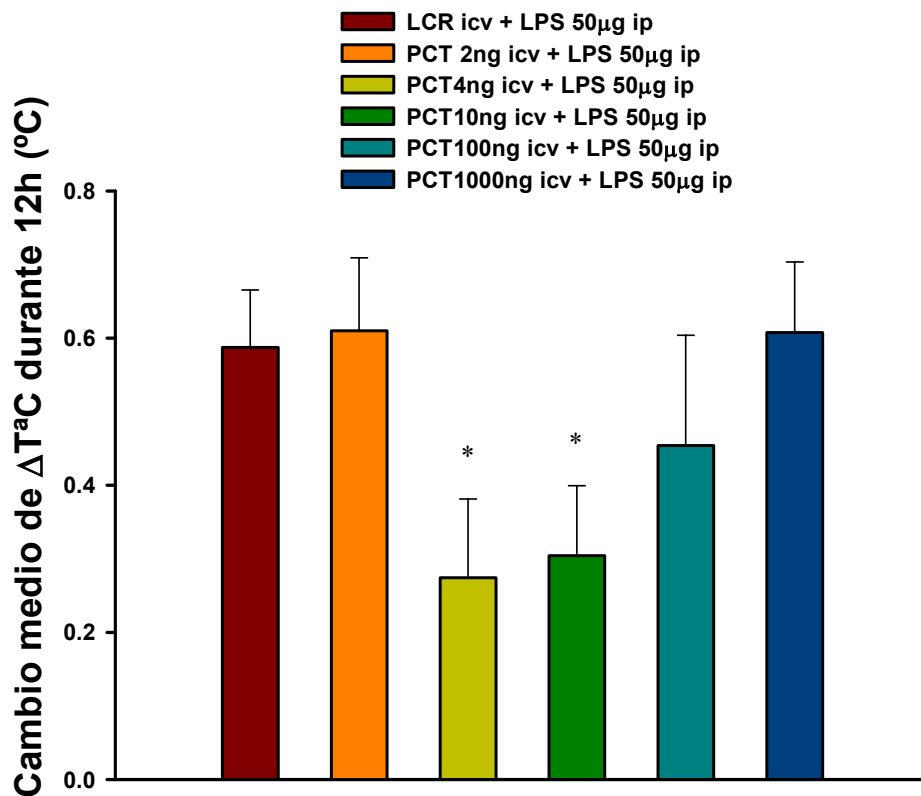
*Igualmente, el grupo tratado con esta dosis, presentó significación con respecto a la Tc del grupo microinyectado con 1000ng de PCT icv y LPS i.p. ( $p < 0.0001$ ).*

*La administración icv de PCT a dosis 100ng/5µl 30 minutos previa a la inyección de LPS en ratas con una Tc de  $37.38 \pm 0.1$  °C, modificó*

significativamente la respuesta febril, a lo largo de las 12h que duró el experimento, en comparación con el grupo control ( $p < 0.01$ ).

Así mismo, también fue significativa la variación de la  $T_c$  en animales endotoxémicos pretratados con 100ng de PCT con respecto a los pretratados con 1000ng de PCT ( $p < 0.01$ ).

El pretratamiento icv con PCT a dosis 1000ng/5 $\mu$ l previo a la administración de endotoxina en animales con  $T_c$  de  $37.44 \pm 0.1$  °C, no provocó diferencias significativas en la la respuesta febril durante las 12 horas que duró el experimento, con respecto al grupo control.



**Figura 40.** Histograma de los valores medios de  $\Delta T_c \pm SEM$  durante 12h tras el pretratamiento icv de: LCR y PCT (2, 4, 10, 100 y 1000 ng/5 $\mu$ l) en ratas endotoxémicas (LPS 50 $\mu$ g/kg i.p.) (n=6). La significación versus el grupo control se representó: \* =  $p < 0.05$ .

Como demuestra la figura 40, las ratas endotoxémicas pretratadas con **2ng** de PCT presentaron un aumento de la Tc media, a lo largo de las 12h que duró el experimento de  $0.61 \pm 0.09$  °C. El análisis comparativo del grupo control (LCR icv + LPS ip) respecto a dicha dosis no reveló la existencia de diferencias significativas en la Tc media .

Sin embargo, la Tc media alcanzada por las ratas pretratadas con **2ng** de PCT icv + LPS ip fue significativamente superior a la Tc media alcanzada por los animales tratados con **4 ng** ( $p < 0.05$ ) y **10 ng** ( $p < 0.05$ ) de PCT icv + LPS ip.

Los animales tratados con **4ng** de PCT icv 30 minutos previos a la inyección de LPS , presentaron, durante las 12 h que duró el experimento, un incremento de la Tc media de  $0.27 \pm 0.1$  °C, significativamente menor que el presentado por el grupo control ( $0.58 \pm 0.08$  °C) ( $p < 0.05$ ).

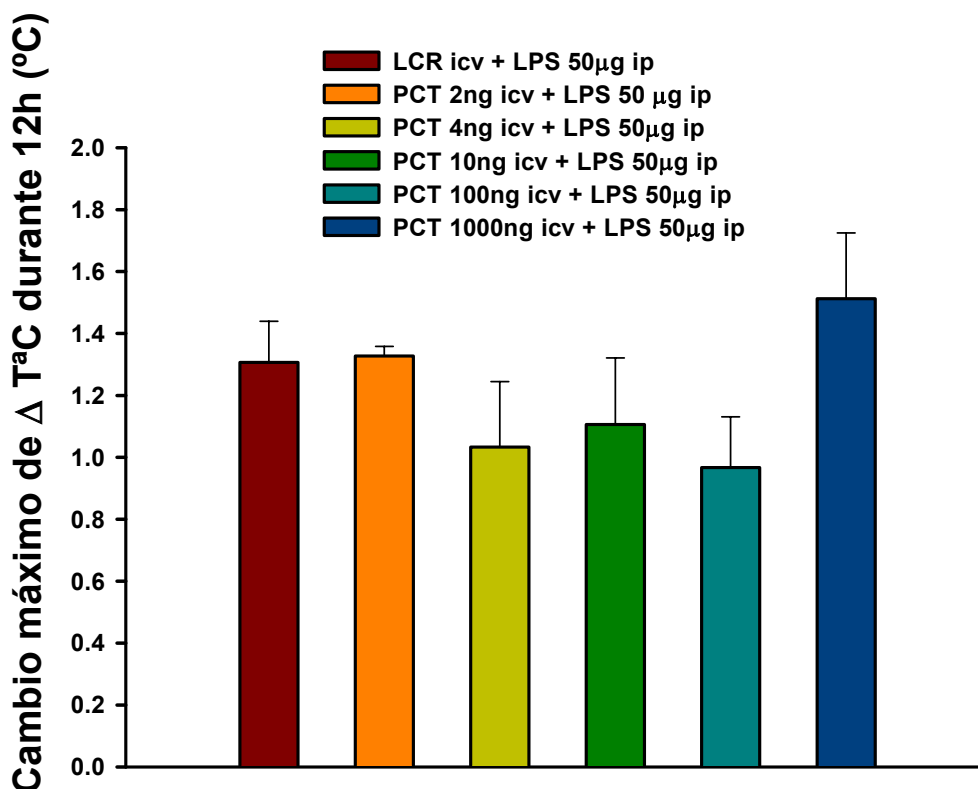
Del mismo modo, la Tc media alcanzada por las ratas endotoxémicas pretratadas con **4ng** de PCTicv, fue significativamente inferior a la Tc media del grupo microinyectado con **1000ng** ( $p < 0.05$ ) de PCT icv + LPS ip.

Los animales inyectados icv con **10ng** de PCT 30min previo a la administración ip de LPS, presentaron una modificación de la Tc media, a lo largo de las 12h que duró el experimento, de  $0.3 \pm 0.09$  °C, significativamente menor que el del grupo control ( $p < 0.05$ ).

Este valor de Tc media también fue significativamente menor que el valor de Tc media de las ratas inyectadas con LPS ip, y pretratadas con **1000ng** de PCT icv ( $p < 0.05$ ).

Los animales endotoxémicos pretratados con **100ng** de PCT icv, presentaron, durante las 12 h que duró el experimento, un valor medio de incremento de Tc de  $0.45 \pm 0.14$  °C, no significativo con respecto al del grupo control.

Las ratas tratadas con **1000ng** de PCT icv 30 min previo a la administración ip de LPS, presentaron un aumento de la Tc media, a lo largo de las 12h que duró el experimento, de  $0.6 \pm 0.07$  °C. Este valor no fue significativo con respecto al de los animales controles.



*Figura 41. Histograma del incremento máximo (media  $\pm$  SEM) de la Tc en ratas endotoxémicas tras el pretratamiento icv de: LCR y PCT (2, 4, 10, 100 y 1000 ng/5µl) (n=6).*

Como demuestra la figura 41, el incremento máximo de Tc en animales endotoxémicos pretratados con **2ng** de PCT icv ( $1.32 \pm 0.03$  °C), no presentó significación con el alcanzado por el grupo de animales controles, ( $1.3 \pm 0.13$  °C).

Este incremento máximo de Tc alcanzado tras la administración icv de 2ng de PCT + LPS ip, fue significativamente mayor que el presentado por animales endotoxémicos pretratados con 100ng de PCT icv ( $p < 0.05$ ); con respecto a las demás dosis no existió significación.

*El incremento máximo de Tc de los animales tratados con 4ng de PCT icv 30 minutos previo a la inyección de LPS ( $1.03 \pm 0.2$  °C), no presentó significación con respecto al incremento máximo de Tc de ratas controles.*

*El incremento máximo de Tc en animales endotoxémicos pretratados con 10ng de PCT icv fue de  $1.10 \pm 0.21$  °C. El análisis comparativo de los valores máximos de Tc a esta dosis con el grupo control, no reveló la existencia de diferencias significativas.*

*El incremento máximo de la Tc del grupo microinyectado con 100ng de PCT icv 30 minutos previo a la administración de LPS ( $0.96 \pm 0.16$  °C) no presentó diferencias significativas con respecto al de los animales controles.*

*Sin embargo, este incremento de Tc máximo fue significativamente menor que el encontrado en el grupo de animales tratados con 1000ng de PCT icv + LPS ip ( $p < 0.05$ ).*

*Tras el pretratamiento con 1000ng de PCT icv, los animales endotoxémicos presentaron un incremento máximo de Tc de  $1.5 \pm 0.2$  °C. El análisis comparativo del control con esta dosis no reveló la existencia de diferencias significativas.*

#### **IV.3.A. PCT DOSIS 2ng/5ul (icv) + LPS 50μg/kg (i.p.):**

*La administración central de PCT 2ng 30min previa a la administración periférica de endotoxina (LPS 50μg/kg i.p.), no produjo cambios significativos en la respuesta febril inducida por la administración icv de LCR y la endotoxina a lo largo de las 12h que duró el experimento.*

*Por tanto a esta dosis se mantiene el periodo de latencia de 30min y el patrón febril que presenta una primera fase (2-4h) y una segunda (5-12h) provocada por la endotoxina.*

*La única diferencia en la fiebre producida por bacterias Gram (-) en ratas pretratadas con PCT 2ng icv o LCR, radica en el tiempo de latencia. Aunque en ambos casos aparece a los 30min, la administración de PCT 2ng icv produce una disminución significativa de la Tc a los 30min ( $p < 0.01$ ). Todos estos datos se pueden apreciar en la figura 42.*

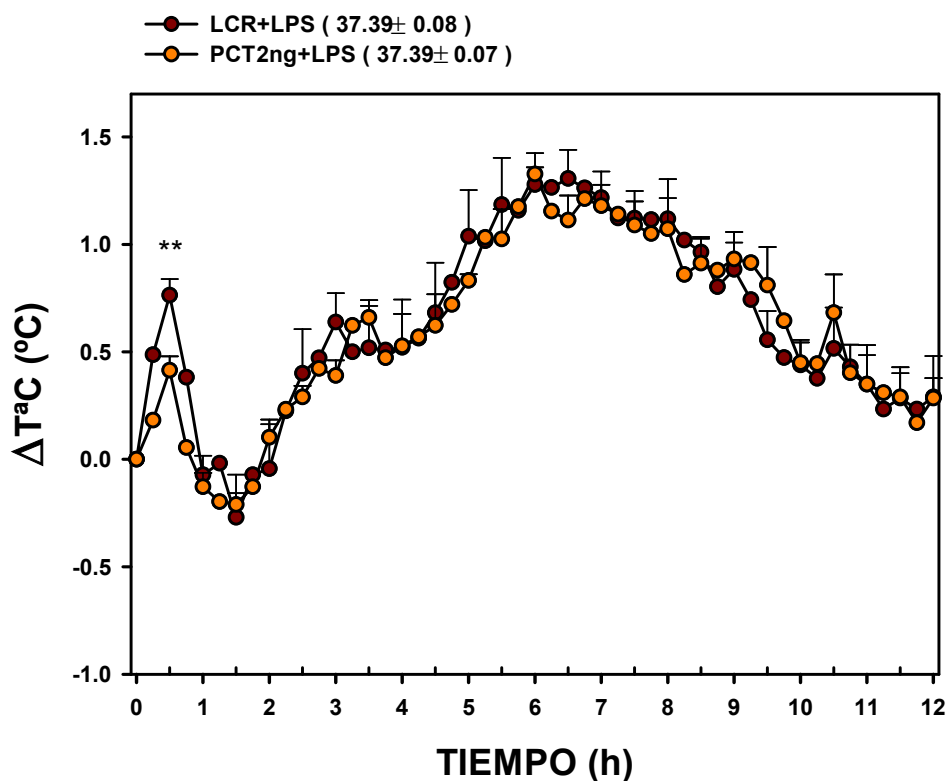
*La Tc mínima registrada tras la administración de 2ng de PCT, apareció a la primera hora y media tras la inyección de LPS.*

*El aumento de la Tc media en ratas endotoxémicas pretratadas con 2ng de PCT a lo largo de las 12h que duró el experimento, fue de  $0.61 \pm 0.09$  °C, el mayor de todos los grupos. Aunque no presentó significación con respecto al grupo control, si fue significativamente mayor que el de los grupos pretratados con 4 y 10 ng de PCT icv ( $p < 0.05$ ), como demuestra la figura 40.*

*El incremento máximo de la Tc en ratas tratadas con 2ng de PCT icv + LPS i.p., apareció a las 6h tras la administración de la endotoxina y fue de  $1.32 \pm 0.03$ °C. Este valor no fue significativamente distinto al de los animales tratados con LCR ( $1.30 \pm 0.13$ ) que apareció 30min mas tarde, como demuestra la figura 41.*

*Los animales tratados con 2ng de PCT icv + LPS i.p., presentaron diferencias significativas en la fiebre, durante las 12h que duró el estudio, con otros grupos. Así, las ratas de este grupo padecieron un proceso febril similar al padecido por los animales controles, pero superior al sufrido por animales tratados con 4ng, 10ng y 100ng de PCT icv + LPS ip ( $p < 0.01$ ).*





**Figura 42.** Efecto de la preadministración central de: LCR y PCT 2ng/5μl sobre la fiebre inducida por endotoxina bacteriana (LPS 50μg/kg i.p.) (n= 6). La significación con respecto al grupo control, se expresó \*\*= p< 0.01.

#### **IV. 3. B. PCT DOSIS 4ng/5μl (icv) + LPS 50μg/kg (i.p.):**

La administración central de PCT 4ng 30min previa a la administración periférica de endotoxina (LPS 50μg/kg i.p.), produjo cambios significativos en la respuesta febril inducida por la administración icv de LCR y la endotoxina a lo largo de las 12h del experimento (p< 0.01).

Concretamente a esta dosis el tiempo de latencia se retrasó a las 2h, se mantuvo la primera fase de la fiebre (2-4h) y disminuyó significativamente (p< 0.01) la segunda (5-12h) provocada por la endotoxina bacteriana. Todo esto se puede apreciar en la figura 43.

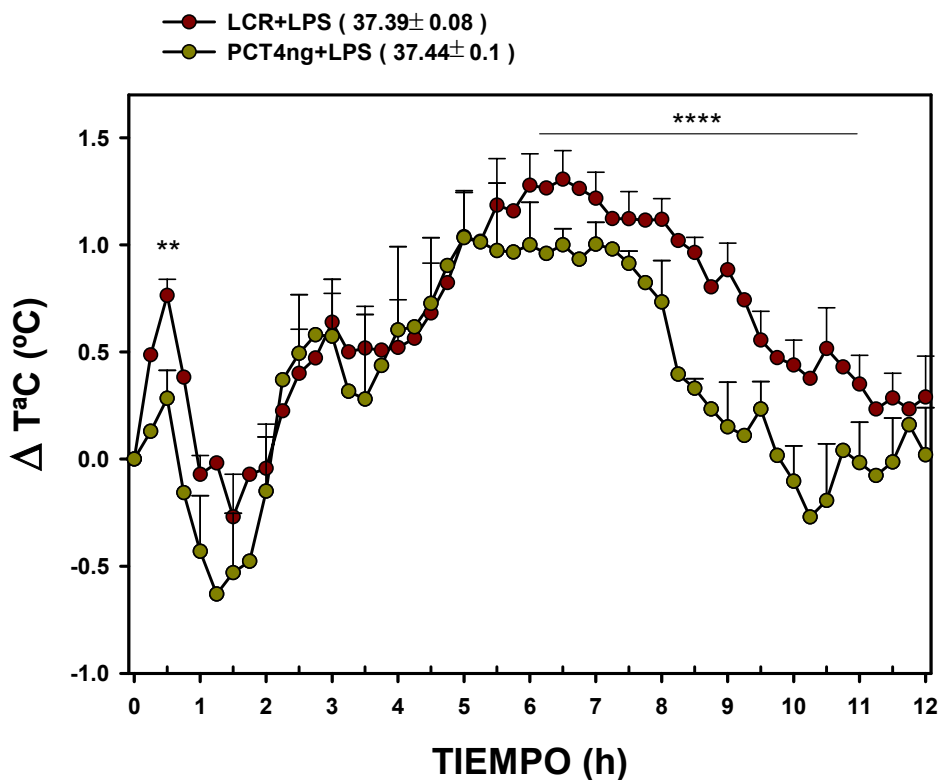
*La Tc mínima registrada tras la administración de PCT 4ng apareció a la 1h y 30min.*

*El incremento de la Tc media en ratas endotoxémicas pretratadas con 4ng de PCT icv, a lo largo de las 12h que duró el experimento, fue de  $0.27 \pm 0.21$  °C, siendo el valor menor de todos los grupos. Este valor fue significativamente menor que el presentado por el grupo control ( $0.58 \pm 0.08$  °C), por el grupo pretratado con 2ng de PCT ( $0.61 \pm 0.09$  °C) y por el pretratado con 1000ng de PCT ( $0.6 \pm 0.09$  °C) ( $p < 0.05$ ), como demuestra la figura 40.*

*El incremento máximo de la Tc en ratas tratadas con 4ng de PCT icv + LPS i.p., apareció a las 5h tras la administración de la endotoxina y fue de  $1.03 \pm 0.21$  °C. Estos valores no fueron significativamente distinto al de los animales tratados con LCR ( $1.30 \pm 0.13$  °C) que aparecieron a las 6h y 30min tras la administración de LPS, como demuestra la figura 41.*

*En un estudio individual realizado sobre los cambios de temperatura recogidos durante las 12h que duró el experimento, se encontraron diferencias significativas entre la administración de PCT 4ng icv + LPS i.p. y LCR icv + LPS i.p. Concretamente a los 30min (tiempo de latencia de la endotoxina) ( $p < 0.01$ ). El resto de los cambios significativos se registraron en la segunda etapa de la fiebre inducida por LPS, así, desde las 6 a las 11h se registró una disminución significativa ( $p < 0.0001$ ) de la Tc. Estudiando cada 30 min las diferencias de Tc con respecto al grupo control, se encontraron disminuciones significativas de la fiebre inducida por LPS a las **8h y 30min** ( $p < 0.0001$ ), a las 9h ( $p < 0.01$ ), a las 9h y 30min ( $p < 0.05$ ), a las 10h ( $p < 0.01$ ) y a las 10h y 30min ( $p < 0.05$ ). Estos resultados se reflejan en la figura 43.*

*Los animales tratados con 4ng de PCT icv + LPS i.p., presentaron diferencias significativas en la fiebre, durante las 12h que duró el estudio, con otros grupos. Así, las ratas de este grupo padecieron un proceso febril similar al padecido por los animales tratados con 10ng y 100ng de PCT icv + LPS i.p., pero inferior al sufrido por animales controles ( $p < 0.01$ ), con 2ng de PCT icv + LPS i.p. ( $p < 0.01$ ), y con 1000ng de PCT icv + LPS i.p. ( $p < 0.001$ ).*



**Figura 43.** Efecto de la microinyección icv de: LCR y PCT 4ng/5μl sobre la fiebre inducida por endotoxina bacteriana (LPS 50μg/kg i.p.) (n= 6). La significación respecto al grupo control, se representó: \*\*= p< 0.01 y \*\*\*\*= p< 0.0001.

#### IV. 3. C. PCT DOSIS 10ng/5μl (icv) + LPS 50μg/kg (ip) :

La administración central de PCT 10ng 30min previa a la administración periférica de endotoxina (LPS 50μg/kg i.p.), produjo cambios significativos en la respuesta febril inducida por la administración icv de LCR y la endotoxina a lo largo de las 12h que duró el experimento (p< 0.001).

Concretamente a esta dosis el tiempo de latencia se retrasó a las 2h, se mantuvo la primera fase de la fiebre provocada por la endotoxina

bacteriana (2-4h) y disminuyó significativamente la segunda (5-12h) ( $p < 0.0001$ ). Todo esto se puede apreciar en la figura 44.

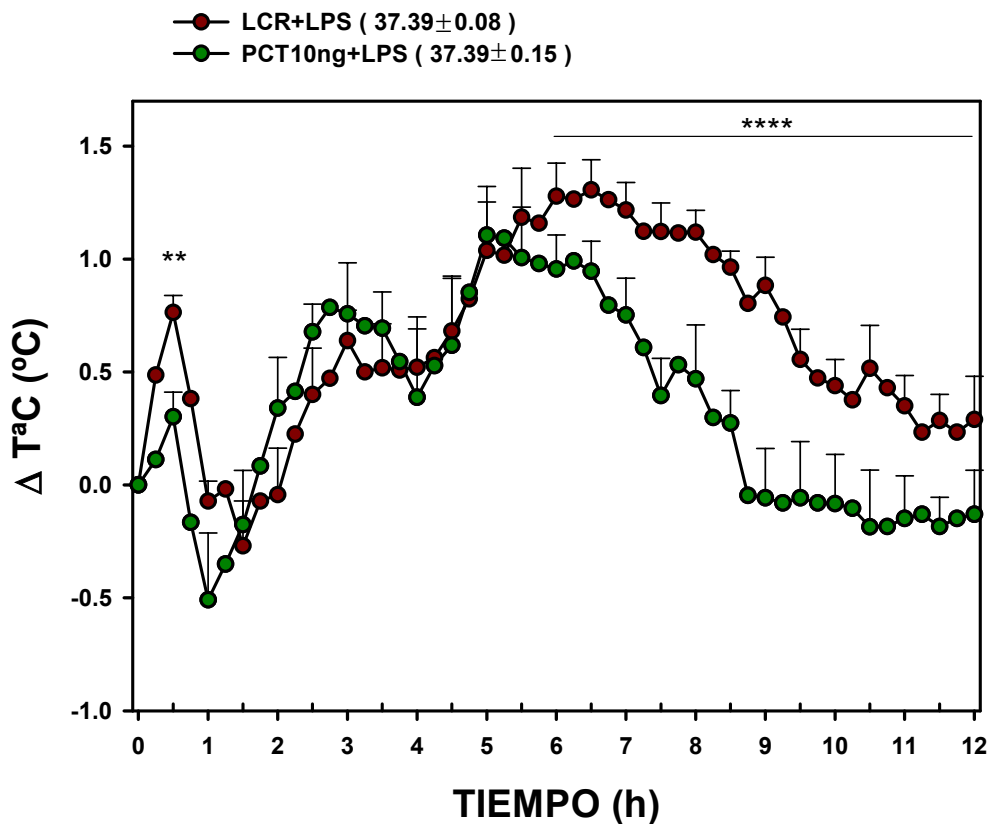
La Tc mínima registrada tras la administración de 10ng de PCT + LPS i.p. apareció en la primera hora.

La modificación de la Tc media en ratas endotoxémicas pretratadas con 10ng de PCT icv, a lo largo de las 12h que duró el experimento, fue de  $0.3 \pm 0.09$  °C. Este valor fue significativamente menor que el presentado por el grupo control ( $0.58 \pm 0.08$  °C), por el grupo pretratado con 2ng de PCT ( $0.61 \pm 0.09$  °C) y por el pretratado con 1000ng de PCT ( $0.6 \pm 0.09$  °C) ( $p < 0.05$ ), como demuestra la figura 40.

El incremento máximo de la Tc en ratas tratadas con 10ng de PCT icv + LPS i.p., apareció a las 5h tras la administración de la endotoxina y fue de  $1.10 \pm 0.21$  °C. Este valor no fue significativamente distinto al de los animales tratados con LCR icv + LPS i.p. ( $1.30 \pm 0.13$  °C) que apareció a las 6h y 30min tras la administración de LPS, como demuestra la figura 41.

En un estudio individual, realizado cada 30min sobre los cambios de temperatura recogidos durante las 12h que duró el experimento, se encontraron diferencias significativas entre la administración de PCT 10ng icv + LPS i.p. y LCR icv + LPS i.p. Concretamente a los 30min (tiempo de latencia de la endotoxina) la Tc fue significativamente menor en el grupo pretratado con 10 ng de PCT que en el control ( $p < 0.01$ ). El resto de los cambios significativos se registraron en la segunda etapa de la fiebre inducida por LPS desde las 6h a las 12h ( $p < 0.0001$ ). Así, se encontraron disminuciones significativas de la Tc con respecto al grupo control, a las 7h ( $p < 0.05$ ), a las 7 h y 30min ( $p < 0.01$ ), a las 8h ( $p < 0.05$ ), a las **8h y 30min** ( $p < 0.0001$ ), a las 9h ( $p < 0.01$ ), a las 9h y 30 min ( $p < 0.01$ ), a las 10h ( $p < 0.05$ ), a las 10h y 30min ( $p < 0.05$ ), a las 11h ( $p < 0.05$ ) y a las 11h y 30min ( $p < 0.05$ ). Estos resultados se reflejan en la figura 44.

Los animales tratados con 10ng de PCT icv + LPS i.p., presentaron diferencias significativas en la fiebre, durante las 12h que duró el estudio, con otros grupos. Así, las ratas de este grupo padecieron un proceso febril similar al padecido por los animales tratados con 4ng y 100ng de PCT icv + LPS i.p., pero inferior al sufrido por animales controles ( $p < 0.001$ ), con 2ng de PCT icv + LPS i.p. ( $p < 0.01$ ), y con 1000ng de PCT icv + LPS i.p. ( $p < 0.0001$ ).



**Figura 44.** Efecto de la microinyección icv de: LCR y PCT 10ng/5μl sobre la fiebre inducida por endotoxina bacteriana (LPS 50μg/kg i.p.) (n=6). La significación con respecto al grupo control, se representó: \*\*= p< 0.001 y \*\*\*\*= p< 0.0001.

#### **IV. 3. D. PCT DOSIS 100ng/μl (icv) + LPS 50μg/kg (i.p.):**

La administración central de PCT 100ng 30min previa a la administración periférica de endotoxina (LPS 50μg/kg i.p.), produjo cambios significativos en la respuesta febril inducida por la administración icv de LCR y la endotoxina a lo largo de las 12h que duró el experimento (p< 0.01). (Fig. 45)

A esta dosis el tiempo de latencia vuelve a ser 30min, se mantiene la primera fase de la fiebre (2-4h) y se disminuye significativamente la

segunda (5-12h) ( $p < 0.001$ ), provocada por la endotoxina bacteriana. Todo esto se puede apreciar en la figura 45.

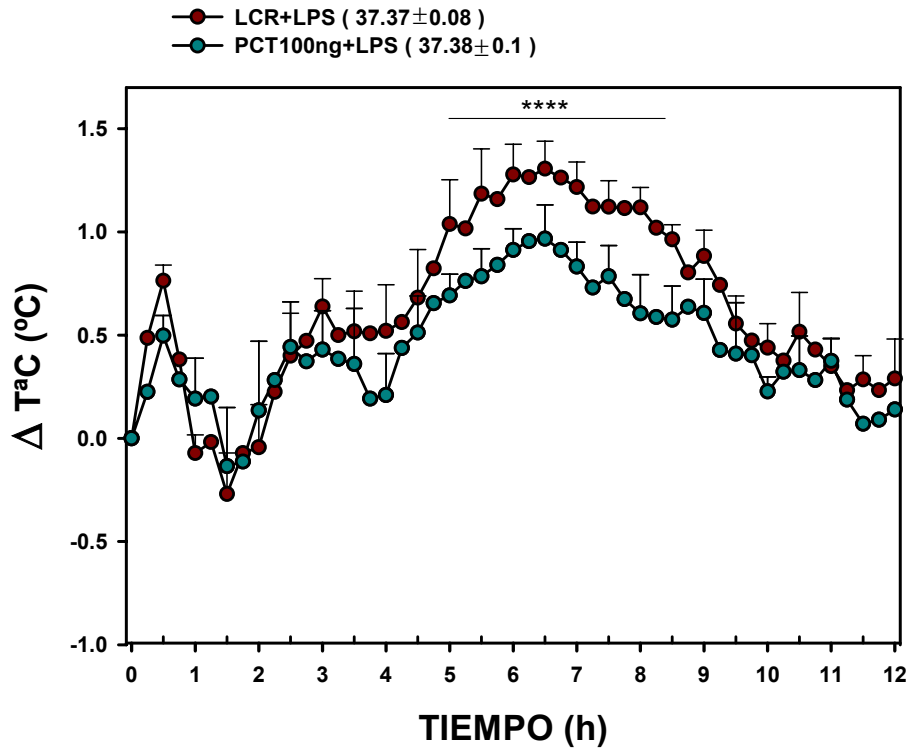
La Tc mínima registrada tras la administración de 100ng de PCT + LPS i.p., apareció a la 1h y 30min.

A esta dosis, la modificación de la Tc media, a lo largo de las 12h que duró el experimento ( $0.45 \pm 0.14$  °C) no fue significativamente distinta a la presentada por los controles ( $0.58 \pm 0.08$  °C), como demuestra la figura 40.

El incremento máximo de la Tc en ratas tratadas con 100ng de PCT icv + LPS i.p., apareció a las 6h y 30 min tras la administración de la endotoxina y fue de  $0.96 \pm 0.16$ °C. Este incremento máximo de Tc durante las 12h que duró el experimento, fue el menor registrado en todos los grupos. Así, aunque no fue significativamente menor que el del grupo control (que apareció a la misma hora tras la administración de LPS), si fue menor que el alcanzado por los grupos tratados con 2ng y 1000ng de PCT icv + LPS i.p. ( $p < 0.05$ ). (Fig. 41)

En un estudio individual realizado cada 30min sobre los cambios de temperatura recogidos durante las 12h que duró el experimento, se encontraron diferencias significativas entre la administración de PCT 100ng icv + LPS i.p. y LCR icv + LPS i.p. Todos los cambios significativos se registraron en la segunda etapa de la fiebre inducida por LPS, fundamentalmente de 5h a 8h y 30min ( $p < 0.0001$ ). Así, se encontraron valores significativamente menores de Tc a las 6h ( $p < 0.05$ ), a las 7h ( $p < 0.05$ ), a las 7h y 30min ( $p < 0.05$ ), a las 8h ( $p < 0.05$ ), y a las 8h y 30min ( $p < 0.05$ ). (Fig. 45)

Los animales tratados con 100ng de PCT icv + LPS i.p., presentaron diferencias significativas en la fiebre, durante las 12h que duró el estudio, respecto a otros grupos. Así, las ratas de este grupo padecieron un proceso febril similar al padecido por los animales tratados con 4ng y 10ng de PCT icv + LPS i.p., pero inferior al sufrido por animales controles, tratados con 2ng y 1000ng de PCT icv + LPS i.p. ( $p < 0.01$ ).



**Figura 45.** Efecto de la microinyección icv de: LCR y PCT 100ng/5 $\mu$ l sobre la fiebre inducida por endotoxina bacteriana (LPS 50 $\mu$ g/kg i.p.) (n=6). La significación con respecto al grupo control, se representó \*\*\*\*=  $p < 0.0001$ .

#### **IV. 3. E. PCT DOSIS 1000ng/5 $\mu$ l (icv) + LPS 50 $\mu$ g/kg (i.p.):**

La administración central de PCT 1000ng 30min previa a la administración periférica de endotoxina (LPS 50 $\mu$ g/kg ip), no produjo cambios significativos en la respuesta febril inducida por la administración icv de LCR y la endotoxina a lo largo de las 12h que duró el experimento.

Por tanto a esta dosis se mantiene el periodo de latencia de 30min y el patrón febril que presenta una primera (2-4h) y una segunda fase de la fiebre (5-12h) provocada por la endotoxina. (Fig. 46).

La Tc mínima registrada tras la administración de PCT 1000ng apareció a la 2h.

El aumento de la Tc media lo largo de las 12h que duró el experimento fue de  $0.68 \pm 0.17$  °C. Este valor medio no fue significativamente distinto al del grupo control, ni al de los grupos pretratados con 2ng y 100ng de PCT icv + LPS i.p. Sin embargo, fue significativamente mayor al de los animales endotoxémicos pretratados con 4ng y 10 ng de PCT icv ( $p < 0.05$ ). (Fig. 40)

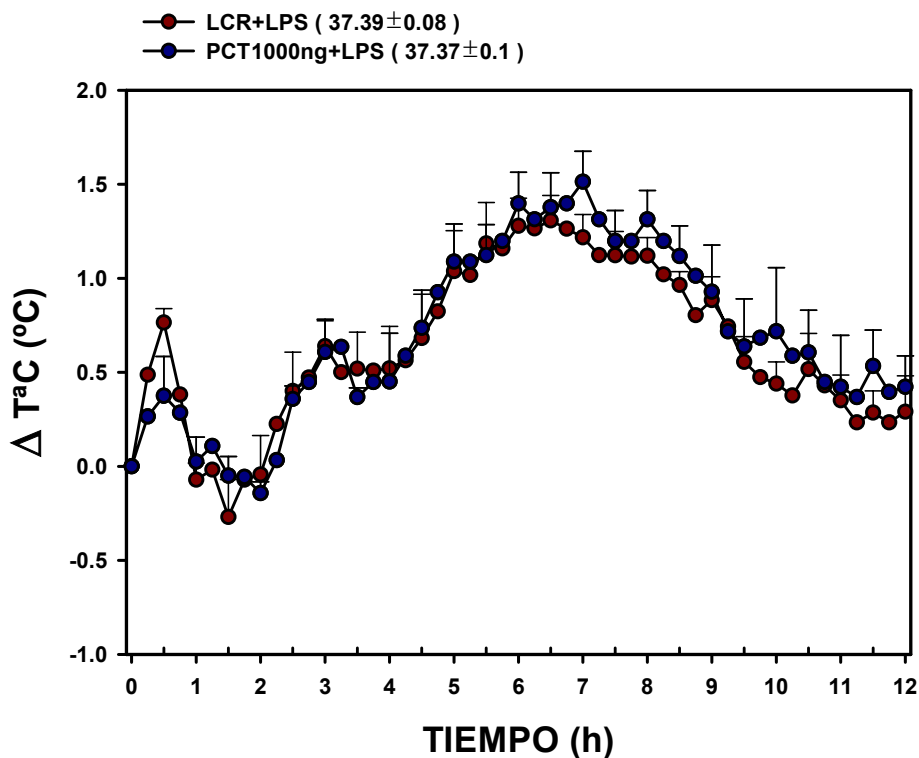


Figura 46. Efecto de la microinyección icv de: LCR y PCT 1000ng/5 $\mu$ l sobre la fiebre inducida por endotoxina bacteriana (LPS 50 $\mu$ g/kg i.p.) (n=6).



*El incremento máximo de la Tc en ratas tratadas con PCT 1000ng apareció a las 7h tras la administración de la endotoxina y fue de  $1.51 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  (el más alto de todos los grupos estudiados). Este valor no fue significativamente distinto al de los animales tratados con LCR, que aparecieron 30min antes tras la administración de LPS. Aunque si fue significativamente mayor que el del grupo pretratado con 100ng de PCT icv, como demuestra la figura 41.*

*Los animales tratados con 1000ng de PCT icv + LPS i.p., presentaron diferencias significativas en la fiebre, durante las 12h que duró el estudio, con otros grupos. Así, las ratas de este grupo padecieron un proceso febril similar al padecido por los animales controles y al de los pretratados con 2ng de PCT icv, pero superior al sufrido por animales pretratados con 4ng ( $p < 0.001$ ), 10ng ( $p < 0.0001$ ), y 100ng ( $p < 0.01$ ) de PCT icv + LPS i.p.*

**Tabla 4.** Cuadro resumen de los diferentes tiempos (t) a las distintas dosis de PCT y LCR icv en ratas con fiebre provocado por la administración de LPS 50µg/kg i.p. La significación de los valores presentados a las distintas horas versus el grupo control, fueron: \*= p< 0.05, \*\*= p< 0.01, \*\*\*= p< 0.001 y \*\*\*\*= p< 0.0001.

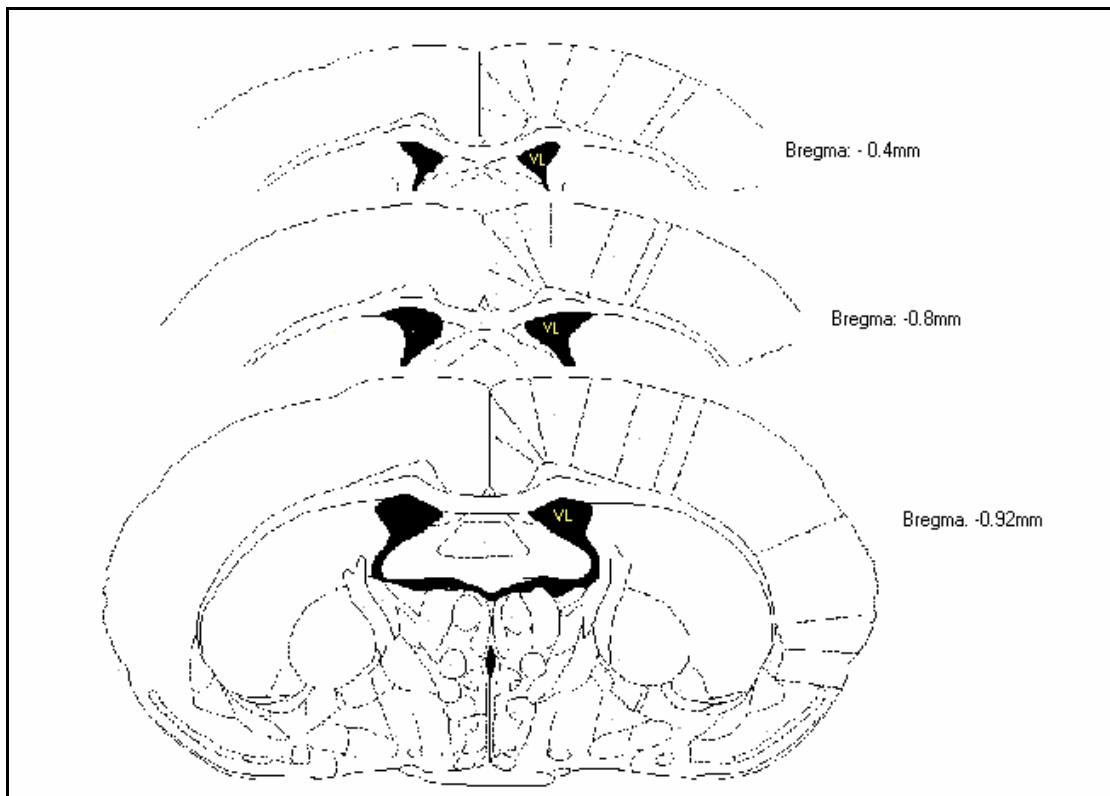
	LCR icv	PCT2ng icv	PCT4ng icv	PCT10ng icv	PCT100ng icv	PCT1000ng icv
<b>t latencia</b>	0,5h	0,5h**	<b>2h*</b>	<b>2h****</b>	0,5h	0,5h
<b>t de Tc máxima</b>	6,5h	6h	<b>5h</b>	<b>5h</b>	6,5h	7h
<b>t de Tc mínimo</b>	1,5h	<b>2h</b>	1,5h	<b>1h</b>	1,5h	1,5h
<b>Acción sobre la fiebre</b>	=	=	↓ segunda fase**	↓ segunda fase****	↓ segunda fase**	=
<b>t de acción sobre la fiebre</b>	=	=	6-11h****	6-12h****	5- 8,5h****	=
<b>tiempos significativos de acción sobre la fiebre</b>		0,5h**	0,5h** <b>8,5h****</b> 9h** 9,5h* 10h** 10,5h*	0,5h** 7h* 7,5h** 8h* <b>8,5h****</b> 9h** 9,5h** 10h* 10,5h* 11h* 11h,5h*	6h* 7h* 7,5h* 8h* 8,5h*	

El tiempo se expresa en horas (h).

#### **IV.4. RESULTADOS HISTOLÓGICOS DE LOS LUGARES DE MICROINYECCIÓN.**

*La localización anatómica de la cánula guía en los cerebros de los animales incluidos en los grupos de la fase II y III de este estudio, estuvieron todas en el ventrículo lateral (VL). Concretamente se situaron entre -0.4mm y -0.9mm desde bregma (Paxinos & Watson, 1996), como demuestra la figura 47.*

*Los animales cuya zona de microinyección no se localizó en el VL, se eliminaron del estudio.*



**Figura 47.** Esquema de localización anatómica de los lugares de microinyección de las ratas incluidas en las fases II y III del experimento. Los cortes coronales seriados incluyen los VL desde Bregma -0.4mm a -0.92mm (Paxinos & Watson, 1996).

#### **IV.5. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA PRESENCIA DE PCT EN CEREBRO.**

*El estudio inmunohistoquímico de la presencia y localización de PCT en el cerebro, marcó la presencia de esta molécula en los astrocitos de diferentes áreas hipotalámicas (cresta supraóptica (SC), núcleo supraquiasmático (SCh), tuber cinereum (TC), pe, Pa, PO/HA, Arc y otras) tanto en el parénquima, como en las meninges, como en los tejidos vasculares. Así mismo también se encontró marcaje en los tanicitos y endotelios del 3V, en el Sol y en diferentes CVOs.*

*En todos los lugares encontrados, el marcaje de PCT fue claramente intracelular, y curiosamente, la densidad del marcaje fue aparentemente mayor en las meninges que en el cerebro.*

*Este marcaje se observó en prácticamente todos los casos (incluidos los controles), aunque con diferente intensidad y pequeños matices.*

##### **IV.5.1. GRUPO CONTROL (SSF i.p.):**

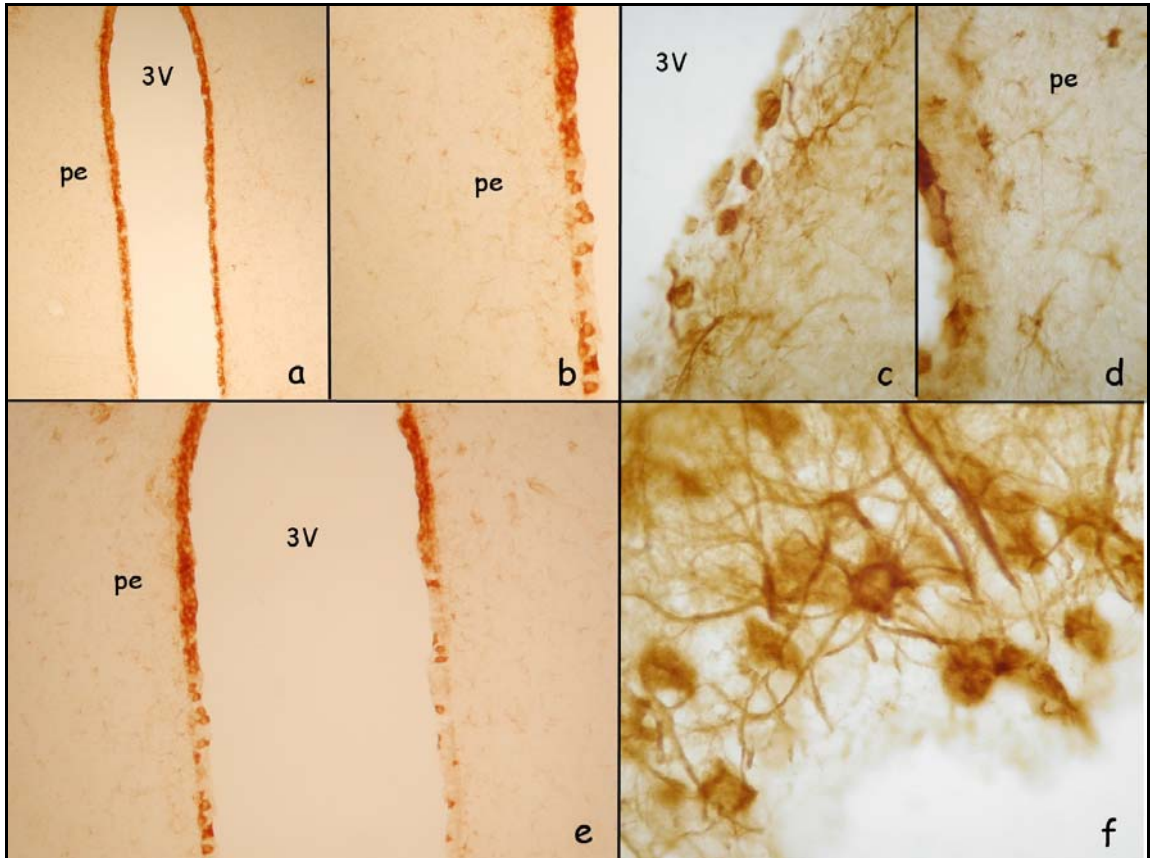
*En los grupos de animales controles (inyectados con SSF i.p.), la presencia de PCT se localizó fundamentalmente alrededor del 3V. Así, aparecieron marcados los tanicitos de las paredes del 3V, estas células conectan las paredes del 3V con los vasos del parénquima, los tractos fibrosos y/o los núcleos hipotalámicos. También se marcaron los endotelios del 3V y los pch. En zonas determinadas como el techo del 3V, aparecen astrocitos con una forma estrellada característica y exclusiva de esa zona. Alrededor del 3V se encuentra el pe, en este caso, presenta marcaje astrocitario en su zona más medial. (Fig. 48)*

*Los cerebros de animales controles, presentaron inmunorreactividad a la PCT en astrocitos de diversos CVOs, así apareció marcaje en el VOLT, AP, SCO, ME y Sol. Sin embargo no se marcaron los astrocitos del SFO, aunque sí diversos endotelios de su interior. (Fig. 49)*

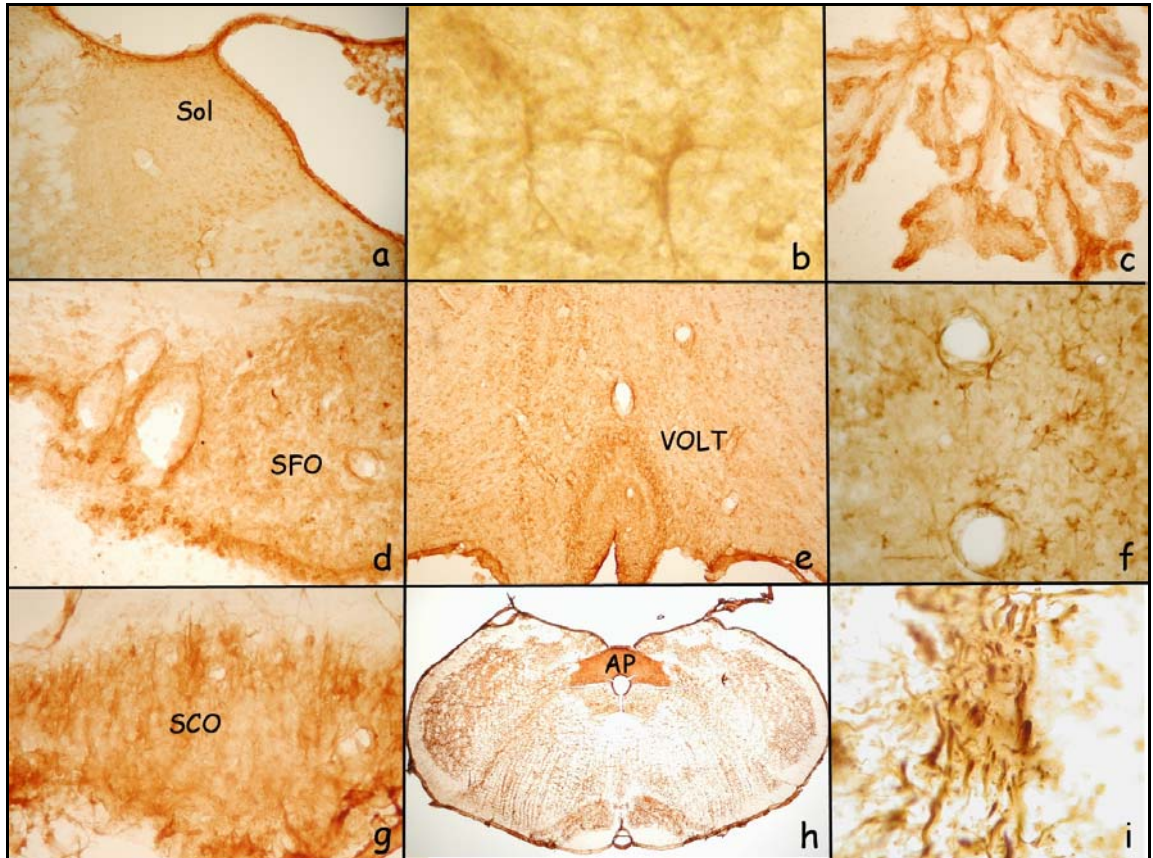
*En la zona preóptica del hipotálamo, el grupo control, presentó inmunorreactividad a la PCT en algunos de los pies astrocitarios que rodean a los vasos y en algunos astrocitos protoplásmicos. También se*

*marcaron los astrocitos que conforman la cresta supraóptica del SO, dichos astrocitos poseen una organización radial (astrocitos fibrosos piales) que conecta la glia limitante con el parénquima. El núcleo supraquiasmático presentó abundante reactividad a la PCT, marcándose algunos astrocitos protoplásmicos desde el suelo del 3V a la superficie basal del cerebro. (Fig. 50)*

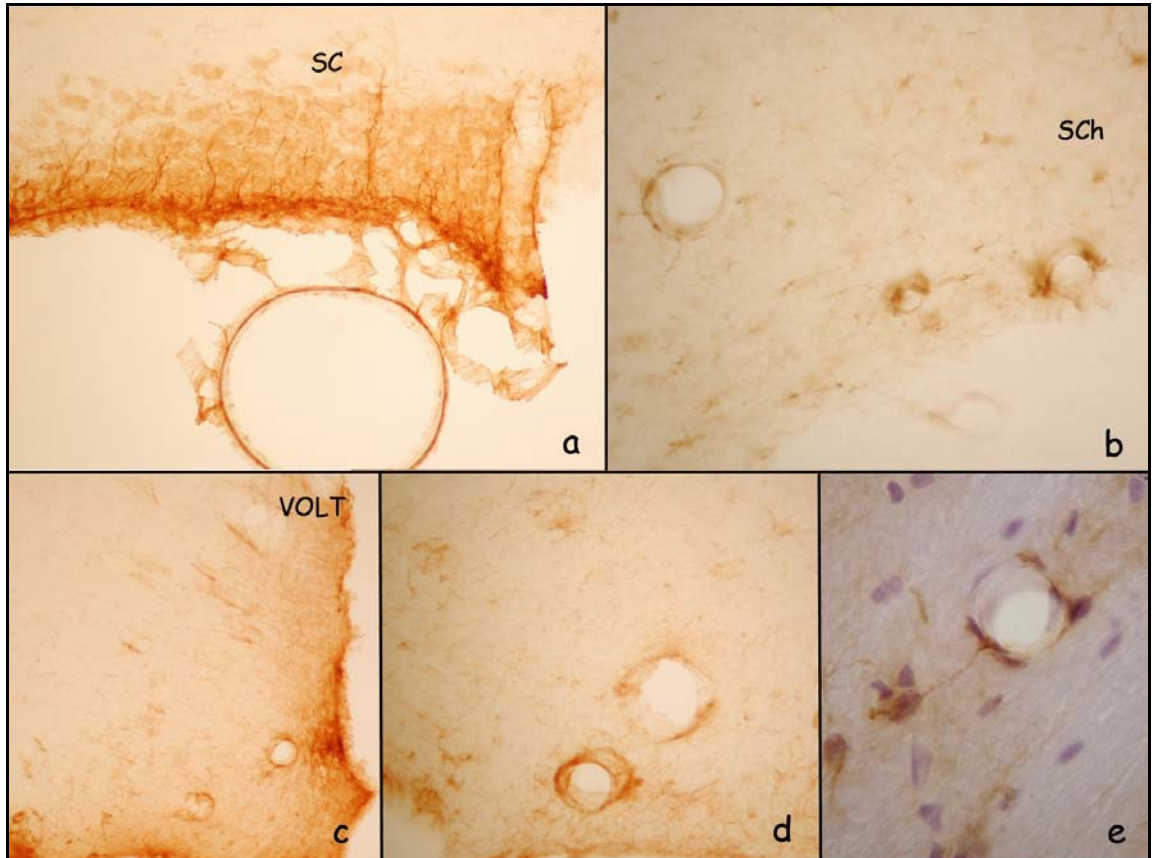
*En la porción mas tuberal del 3V, localizados en el Arc, se encontraron una serie de tanicitos arciformes conectados con la ME. En continuación con la ME (con astrocitos radiales muy marcados), se encontró un fuerte marcaje de PCT en la vgl. Así mismo, en el lateral del Arc aparecen algunos astrocitos protoplásmicos que definen el tuber cinereum del hipotálamo. (Fig. 51)*



**Figura 48.** Inmunoexpresión de PCT en cerebros de ratas normales tratadas con SSF  
 i.p.: **a, b, c, d, e:** endimocitos y tanicitos del 3V anterior PCT reactivos, y pe rostral,  
 100x, 200x, 400x, 400x, 200x, **f:** astrocitos estrellados del techo del 3V en su zona  
 mas medial, 400x.

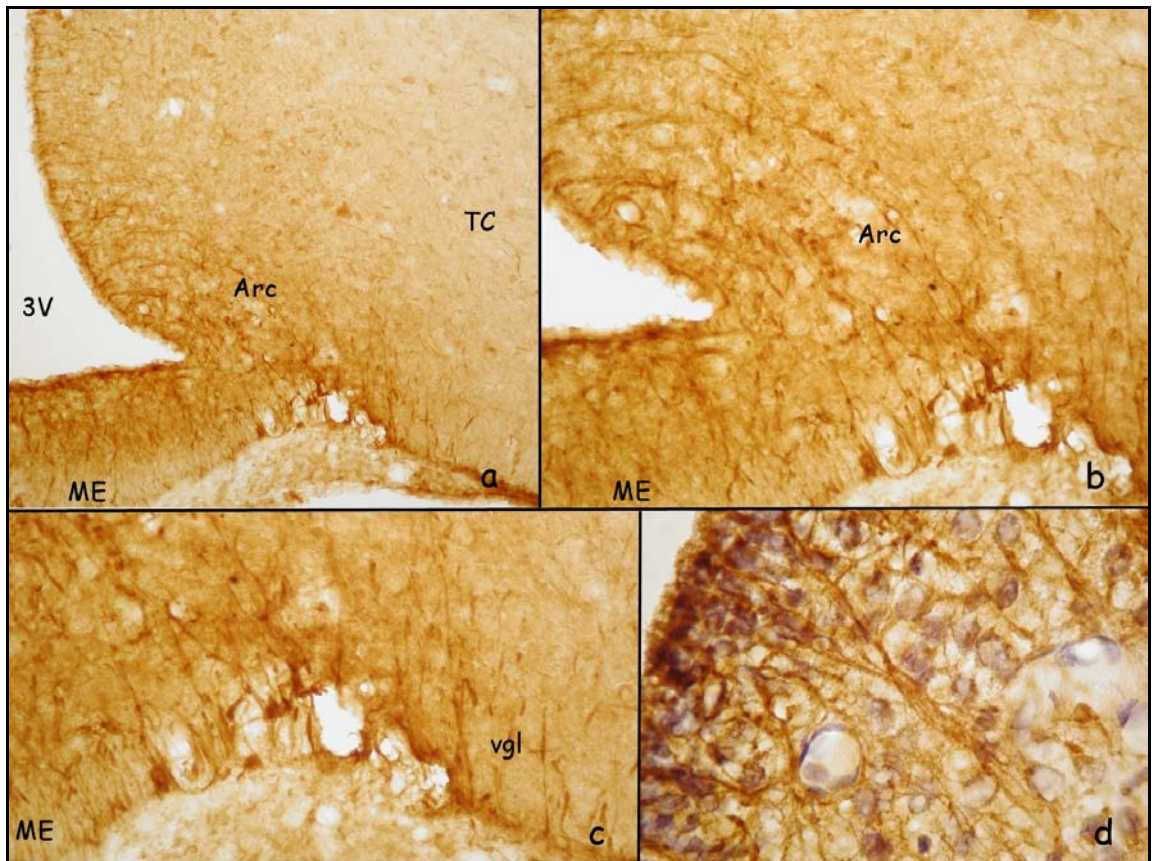


**Figura 49.** Inmunoexpresión de PCT en cerebros de ratas normales tratadas con SSF i.p.: **a, b:** astrocitos PCT reactivos en el Sol, 100x, 400x, **c:** ependimocitos del pch PCT positivos, 200x, **d:** ependimocitos PCT reactivos en SFO, 200x, **e, f:** astrocitos protoplásmicos y "pies chupadores" PCT positivos de la VOLT, 100x, 400x, **g:** astrocitos PCT reactivos del SCO, **h, i:** astrocitos PCT positivos del AP, 10x, 1000x.



**Figura 50.** Inmunoexpresión de PCT en cerebros de ratas normales tratadas con SSF  
*i.p.:* **a:** astrocitos fibrosos PCT reactivos de la SC del SO, 100x, **b:** astrocitos  
 protoplásmicos del SCh PCT positivos, 200x, **c, d:** astrocitos protoplásmicos y "pies  
 chupadores" del AH/PO limitante con el VOLT, en su zona mas ventral, 100x, 200x,  
**e:** astrocito "pie chupador" sobre vaso sanguíneo hipotalámico, contratinción, 400x.





**Figura 51.** Inmunoexpresión de PCT en cerebros de ratas normales tratadas con SSF  
 i.p.: **a,b:** tanicitos arciforme del Arc, fibrosos de la ME y de la vgl, 100x, 200x, **c:**  
 astrocitos fibrosos de la vgl, 200x, **d:** tanicitos arciforme del Arc, contratincción, 400x.

#### **IV.5.2. ANIMALES ENDOTOXÉMICOS PERFUNDIDOS A LA 1H:**

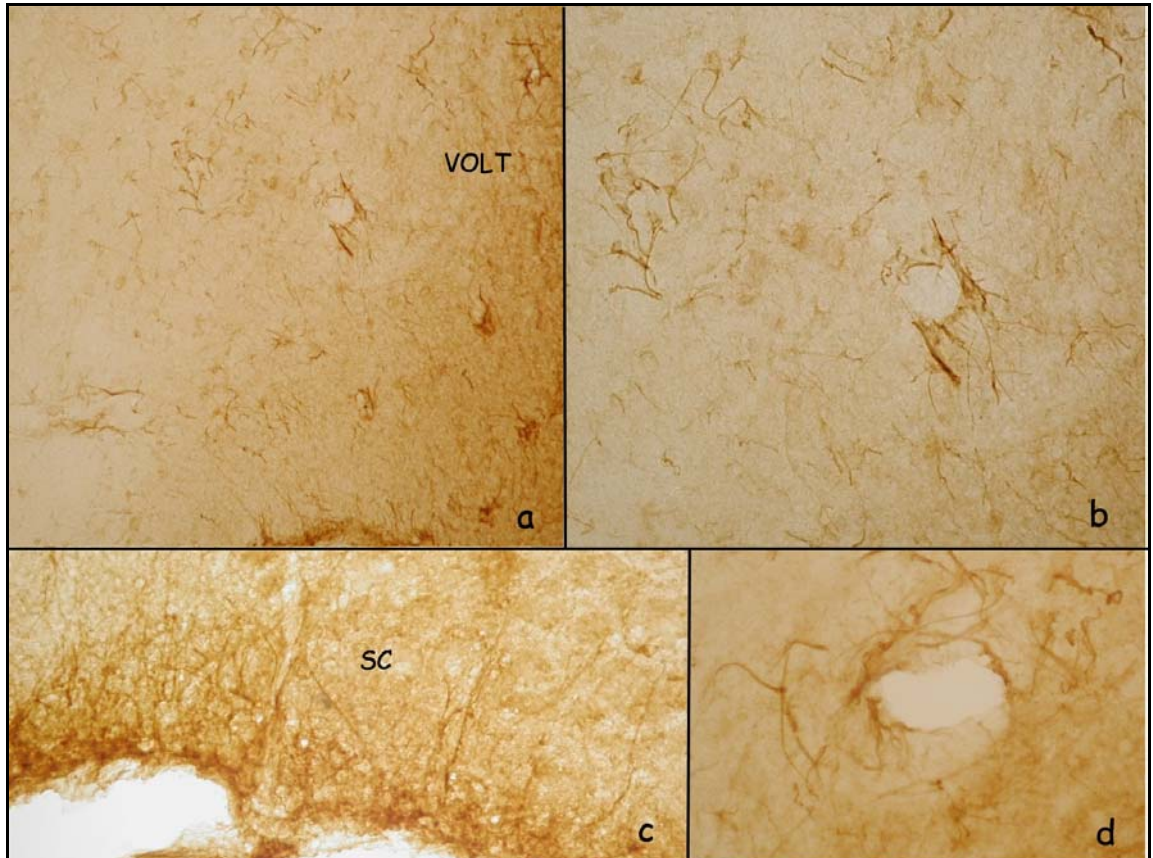
*Las ratas inyectadas con LPS 100µg/kg y perfundidas a la 1h presentaron un patrón de marcaje similar al de ratas controles, aunque con diferente intensidad y localización. En el área termorreguladora del VOLT, y el AH/PO se incrementó el número de astrocitos protoplásmicos PCT positivos. (Fig. 52)*

*La presencia de PCT en los tanicitos se generalizó a todas las paredes del 3V y sus prolongaciones disminuyeron de longitud. Los endimocitos del 3V presentaron un gradiente de inmunorreactividad, estando marcados a lo largo de toda la pared del 3V rostral y caudal y disminuyendo en la zona medial. Los endimocitos del 3V medial también presentaron un gradiente, así, los endimocitos ventrales y dorsales fueron muy inmunorreactivos a la PCT, y los mediales negativos. (Fig. 53)*

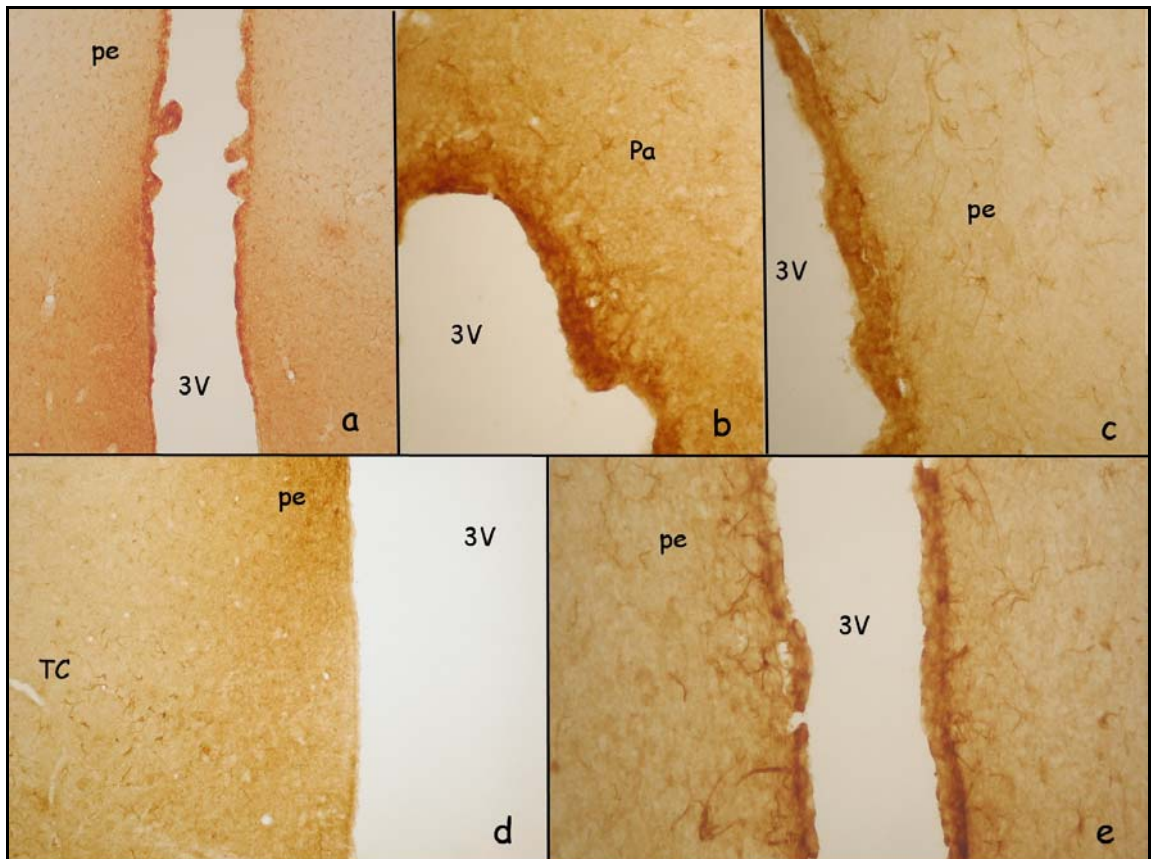
*Mas llamativo aún, fue el marcaje astrocitario que presentó el pe medial y lateral (mucho más extenso que en grupos controles), que abarcó desde la zona preóptica hasta el Arc. En general toda la zona preóptica presentó más astrocitos inmunorreactivos que los grupos controles tanto protoplásmicos como unidos a vasos por sus "pies chupadores". El pe también se prolongó dorsalmente hasta fusionarse con el Pa (que presenta astrocitos positivos, ausentes en grupos controles), y lateralmente hasta unirse al TC (que presenta gran cantidad de astrocitos protoplásmicos, ventrales y mediales). Existiendo una sobreexpresión de PCT en todo el hipotálamo (Fig. 54)*

*En la porción mas tuberal del 3V, el marcaje varió con respecto al grupo control, pues los tanicitos arciformes del Arc mas rostral desaparecieron (no así del caudal), y los astrocitos radiales de la ME también disminuyeron, no así los astrocitos piales de la vgl (Fig. 55).*

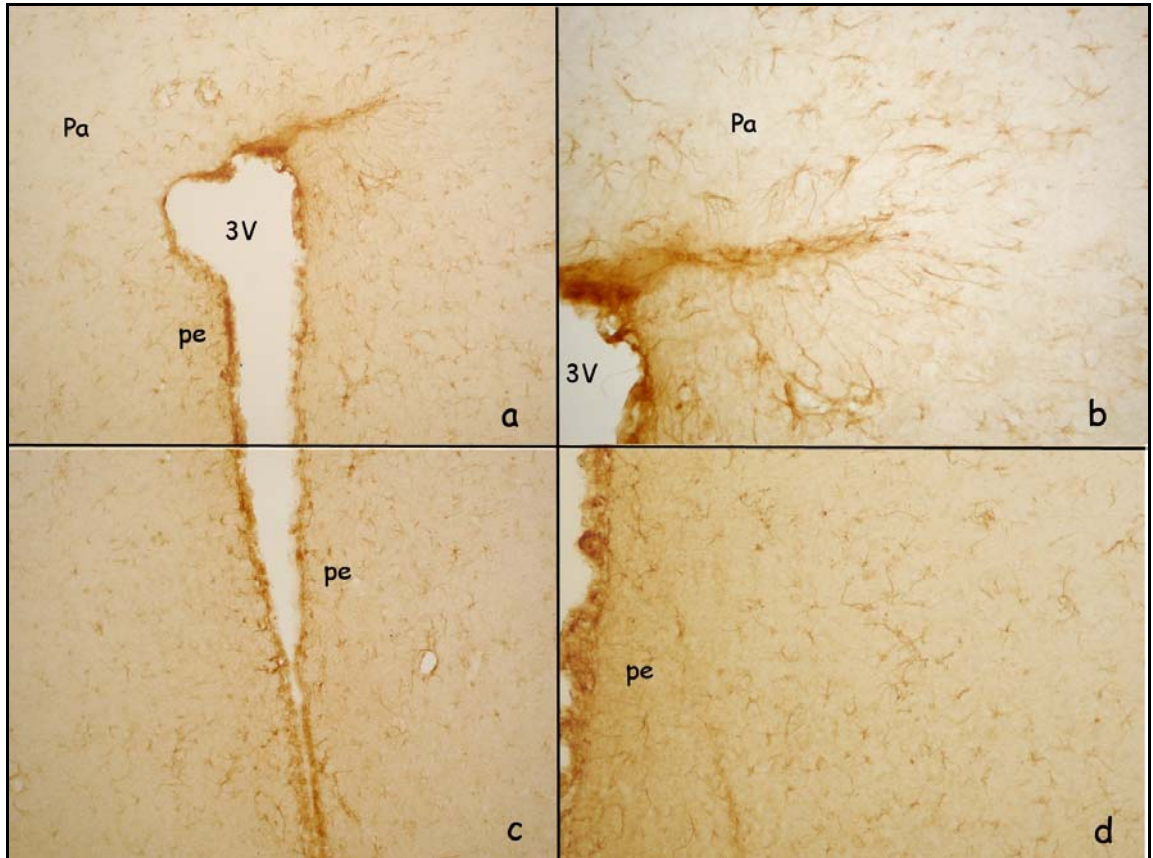
*El resto de los CVOs aparecieron marcados.*



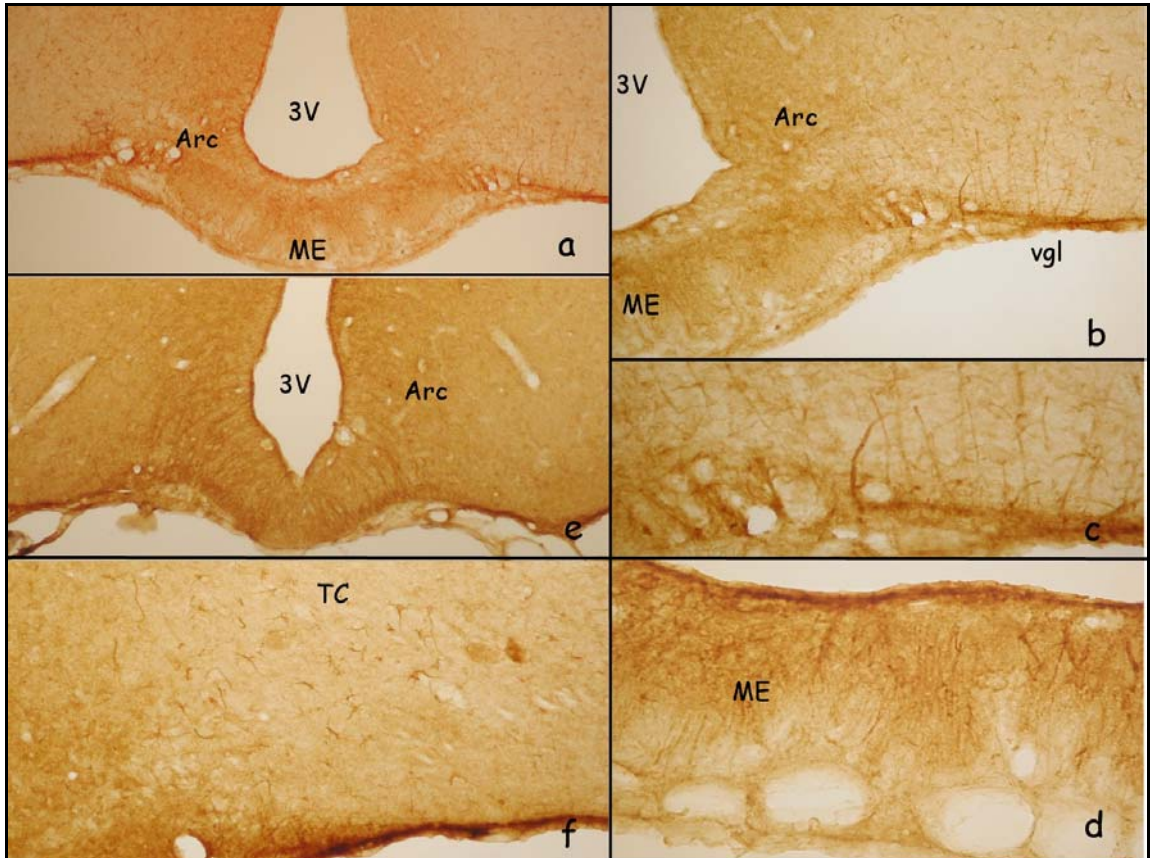
**Figura 52.** Inmunoexpresión de PCT en cerebros de ratas endotoxémicas perfundidas a la 1h. **a:** astrocitos protoplásmicos PCT reactivos del VOLT y del AH/PO ventral, 200x, **b:** detalle de los astrocitos PCT positivos del AH/PO, la mayoría unidos a vasos por sus "pies", 400x, **c:** astrocitos fibrosos PCT reactivos de la SC del SO, 400x, **d:** detalle de un vaso del AH/PO, rodeado por astrocitos PCT positivos, 1000x.



**Figura 53.** Inmunoexpresión de PCT en cerebros de ratas endotoxémicas perfundidas a la 1h. **a:** endimocitos PCT reactivos del 3V medial (gradiente de reactividad), astrocitos protoplásmicos PCT reactivos del pe, 100x **b:** inmunorreactividad positiva de PCT en los endimocitos y tanicitos del techo del 3V medial, astrocitos protoplásmicos PCT reactivos del Pa, 400x, **c:** marcaje de PCT en los endimocitos y tanicitos dorsales del 3V, y de los astrocitos protoplásmicos del pe, 200x, **d:** ausencia de endimocitos inmunorreactivos en la zona ventral del 3V medial, astrocitos positivos en el TC, 100x, y **e:** inmunoexpresión de PCT en los endimocitos y tanicitos del 3V anterior, 400x.



**Figura 54.** Inmunoexpresión de PCT en cerebros de ratas endotoxémicas perfundidas a la 1h. **a:** astrocitos protoplásmicos PCT reactivos del pe dorsal y Pa en su zona mas rostral, 100x, **b:** detalle de los astrocitos PCT positivos del PA, 400x, **c:** astrocitos protoplásmicos PCT reactivos del pe ventral en su zona mas rostral, 100x, **d:** detalle de los astrocitos PCT positivos del pe que se extienden lateralmente hasta TC,200x.



**Figura 55.** Inmunoexpresión de PCT en cerebros de ratas endotoxémicas perfundidas a la 1h. **a:** marcaje no arciforme de los tanicitos PCT reactivos en el Arc anterior y ME, 100x, **b:** detalle de a, 200x, **c:** astrocitos fibrosos piales de la vgl, 400x, **d:** tanicitos PCT positivos de la ME, 400x, **e:** marcaje arciforme de los tanicitos PCT reactivos en el Arc posterior, 100x, y **f:** astrocitos protoplásmicos del TC en su zona mas ventral, 200x.

#### **IV.5.3. ANIMALES ENDOTOXÉMICOS PERFUNDIDOS A LAS 3H:**

*En los cerebros de ratas inyectadas con LPS 100µg/kg y perfundidas a la 3h hubo marcaje de pies astrocitarios de vasos de la zona termorreguladora (fundamentalmente del VOLT), y pequeños astrocitos protoplásmico, aunque disminuyó ligeramente la intensidad en comparación con el caso anterior. En la cresta del SO aparecieron los astrocitos radiales. (Fig. 56)*

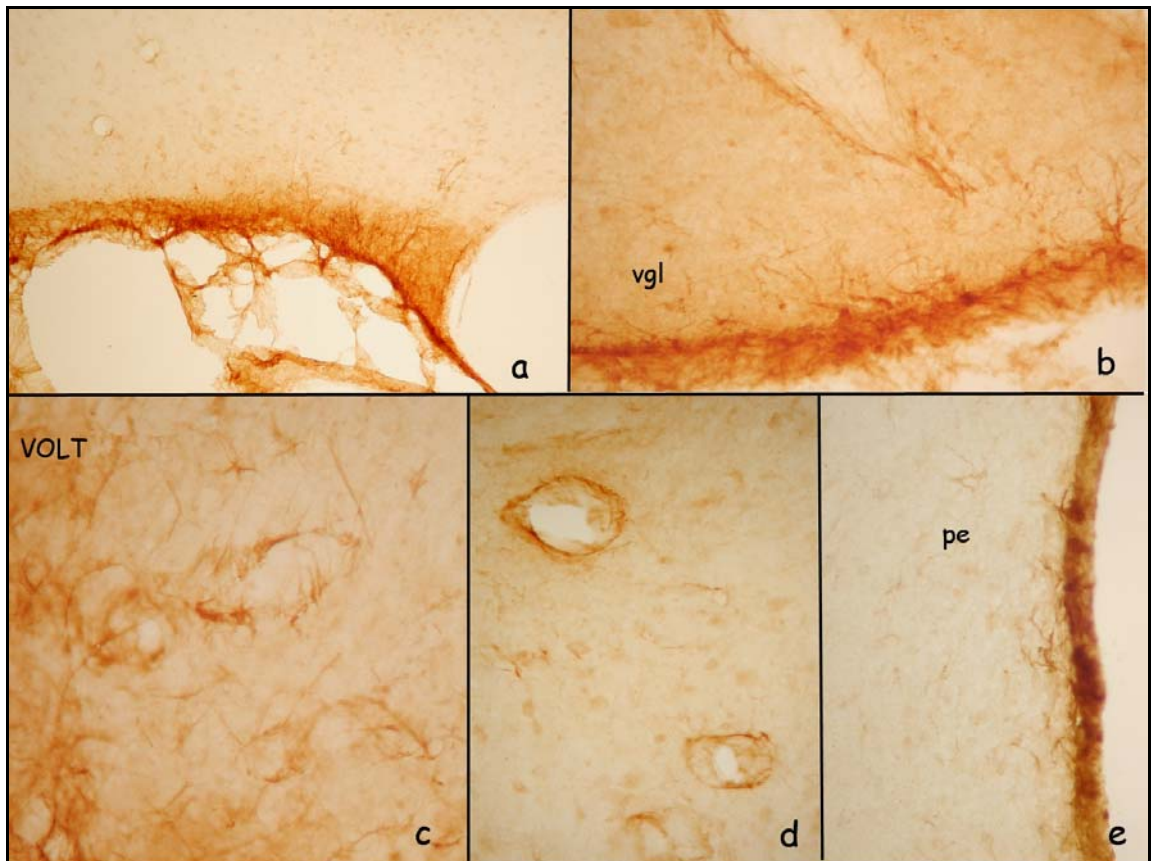
*Se mantuvo el marcaje de endimocitos y tanicitos como 2h antes, pero el marcaje astrocitario del pe disminuyó, limitándose al área más medial en contacto con el 3V desde la zona preóptica hasta el Arc. A diferencia del grupo anterior, los astrocitos inmunorreactivos no se prolongaron dorsalmente hasta el Pa (negativo en este caso), y si lo hicieron lateralmente hasta unirse al TC, aunque en menor cantidad. (Fig. 56)*

*Los animales endotoxémicos perfundidos a las 3h presentaron astrocitos inmunorreactivos a la PCT en la zona más ventral del TC, sobretodo en la zona limitante con el Arc y la vgl. En este caso los tanicitos del Arc desaparecieron tanto de su zona rostral como de su zona caudal. Los astrocitos piales disminuyeron ligeramente con respecto al grupo anterior (Fig. 56). El resto de los CVOs se mantuvieron marcados.*

#### **IV.5.4. ANIMALES ENDOTOXÉMICOS PERFUNDIDOS A LAS 6H:**

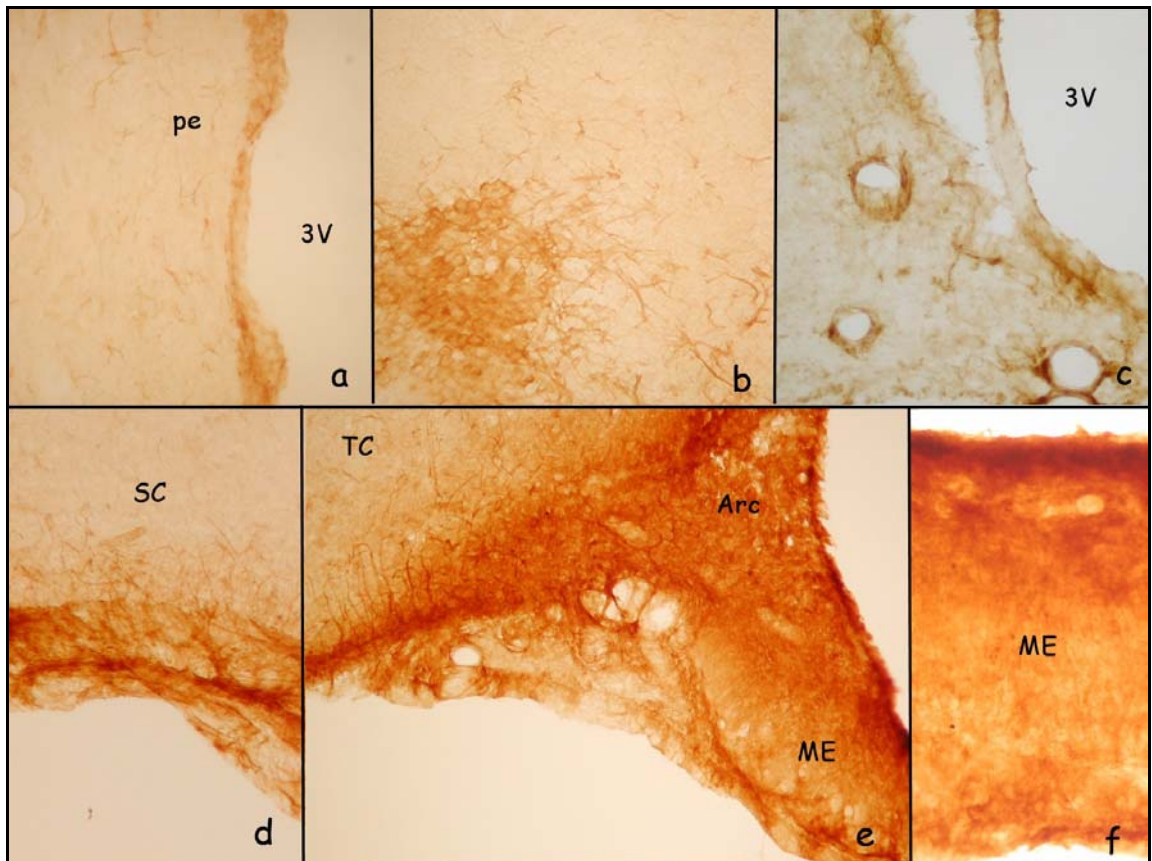
*En los cerebros de ratas inyectadas con LPS 100µg/kg y perfundidas a la 6h se mantuvo el marcaje de PCT de un modo muy similar al de los animales endotoxémicos perfundidos a las 3h, observándose un discreto aumento de la intensidad del marcaje astrocitario (incluida el área termorreguladora). Fundamentalmente se incrementó el marcaje de los astrocitos pe, que se extienden hacia su zona lateral. (Fig. 57)*

*Curiosamente el marcaje del Arc, junto con la ME se hizo mucho más intenso, y diferenciado del resto del marcaje cerebral (Fig. 57). El resto de los CVOs se mantuvieron marcados.*



**Figura 56.** Inmunoexpresión de PCT en cerebros de ratas endotoxémicas perfundidas a las 3h. **a:** astrocitos fibrosos PCT positivos de la SC del SO, 100x, **b:** astrocitos fibrosos piales de la vgl, 200x, **c:** astrocitos protoplásmicos y "pies chupadores" PCT reactivos del VOLT y AH/PO, 400x, **d:** astrocitos protoplásmicos y "pies chupadores" PCT reactivos del AH/PO, 400x, **e:** ependimocitos y tanicitos PCT positivos del 3V anterior y astrocitos protoplásmicos del pe, 200x.





**Figura 57.** Inmunoexpresión de PCT en cerebros de ratas endotoxémicas perfundidas a las 6h. **a:** endimocitos PCT positivos del 3V y astrocitos protoplásmicos del pe, 200x, **b:** endimocitos, tanicitos y astrocitos protoplásmicos del techo del 3V, 200x, **c:** astrocitos protoplásmicos y "pies chupadores" PCT reactivos del AH/PO ventral, 200x, **d:** astrocitos fibrosos PCT positivos de la SC del SO, 200x, **e:** vgl positiva, astrocitos protoplásmicos del TC y tanicitos no arciformes del Arc PCT reactivos, y ME muy inmunorreactiva, 200x, **f:** detalle de la ME marcaje PCT positivo muy intenso, 400x.

#### **IV.5.5. ANIMALES ENDOTOXÉMICOS PERFUNDIDOS A LAS 12H:**

*Las ratas inyectadas con LPS 100µg/kg y perfundidas a las 12h presentaron un patron de marcaje de PCT muy parecido al de los animales endotoxémicos perfundidos a las 6h, observándose un aumento de la intensidad del marcaje astrocitario de todas las zonas anteriormente mencionadas. De especial interés fue el incremento de marcaje de los astrocitos protoplásmicos del pe, TC y Arc. (Fig. 58)*

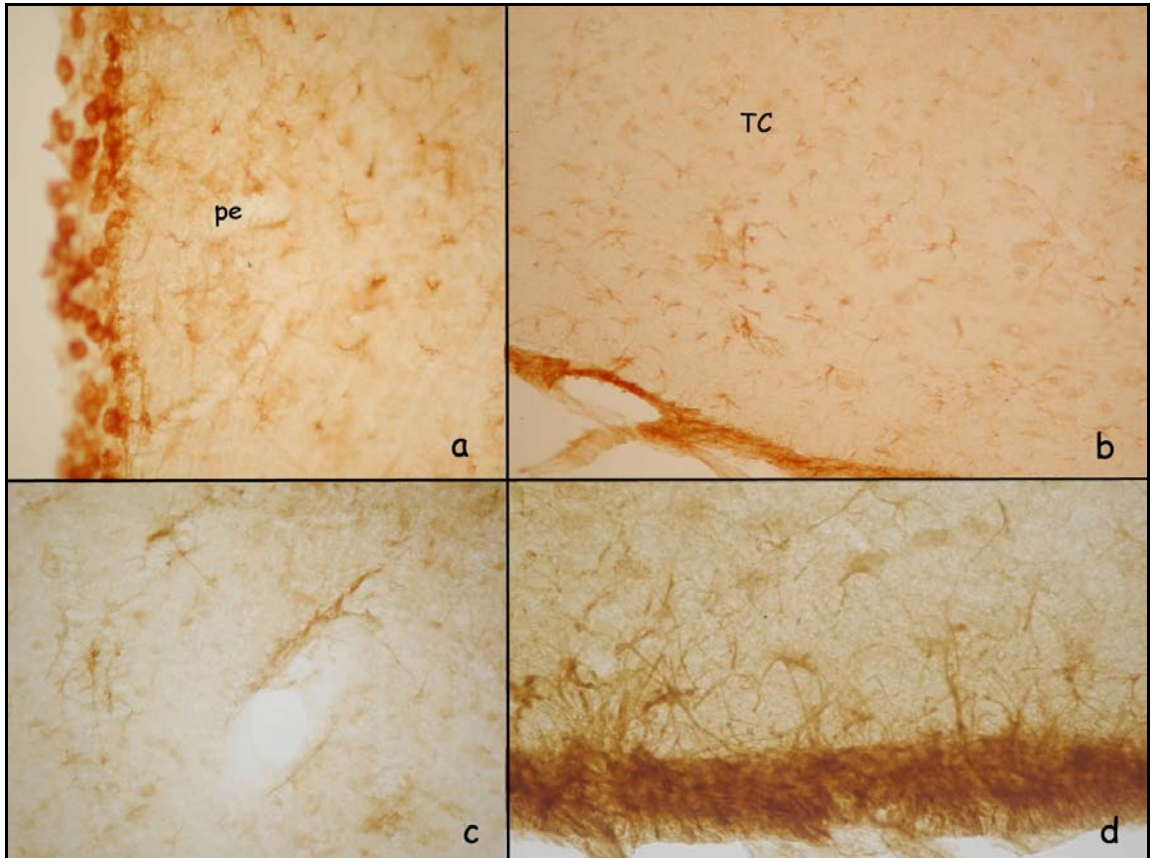
*Sin embargo, el área termorreguladora presentó un marcaje de PCT ligeramente inferior al de las ratas perfundido a las 6h. Igualmente, la ME disminuyó levemente su intensidad con respecto al grupo anterior. (Fig. 58)*

*Los COVs permanecieron marcados.*

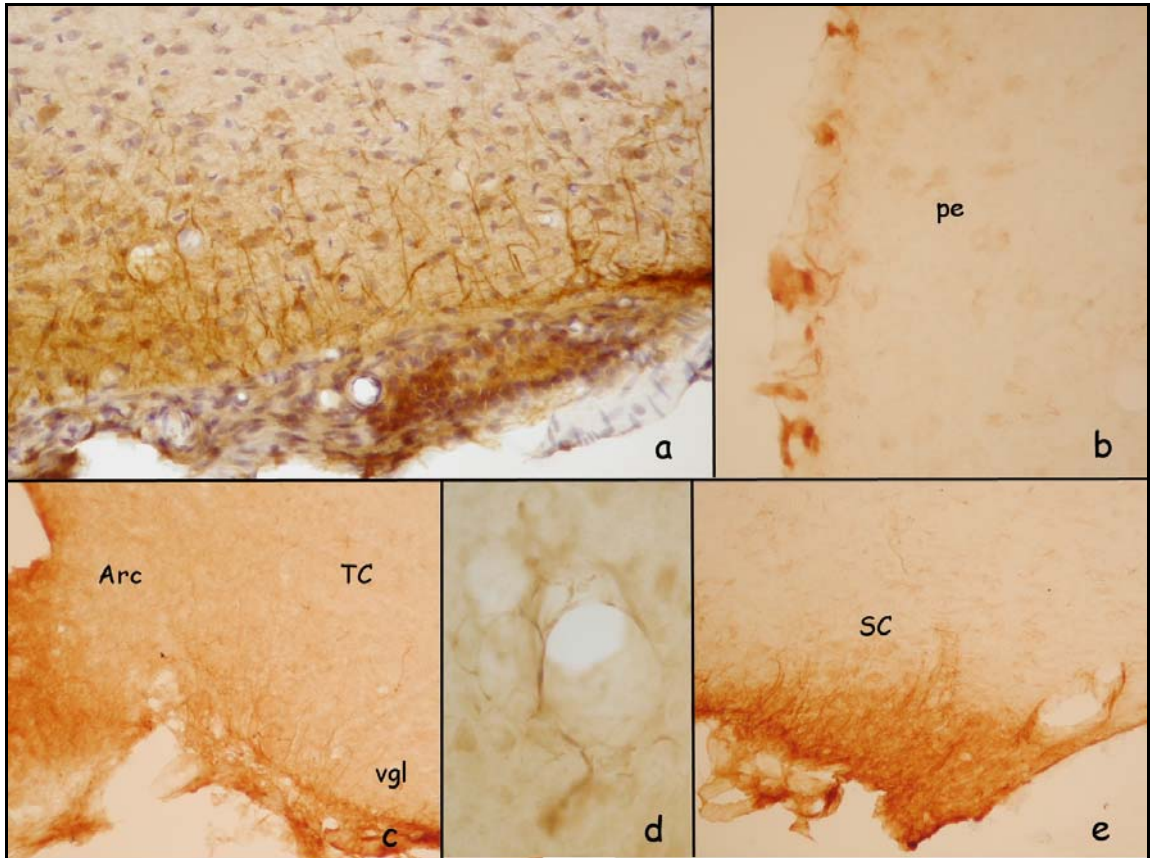
#### **IV.5.6. ANIMALES ENDOTOXÉMICOS PERFUNDIDOS A LAS 24H:**

*El patrón IHC, presentado por los animales endotoxémicos perfundidos a las 24h, fue de bastante menor intensidad que el del resto de los animales endotoxémicos perfundidos a las diferentes horas. Pareciéndose este marcaje más al de los animales controles, que se centra básicamente en los astrocitos fibrosos piales, en los CVOs y en los ependimocitos.*

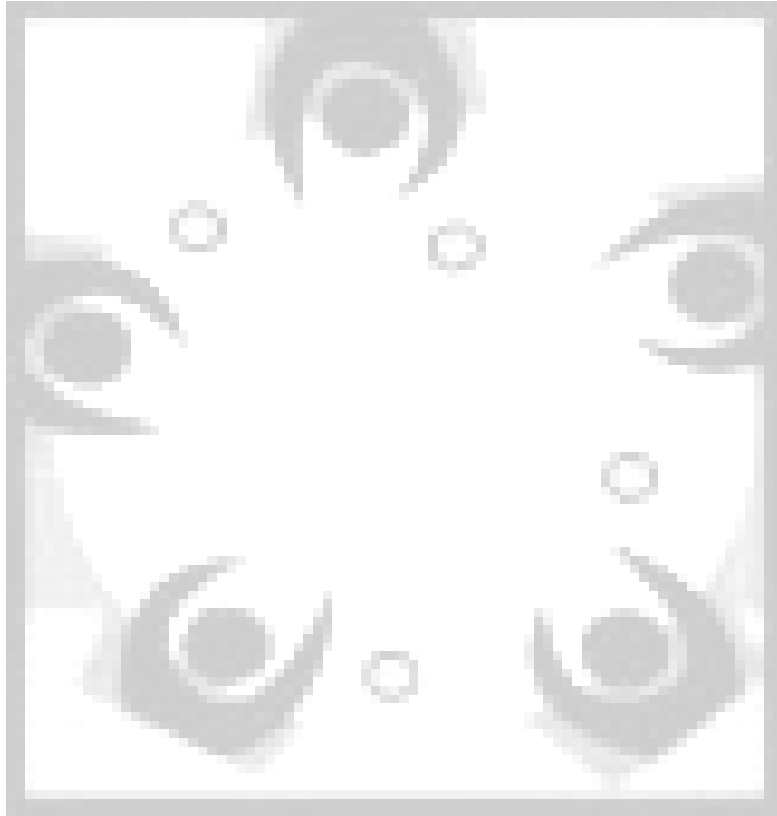
*A esta hora, el Arc junto con la ME, presentaron una disminución de marcaje bastante significativa. (Fig. 59)*



**Figura 58.** Inmunoexpresión de PCT en cerebros de ratas endotoxémicas perfundidas a las 12h. **a:** endimocitos, tanicitos PCT positivos del 3V y astrocitos protoplásmicos del pe, 400x, **b:** astrocitos protoplásmicos del TC ventral y rostral, 200x, **c:** astrocitos "pies chupadores" PCT reactivos del AH/PO, 200x, **d:** astrocitos fibrosos piales de la vgl, 400x.



**Figura 59.** Inmunoexpresión de PCT en cerebros de ratas endotoxémicas perfundidas a las 24h. **a:** astrocitos fibrosos piales PCT positivos de la vlg, 200x, **b:** endimocitos, tanicitos PCT positivos del 3V, y astrocitos estrictamente mediales del pe **c:** marcaje de PCT en la zona del Arc, TC y vgl, 100x, **d:** astrocitos "pies chupadores" PCT reactivos del AH/PO, 400x, **e:** astrocitos fibrosos PCT positivos de la SC del SO, 200x.



---

## ***DISCUSIÓN***

## V. DISCUSIÓN:

- *Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la administración periférica de LPS produce un incremento significativo de los niveles plasmáticos de PCT, correlacionados con su expresión a nivel central. Nuestros datos concuerdan con los existentes en la extensa bibliografía clínica, pues, estos niveles plasmáticos de PCT aumentan significativamente en presencia de endotoxina de un modo rápido, progresivo y duradero (102), confirmando así su valor como marcador diagnóstico en infecciones por bacterias Gram (-). Estos datos están apoyados por la reciente investigación básica con animales de experimentación (170-172).*

*Así, la administración periférica de LPS en ratas, provoca un aumento rápido de los niveles plasmáticos de PCT que incrementan paulatina y progresivamente hasta las 12h, momento a partir del cual, comienzan a disminuir lentamente hasta alcanzar sus valores basales aproximadamente a las 24h. Estos valores obtenidos en ratas presentan una cinética parecida a los hallados en endotoxemias o septicemias en humanos (102), hamsters (141, 170, 174), monos (172) y cerdos (171). Además estos valores son similares a los obtenidos en estudios con ratas y endotoxina a dosis pirogénicas más bajas (234); lo que sugiere su posible participación en la respuesta de fase aguda.*

*Con respecto a la fiebre provocada por bacterias Gram (-), la vía de administración del LPS, así como la dosis y la temperatura ambiental, provocan cambios en la fiebre inducida por LPS. Está comprobado que la administración i.p. de endotoxina (al requerir la inmovilización del animal) provoca un primer incremento de Tc a la 1h debido a una hipertermia por el estrés sufrido, un segundo incremento de Tc a las 3h (fase I de la fiebre) y un tercer incremento de Tc a las 6h (fase II de la fiebre); a diferencia de la fiebre producida por la inyección i.v. de LPS, que no presenta la hipertermia inicial, y si una fiebre polifásica compuesta por tres fases (235-237).*

*En el presente trabajo, los valores plasmáticos de PCT obtenidos tras la administración de LPS, se correlacionan con las distintas fases de la fiebre bifásica producida por la administración i.p. de endotoxina (227).*

- La administración central (icv) de PCT, provoca una disminución dosis-dependiente de la Tc en ratas, inicialmente a la 1h, y posteriormente de 4-8h. Al igual que los valores plasmáticos de PCT, existe una primera respuesta aguda y una segunda posterior sostenida y más intensa.*

*Como demuestran Nysten et al. (170), la administración periférica de PCT en hámsters no provoca cambios significativos en su supervivencia, a diferencia de los animales sépticos tratados con la misma dosis de PCT, que duplican su tasa de mortalidad. Dado que se ha sugerido la existencia de una correlación inversa entre la Tc y la mortalidad en procesos sépticos, inicialmente era de esperar que la administración central de PCT, en ratas normales, no modificara la Tc. Sin embargo, la microinyección de PCT a distintas dosis (2-100 ng) equivalentes a los valores de PCT encontrados en diferentes situaciones clínicas (113, 106, 108, 91) produce una disminución dosis dependiente de la Tc.*

*Curiosamente la dosis mayor utilizada (1000ng), equivalente a los valores séricos de PCT encontrados en sepsis (200ng/ml) (91), no modifica significativamente la Tc, lo que sugiere, entre otras posibles explicaciones, que la dosis que produce un efecto hipotérmico es menor, o bien, que nos encontramos frente a una dosis tóxica.*

*En nuestro modelo experimental, el efecto máximo sobre la Tc (hipotermia), ocurre con la dosis de 100ng icv. Es decir, una dosis equivalente a los niveles encontrados en bacteriemias severas, proceso para el cual la PCT está recomendada específicamente como marcador clínico (181-189).*

- En estudios anteriores realizados por nuestro grupo, la administración de PCT (2, 3, 4µg/kg i.p.) una hora antes de la administración de LPS (50µg/kg), provocó una inhibición dosis-dependiente de la fiebre inducida por la endotoxina (228). La disminución*

máxima de la fiebre se obtuvo al administrar la dosis mayor, lo que equivaldría a unos niveles plasmáticos de PCT en torno a los 20ng/ml. Este efecto antipirético de la PCT está en consonancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en el que **la administración central de PCT disminuye significativamente la fiebre, a una dosis inhibitoria máxima (100 ng) equivalente a 20ng/ml en sangre. Este efecto se ejerce fundamentalmente sobre la segunda fase de la fiebre provocada por endotoxina.** Estos resultados concuerdan con estudios recientes que incluyen a la PCT dentro de la familia antiinflamatoria que inhibe diferentes procesos involucrados durante la respuesta a LPS (175, 176).

El efecto de la administración central de PCT sobre la fiebre provocada por la administración de LPS tiene dos fases, una primera aguda (alrededor de la 1h que coincide con la hipertermia provocada por el estrés) y una segunda posterior, más intensa, que coincide con la fase II de la fiebre de 6 a 12h. En ambos casos se produce una disminución significativa de la fiebre, cuando la dosis de PCT aplicada está entre 4 y 100ng. Al igual que el efecto central de la administración de PCT sobre la Tc y los valores plasmáticos de PCT, existe una primera respuesta en la fase aguda y una segunda posterior mas intensa.

La mayor dosis empleada en el presente estudio de 1000ng (equivalente a los niveles de PCT en sangre en sepsis severas), no provoca cambios sobre la fiebre inducida por LPS. El hecho de que niveles más altos de PCT no guarden una correlación directa con el efecto antipirético y no posean un efecto antiinflamatorio (172-174), podría ser explicado de forma similar a lo que sucede con otros mediadores endógenos (TNF- $\alpha$ , IL-6) que desempeñan tanto un papel pro- como anti-inflamatorio durante los procesos sépticos según la naturaleza y/o gravedad de dicho procesos.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, la PCT parece desempeñar un papel en la regulación de la hipertermia provocada por el estrés, y de la segunda fase de la fiebre inducida por LPS. Se ha comprobado por diversos estudios usando distintos inhibidores de la síntesis de PGs, como el salicilato sódico y la indometacina, a nivel periférico y central, que la segunda fase de la fiebre es independiente de la primera (238).



*La primera fase de la fiebre depende de las PGs y los PE de la periferia que actúan sobre distintos lugares del SNC; mientras que la segunda fase parece depender de las PGs y PE sintetizados en las regiones cercanas a los CVOs, fundamentalmente del VOLT (239-241). Concretamente, se ha demostrado que en la fase primera existe un incremento de las enzimas PLA2, COX-2 y PGES en la periferia y en el SNC; y que durante la segunda fase existe un incremento de la PLA2 y la PGES en el hipotálamo y un descenso de la producción de COX-1 y COX-2 en todos los tejidos estudiados (242). Estos datos junto a los resultados obtenidos infieren que la PCT ejerce su acción a nivel central, pues tanto su administración periférica (228) como central produce una disminución en la segunda fase de la fiebre inducida por endotoxinas bacterianas.*

*Estos resultados están en consonancia con los múltiples datos obtenidos por otros autores, que indican, que la PCT puede ser un mediador secundario que incrementa, amplifica o regula, más que inicia, la respuesta séptica o en este caso febril (131, 165, 166).*

*Se ha observado que en cultivos de células musculares, valores moderados de PCT suprimen la acción estimuladora del TNF- $\alpha$  y del IFN- $\gamma$  para sintetizar la iNOS (167). Así, la PCT regularía la producción de NO que existe durante la fiebre por bacterias Gram (-). Se ha comprobado que el NO es esencial para la producción de la fiebre, y que la administración icv de un inhibidor de la NOS (L-NAME) provoca una hipotermia que dura más de 4h en ratas normales (243), y una disminución de la fiebre en ratas endotoxémicas. Estos efectos son curiosamente parecidos a los producidos por la administración central de PCT sobre la Tc y la fiebre endotoxémica, lo que podría explicar el efecto antiinflamatorio de la PCT a dosis terapéuticas. En el caso de la sepsis existe una desregulación de los niveles de PCT, que en unión a otros desajustes que se producen durante la sepsis, hacen que no ejerza su acción antiinflamatoria.*

*En cuanto a la acción de la PCT sobre la hipertermia provocada por el estrés, habrá que averiguarla en estudios posteriores, ya que puede ser que la PCT esté implicada en los mecanismos del estrés, y esté relacionado con el Pa, la CRF y la adrenocorticotropina, como la mayoría de las CC (244, 245). De hecho, se sabe que los inhibidores de la NOS, potencian y prolongan la acción de los LPS sobre el HPA (246), y que la*

*administración periférica de bloqueantes de la NOS inhiben el estrés inducido por la activación de neuronas del Pa (247).*

*Teniendo en cuenta que en procesos febriles trifásicos provocados por la administración de LPS i.v., la primera fase aguda de la fiebre (coincidente con la hipertermia de la fiebre bifásica de la administración de LPS i.p.) depende de la COX-2 y la PGES del hígado y pulmón (242), y que recientemente se ha demostrado que estos órganos son máximos productores de la PCT durante procesos sépticos (140, 141), debe existir conexión entre la estimulación de estos órganos, la respuesta de fase aguda, la hipertermia y la PCT.*

***• Estudios IHC demuestran la presencia de PCT en diversas estructuras cerebrales incluidas los astrocitos del hipotálamo preóptico de ratas normales y endotoxémicas.***

*Nuestro trabajo ha demostrado por primera vez la presencia de PCT en astrocitos de cerebro de ratas en estado normal y de endotoxemia, dato que se correlaciona con los valores de PCT encontrados en LCR, ya que incluso en estado normal se detecta PCT (0.15ng/ml), y estos valores aumentan en meningitis bacteriana (> 0.5ng/ml) (214) y en pacientes con traumatismos craneoencefálicos (0.41ng/ml) (215, 216).*

*Los astrocitos PCT reactivos, concordando con los datos anteriores referentes a la Tc y a la fiebre, se localizaron en zonas termorreguladoras tales como: AH/PO (zona ventral), SC, Sch, 3V anterior y VOLT (248). Las últimas revisiones proponen que la fiebre inducida por la inyección i.v. de LPS se debe a la producción de PGE2 por parte de la microglia perivascular y los macrófagos de las meninges a nivel del AH/PO en su zona anteroventral. Esta localización es estratégica, ya que se encuentran fuera de la BHE (aquí también se marca la PCT). Así la inducción de COX-2 por parte de los LPS se localiza en el AH/PO y proyecta al Pa (directa e indirectamente). El Pa posee una posición ideal para producir fiebre, ya que regula funciones autónomas y está estrechamente relacionado con la estimulación del eje HPA (aquí también se marca la PCT) (249).*

*Este marcaje astrocitario se caracteriza por ser siempre intracitoplásmico, sugiriendo un papel funcional intracelular, probablemente mediado por el AMPc como ya sugieren otros trabajos (250). Sabemos que la PCT posee un lugar diana de fosforilación para las kinasas, que pueden actuar como señales proteicas.*

*Además de encontrarse en astrocitos de zonas hipotalámicas termorreguladoras, curiosamente la PCT se localiza en las mismas zonas por donde acceden las citocinas al SNC: CVOs, Sol, 3V, vasos sanguíneos cerebrales y meninges (66); y siempre en astrocitos. Así se encuentran marcados diferentes tipos de astrocitos: protoplásmicos, piales, fibrosos, tanicitos, unidos a vasos por sus "pies chupadores"; y endimocitos (Fig. 3). Esta localización, también coincide con la de los receptores CD14 de los LPS a nivel central: leptomeninges, pch, vasos sanguíneos del cerebro, CVOs, MPO, AH, SO, Pa, Arc y Sol (31), aunque este marcaje no es astrocitario.*

*Por estudios de hibridación "in situ" sabemos que los receptores de CT (que usa la PCT) se localizan en las áreas preópticas (MPO, MPA, LPO), el Pa y el Arc (218). Por tanto la localización central de la PCT en zonas termorreguladoras, coincide con la de sus receptores.*

*Curiosamente el marcaje de los astrocitos fibrilares piales de la vgl, de los endimocitos (una de las principales fuentes de producción de NO en el cerebro (244)), tanicitos, y de los CVOs permanece en todos los casos (con diferente intensidad). Estas células están implicadas en la comunicación de la sangre con el parénquima. Sin embargo los astrocitos protoplásmicos y "pies chupadores" del parénquima, varían su expresión claramente en los diferentes casos.*

*Esta diferencia en el marcaje astrocitario induce a pensar en la posibilidad de que exista una PCT estructural (meninge ventral y endimocitos, con una función estrechamente relacionada con la BHE) y una PCT inducida en los astrocitos protoplásmicos parenquimales.*

*La intensidad del marcaje astrocitario de PCT tras la inyección de LPS en las zonas termosensibles del hipotálamo es paralela a la fiebre inducida por LPS i.p. Así, a la hora existe una sobreexpresión de PCT en los alrededores del 3V, en el pe, que se extiende al Pa, al TC y a la zona preóptica termorreguladora, coincidente con el primer incremento de Tc*

*tras la administración de LPS debida a la hipertermia por el estrés. Es a esta hora, a la única que aparece PCT en el Pa, lo que supondría que la primera expresión de PCT estaría relacionada con la producción del estrés (244) y no con la primera fase de la fiebre que es de origen periférico. Recientemente se ha demostrado, para diferenciar el estrés emocional (inmovilización) del fisiológico (hemorragia o infección), que la expresión de la c-fos, en ratas inyectadas i.p. con LPS y de ratas inmovilizadas durante 30min, es muy parecida en el Pa (251), aunque existan grandes diferencias en cuanto a la expresión de genes, neuropéptidos y señales moleculares usadas (252). Por tanto es difícil diferenciar el patrón de marcaje de c-fos en un caso y otro. Para solucionar este problema, y averiguar si el marcaje astrocitario de PCT a la 1h tras la endotoxina, se debía a un estrés emocional o a uno fisiológico, analizamos el marcaje de PCT a la hora tras la administración de LPS i.p., en cerebros de ratas endotoxémicas habituadas al estrés, y no habituadas. Curiosamente, el marcaje fue similar en ambos casos, lo que implica que la primera expresión de PCT en cerebro se debe a una hipertermia provocada por un estrés fisiológico frente a la llegada de la endotoxina, y no a un estrés emocional.*

*A partir de la primera hora, existe una disminución del marcaje astrocitario, sobre todo de los astrocitos protoplásmicos del Pa (que desaparecen) y del pe, aunque el marcaje es superior al del estado normal. A las 6h el marcaje se hace más intenso en el AH/PO, coincidiendo con el pico máximo de fiebre. A las 12h la inmunorreactividad disminuye al igual que la fiebre, hasta llegar a un estado basal a las 24h.*

*En base a la relación inmunoexpresión-fiebre, es particularmente interesante, teniendo en cuenta los resultados previos, la presencia de PCT en el Sol, pues parece ser que las fibras vagales eferentes participan en la fase II de la fiebre inducida por LPS i.p., justamente la que queda disminuida significativamente en ratas endotoxémicas microinyectadas icv con PCT (253). Mas aún, sabiendo que el otro nervio que podría estar implicado en la producción de fiebre por LPS, el nervio esplénico, no está involucrado en dicho mecanismo (254). Así la PCT cobra cierta importancia en el mecanismo neural de propagación de la fiebre.*

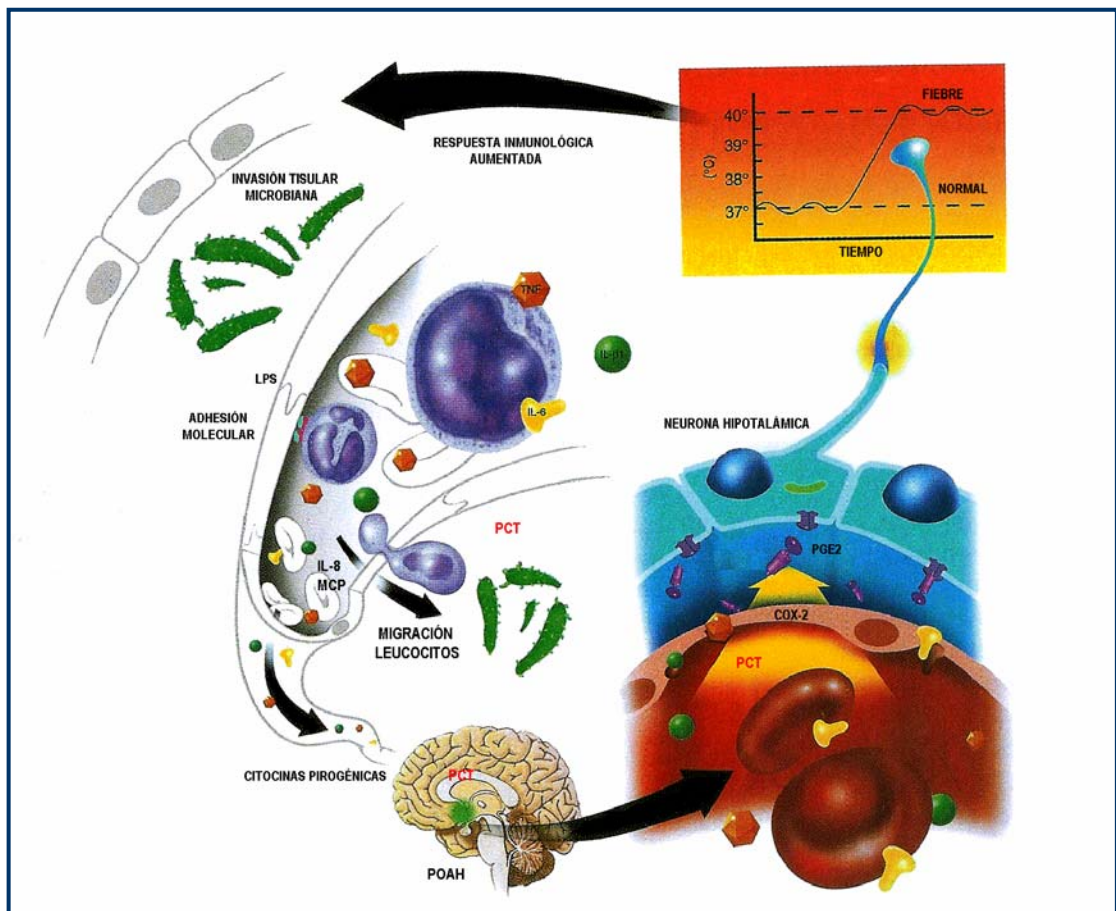
*Existe también un paralelismo en la relación inmunoexpresión de PCT y niveles plasmáticos de ésta en presencia de endotoxina bacteriana, pues la ME (que conforma el sistema porta-hipofisario) está directamente relacionada con la liberación a sangre de hormonas por parte de la hipófisis, y presenta inmunorreactividad a la PCT. Así a la hora existe un marcaje PCT positivo de la ME, que se va haciendo ligeramente mas intenso hasta llegar a un máximo a las 6h que se mantiene hasta las 12h y comienza a disminuir, hasta practicamente vaciarse a las 24h (exactamente igual que los niveles plasmáticos de PCT en sangre). Estos datos concuerdan con el trabajo de Kiriyama (145) que tras administrar LPS 5mg/kg i.p. en ratas mide la expresión del ARNm de CT, demostrando que la expresión de ARNm se va incrementando significativamente en la hipófisis a las 6-12h, paralelamente a los niveles de PCT en sangre, lo que a su parecer, implica que la hipófisis es una de las fuentes de producción de PCT sérica durante la sepsis. De hecho, otros trabajos han propuesto al cerebro como fuente de producción de PCT durante la sepsis (140-142), aunque no han entrado en la posible función central de la PCT.*

*Como se comentó en apartados anteriores, la PTH y las PTHrP actúan como hipercalcemiantes, y al igual que la PCT, clinicamente están relacionadas con la gravedad de la enfermedad. Quizás estos péptidos tengan más relación de la que parece, ambos se localizan en astrocitos frente a la endotoxemia (219, 220), y se estimulan por el TNF- $\alpha$  en plasma, y probablemente, al igual que la PTHrP, la producción de PCT esté estimulada en los astrocitos por la llegada de TNF- $\alpha$ . Las PTHrP inducen la expresión de IL-6 (citocina neuroprotectora), por lo que se piensa que juegan un papel como mediadores en la respuesta inflamatoria cerebral, en la que existe relación entre neuronas y glia. Curiosamente, también existe correlación entre los valores de PCT en LCR y los de IL-6. Las PTHrP presumiblemente están implicadas en la respuesta inflamatoria a nivel central, sus similitudes con la PCT hacen especular que la PCT puede ser uno de los miembros de la familia de los neuropéptidos vasoactivos, que actúan como respuesta adaptativa (215, 216), incidiendo en la implicación de la PCT con la disminución del NO.*

*A pesar de no ser un marcaje neuronal, la inmunorreactividad de algunos astrocitos frente a la PCT puede indicar un papel fisiológico de la PCT. Se sabe que los astrocitos tras la administración de LPS, y a pesar*

*de no poseer receptores CD14, en presencia de CD14 solubles, estimulan la liberación de MAPK, erk-1 y 2, p38, lo que provoca la síntesis de citocinas a nivel central (61), curiosamente los astrocitos reactivos a la PCT se localizan en zonas donde existen CD14. Recientemente también se ha demostrado que los astrocitos son células excitables y que su excitabilidad se basa en variaciones de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , y que esta estimulación puede desencadenarse por la actividad neuronal, lo que demuestra la existencia de una comunicación neurona-astrocito (62). Acorde con el planteamiento (expuesto en párrafos anteriores) de que la PCT puede actuar inhibiendo la iNOS, se ha demostrado que los astrocitos reactivos provocan un exceso o una desregulación sobre la gran cantidad de NO liberado en diferentes desórdenes neurológicos y en presencia de los lipopolisacáridos a través de la iNOS (255-257).*

*En cualquier caso, queda demostrado que la PCT ejerce cierto papel en la regulación de la fiebre inducida por bacterias Gram (-), tanto a nivel central como periférico. La PCT se comportaría en relación a la fiebre como ilustra la figura 60.*



**Figura 60.** Posible implicación de PCT en el proceso febril a nivel periférico y central. Tras una invasión tisular por bacterias Gram (-), los LPS se unen a células inmunes del torrente sanguíneo que liberan citocinas pirogénicas y PCT (la PCT también aparece en el torrente sanguíneo secretada por diversos órganos como hígado y pulmón), que llegan al SNC fundamentalmente a través de los CVOs. Una vez que llegan al SNC, interactúan con células neuronales (neuronas o glia) que regulan diferentes mecanismos celulares. Entre estos mecanismos destacan la COX-2 y el NO, se libera PGE2 en el PO/AH, y se estimulan las neuronas hipotalámicas, provocando cambios en la Tc (FIEBRE). Igualmente también se estimula el eje HPA y se libera a través de la hipófisis de nuevo PCT al torrente sanguíneo.



---

## ***CONCLUSIONES***



## **VI. CONCLUSIONES**

### **PRIMERA:**

*La administración periférica de LPS 100µg/kg i.p., incrementa significativamente los niveles plasmáticos de PCT de un modo rápido, progresivo y duradero en ratas, paralelo a los valores clínicos en humanos y a la fiebre provocada por bacterias Gram (-).*

### **SEGUNDA:**

*La administración icv de PCT (2 a 100ng) produce una disminución dosis-dependiente de la Tc, a los 30 min y fundamentalmente de 4h a 8h. Dosis elevadas (1000ng) no provocan ningún cambio sobre la Tc.*

### **TERCERA:**

*El pretratamiento con PCT icv a dosis terapéuticas (4ng, 10ng y 100ng), disminuye significativamente la respuesta febril inducida por LPS, fundamentalmente la segunda fase de la fiebre. La dosis 1000ng no provoca ningún cambio sobre la fiebre de origen bacteriano Gram (-).*

### **CUARTA:**

*La inmunoexpresión de la PCT en el cerebro, se localizó intracitoplasmáticamente en los astrocitos de zonas termorreguladoras, CVOs, Sol, Arc y pía de ratas normales y endotoxémicas, en estas últimas de un modo tiempo-dependiente.*

### **QUINTA:**

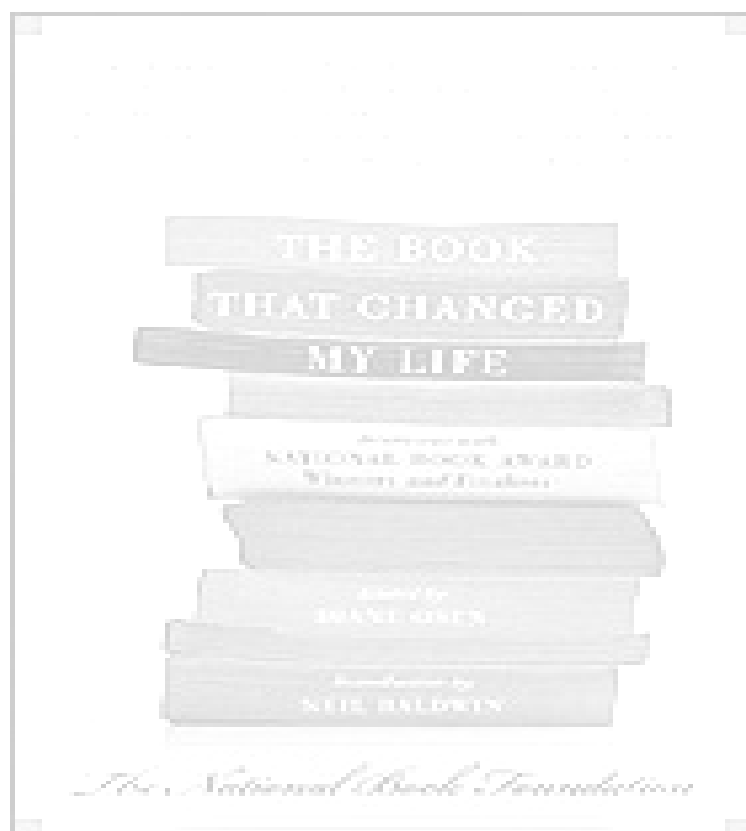
*La administración de endotoxina i.p. produce una fiebre bifásica paralela a la inmunoexpresión de PCT en zonas termorreguladoras del hipotálamo.*

***SEXTA:***

*La administración de endotoxina produce una elevación de los niveles plasmáticos de PCT tiempo-dependientes y proporcionales a la inmunoexpresión de PCT en la ME.*

***SÉPTIMA:***

*La PCT, a dosis adecuadas, parece provocar un efecto antipirético a nivel central, en animales con endotoxemia.*



---

## ***BIBLIOGRAFÍA***

## ***VI. BIBLIOGRAFIA\****

1. Cassel J, Casselman W. Regulation of body heat: the evolution of concepts and associated research. In: Thermoregulation: physiology and biochemistry. New York: Pergamon Press; 1990. p. 17-50.
2. Miñano FJ, Sancibrián M, Myers RD. Fever induced by macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) in rats: hypothalamic sites of action. *Brain Res Bull* 1991; 27(5): 701-706.
3. Fernández-Alonso A, Miñano FJ, Myers RD. Fever induced in rats by intrahypothalamic macrophage inflammatory protein (MIP)-1 beta: role of protein synthesis. *J Neurosci Res* 1995; 42(3): 343-349.
4. Cooper KE, Cranston WI, Honour AJ. Observation on the site and mode of action of pyrogens in the rabbit brain. *J Physiol (London)* 1967; 191: 325-337.
5. Boulant JA. Thermoregulation in fever: Basic mechanisms and management. Mackowiak PA (ed). Philadelphia: Lippincott-Raven publishers; 1997. p. 35-58.
6. Zeisberger E. Central modulators of thermoregulation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1990; 1(1-4): 277-289.
7. Miñano FJ, Armengol JA, Sancibrian M, Pomares F, Benamar K, Myers RD. Macrophage inflammatory protein-1beta and inducible nitric oxide synthase immunoreactivity in rat brain during prostaglandin E2 or lipopolysaccharide induced fever. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 813: 272-280.
8. Zeisberger E, Roth J. Neurobiological concepts of fever generation and suppression. *Neuropsychobiology* 1993; 28(1-2): 106-109.
9. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM. New concepts on the pathogenesis of fever. *Rev Infect Dis* 1988; 10(1): 168-189.
10. Dinarello CA. Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis* 1999; 179 Supl 2: S294-S304.
11. Beeson PB. Temperature-elevating effect of a substance obtained from polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1948; 27: 524.
12. Kluger MJ, Kozak W, Leon LR, Soszynski D, Conn CA. Cytokines and fever. *Neuroimmunomodulation* 1995; 2(4): 216-223.
13. Licinio J, Wong ML. Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system. *J Clin Invest* 1997; 100: 2941-2947.
14. Coceani F, Lees J, Bishai I. Further evidence implicating PGE2 in the genesis of pyrogen fever. *Am J Physiol* 1998; 254: R463-R469.
15. Tavares E, Miñano FJ. RANTES: a new prostaglandin dependent endogenous pyrogen in the rat. *Neuropharmacology* 2000; 39(12): 2505-2513.
16. Scammell T, Elmquist J, Griffin J, Saper C. Ventromedial Preoptic Prostaglandin E2 Activates Fever Producing Autonomic Pathways. *J Neurosci* 1996; 16(19): 6246-6254.

17. Morimoto A, Ono K, Watanabe T, Murakami N. Activation of Brain Regions of Rats during Fever. *Brain Research* 1986; 381: 100-105.
18. Refinetti R. Homeostasis and circadian Rhythmicity in the control of body temperature. In: *Ann NY Acad Sci, Thermoregulation*, Vol. 813. Ed. Clark M. Blatteis. New York; 1997. p. 63-70.
19. Andersson J, Nagy S, Björk L, Abrams J, Holm S, Andersson U. Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level. *Immunol Rev* 1992; 127: 69-96.
20. Lin HC, Wan FJ, Kang BH, Wu CC, Tseng CJ. Systemic administration of lipopolysaccharide induces release of nitric oxide and glutamate and c-fos expression in the nucleus tractus solitarius of rats. *Hypertension* 1999; 33(5): 1218-1224.
21. Zhang YH, Lu J, Elmquist JK, Saper CB. Lipopolysaccharide activates specific populations of hypothalamic and brainstem neurons that project to the spinal cord. *J Neurosci* 2000; 20(17): 6578-6586.
22. Elmquist JK, Saper CB. Activation of neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus by intravenous lipopolysaccharide. *J Comp Neurol* 1996; 374: 315-331.
23. Elmquist JK, Scammell TE, Jacobson CD, Saper CB. Distribution of fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. *J Comp Neurol* 1996; 371: 85-103
24. Laflamme N, Feuvrier E, Richard D, Rivest S. Involvement of serotonergic pathways in mediating the neuronal activity and genetic transcription of neuroendocrine corticotropin-releasing factor in the brain of systemically endotoxin-challenged rats. *Neuroscience* 1999; 88: 223-240.
25. Nappi RE, Bonneau MJ, Rivest S. C-fos and CRF gene transcription in the brains of endotoxin-challenged cycling female rats: A possible relevance for neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Neuroendocrinology* 1997; 65: 29-46
26. Rivest S, Laflamme N. Neuronal activity and neuropeptide gene transcription in the brain of immune-challenged rats. *J Neuroendocrinol* 1995; 7: 501-525.
27. Rivest S, Laflamme N, Nappi RE. Immune challenged and immobilization stress induce transcription of the gene encoding the CRF receptor in selective nuclei of the rat hypothalamus. *J Neurosci* 1995; 15: 2680-2695.
28. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249: 1431-1433.
29. Baeuerle PA. Proinflammatory signaling: Last pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Curr Biol* 1998; 8: R19-R22.
30. Baeuerle PA, Baltimore D. NF- $\kappa$ B: Ten years after. *Cell* 1996; 87: 13-20.
31. Lacroix S, Feinstein D, Rivest S. The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol* 1998; 8: 625-640.

32. Nadeau S, Rivest S. Regulation of the gene encoding tumor necrosis factor- $\alpha$  in the rat brain and pituitary in response to different models of systemic immune challenge. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 61-77.
33. Quan N, Whiteside M, Herkenham M. Time course and localization patterns of interleukin-1 $\beta$  mRNA expression in the brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience* 1997, 83: 281-293.
34. Vallieres L, Rivest S. Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp 130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin 1- $\beta$ . *J Neurochem* 1997; 69: 1668-1683.
35. Beg AA, Finco TS, Nantermet PV, Baldwin AS. Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I $\kappa$ B $\alpha$ : A mechanism for NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 3301-3310.
36. Fearn C, Loskutoff DJ. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in induction of murine CD14 gene expression by lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1997; 65: 4822-4831.
37. Fearn C, Ulevitch RJ. Effect of recombinant interleukin-1 $\beta$  on murine CD14 gene expression in vivo. *Shock* 1998; 9: 157-163.
38. Horst Ibelgauf's COPE: Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia. [on line] 2003. URL: <http://www.Copewithcytokines.de/cope.cgi?3354>.
39. Zhao BY, Schwartz JP. Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives. *J Neurosc Res* 1998; 52: 7-16.
40. Lee YB, Nagai A, Kim SU. Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosc Res* 2002; 69: 94-103.
41. Feurer DJ, Weller RO. Barrier functions of the leptomeninges: a study of normal meninges and meningiomas in tissue culture. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1991; 17(5): 391-405.
42. Cassella JP, Lawrenson JG, Allt G, Firth JA. Ontogeny of four blood-brain barrier markers: an immunocytochemical comparison of pial and cerebral cortical microvessels. *J Anat* 1996; 189(Pt 2): 407-415.
43. Pardridge WM, editor. *The Blood-Brain Barrier. Cellular and Molecular Biology*. New York: Raven Press; 1993.
44. Bradbury MW editor. *Physiology and Pharmacology of the Blood-Brain Barrier. Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 103. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg; 1992.
45. Gjedde A. Blood-brain glucose transfer. In: *Physiology and Pharmacology of the Blood-Brain Barrier, Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 103. Ed. MWB Bradbury. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg; 1992. p. 65-115.
46. Pardridge WM. Blood-brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol* 1999; 5(6): 556-569.
47. Johansson B. The Blood-Brain Barrier and perivascular cells. In: *Immune responses in the nervous system. Molecular and cellular neurobiology*. Ed. NJ Rothwell. Oxford: Biosscientific publishers; 1995. p. 1-26.

48. Rubin LL, Ataddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22: 11-28.
49. Heimark RL. Cell-cell adhesion molecules of the blood-brain barrier . In: *The Blood-Brain barrier*. Ed WM Pardridge. New York: Raven Press; 1993. p. 87-106.
50. Rucker H, Wynder H, Thomas WE. Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Research Bulletin* 2000; 51(5): 363-369.
51. Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 2002; 200(6): 629-38.
52. Prat A, Biernacki K, Wosik K, Antel J. Glial Cell Influence on the Human Blood-Brain Barrier. *Glia* 2001; 36: 145-155.
53. Kong G, Kristesson K, Bentivoglio M. Reaction of mouse brain oligodendrocytes and their precursors, astrocytes and microglia, to proinflammatory mediators circulating in the cerebrospinal fluid. *Glia* 2002; 37: 191-205.
54. Martin-Ancel A, García-Alix A, Quero J. Meningitis bacteriana: mecanismos de daño cerebral y nuevas aproximaciones terapéuticas. *An Esp Pediatr* 1997; 47: 126-134.
55. Descamps L, Coisne C, Dehouck B, Cecchelli R, Torpier G. Protective effect of glial cells against lipopolysaccharide-mediated blood brain barrier injury. *Glia* 2003; 42(1): 46-58.
56. Janzer RC. The blood-brain barrier: cellular basis. *Inherited Metab Dis* 1996; 16: 639-647.
57. Benveniste EN. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. In: *Neuroimmunoendocrinology*. Ed. Blalock JE. Basel: S Kager; 1997. p. 31-75.
58. Benveniste EN. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9: 259-275.
59. Glabinski AR, Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors in CNS pathology. *J Neurovirol* 1999; 5:3-12.
60. Hesselgesser J, Horuk R. Chemokine ad chemokine receptor expression in the central nervous system. *J Neurovirol* 1999; 5: 13-26.
61. Schumann R, Pfeil D, Freyer D, Buerger W, Lamping N, Kirschning C, et al. Lipopolysaccharide and Pneumococcal Cell Wall Components Activate the Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK), erk-1, erk-2, and p38 in Astrocytes. *Glia* 1998; 22: 295-305.
62. Perea G, Araque A. Nuevas vías de información en el sistema nervioso: comunicación entre astrocitos y neuronas. *Rev Neurol* 2003; 36(2): 137-144.
63. Pan W. Interactions of cytokines with the blood-brain barrier: implications for feeding. *Curr Pharm Des* 2003; 9(10): 827-831.
64. Oldfield BJ, Mckinley MJ. Circumventricular organs. In: *The Rat nervous System*. E. Paxinos G. San Diego: Academic Press; 1995. p. 391-403.
65. Dong Y, Benveniste E. Immune Function of Astrocytes. *Glia* 2001, 36: 180-190.

66. Rivest S, Lacroix S, Vallieres L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 223(1): 22-38.
67. Sternberg EM. Neural-immune Interactions in Health and Disease. *J Clin Invest* 2001; 100(11): 2641-2651.
68. Mennicken F, Maki R, Souza E, Quirion R. Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning. *TiPS* 1999; 20: 73-78.
69. Banks WA, Kastin AJ, Durham DA. Bidirectional transport of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier. *Brain Res Bull* 1989; 23: 433-437.
70. John CD, Buckingham JC. Cytokines: regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Current Opinion* 2003; 3: 78-84.
71. Zeisberger E. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *J Therm Biol* 1999; 24(5-6): 287-326.
72. Hermann GE, Emch GS, Tovar CA, Rogers RC. C-Fos generation in the dorsal vagal complex after systemic endotoxin is not dependent on the vagus nerve. *Am J Physiol* 2001; 280(1): 289-299.
73. Miller AJ, Hopkins SJ, Luheshi GN. Sites of action of IL-1 in the development of fever and cytokine responses to tissue inflammation in the rat. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 1274-1279.
74. Cartmell T, Poole S, Rothwell NJ, Luheshi GN. Relationship between IL-1 and IL-1 receptor antagonist during the development of fever in the rat. *Ann NY Acad Sci* 1998; 856: 252-255.
75. Roth J, Störr B, Martin D, Voigt K, Zeisberger E. The Role of local induction of tumor necrosis factor by LPS within a subcutaneous air pouch in the development of a febrile response in guinea pigs. *Neuroimmunomodulation* 2000; 7: 169:76.
76. Miñano FJ, Fernández-Alonso A, Benamar K, Myers RD, Sancibrian M, Ruiz RM, Armengol JA. Macrophage inflammatory protein.1beta (MIP-1beta) produced endogenously in brain during E. coli fever in rats. *Eur J Neurosci* 1996; 8(2): 424-428.
77. Saper B, Breder Ch. The neurologic basis of fever. *New England J Med* 1994; 330: 1880-1886.
78. Komaki G, Arimura A, Koves K. Effect of intravenous injection of IL-1 $\beta$  on PGE2 levels in several brain areas as determined by microdialysis. *Am J Physiol* 1992; 262: E246-E251.
79. Hughes JH, Easom RA, Wolf BA, Turk J, McDaniel ML. Interleukin-1-induced prostaglandin E2 accumulation by isolated pancreatic islets. *Diabetes* 1989; 38: 1251-1257.
80. Tavares E, Miñano FJ. Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  induces dexamethasone-unresponsive fever in the rat. *NeuroReport* 1998; 11(9): 2519-2522.
81. Miñano FJ, Fernández-Alonso A, Myers RD, Sancibrian M. Hypothalamic interaction between macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta in rats: a new level for fever control?. *J Physiol* 1996; 491(pt 1): 209-217.
82. Tavares E, Miñano FJ. Differential sensitivities of pyrogenic chemokine fevers to cyclooxygenase isozymes antibodies. *Brain Res Bull* 2002; 978: 106-118.



83. Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* 1998; 395: 281-284.
84. Matsumura K, Watanabe Y, Imai-Matsumura K, Connolly M, Koyama Y, Onoe H, et al. Mapping of PGE2 binding sites in rat brain using quantitative autoradiography. *Brain Res* 1992; 581: 292-298.
85. Matsumura K, Watanabe Y, Onoe H, Hayaishi O. High density of PGE2 binding sites in the anterior wall of the 3<sup>rd</sup> ventricle: A possible site of its hyperthermic action. *Brain Res* 1990; 533: 147-151.
86. Ericsson A, Ek M, Lindfors N. Distribution of PGE2 receptor (EP3 subtype) mRNA containing cells in the rat central nervous system. *Soc Neurosci* 1995; 21: 98.
87. Matsumura K, Cao C, Watanabe Y. Prostaglandin system in the brain: Sites of biosynthesis and sites of action under normal and hyperthermic states. *Prog Brain Res* 1998; 115: 275-295.
88. Brunkhorst FM, Heinz U, Forycki ZF. Kinetics of procalcitonin in iatrogenic sepsis. *Intensive Care Med* 1998; 24: 888-892.
89. Claeys R, Vinken S, Spapen H et al. Plasma procalcitonin and C-reactive protein in acute septic shock: Clinical and biological correlates. *Crit Care Med* 2002; 30(4): 757-762.
90. Meisner M. Procalcitonin: A new innovative infection parameter, biochemical and clinical aspects. 3<sup>rd</sup>ed. Verlag, Stuttgart: Georg Thieme; 2000.
91. Casado Flores J, Blanco Quirós A. Procalcitonina: un nuevo marcador de infección bacteriana. *An Esp Pediatr* 2001; 54: 69-73.
92. Penel N, Fournier C, Degardin M, Kouto H, N`Guyen M. Fever and solid tumor: diagnostic value of procalcitonin and C-reactive protein. *Rev Med Interne* 2001; 22(8): 706-714.
93. Schwarz S, Bertram M, Schwab S, Andrassy K, Hacke W. Serum procalcitonin levels in bacterial and abacterial meningitis. *Clin Care Med* 2000; 28(6): 1828-1832.
94. Kuse E, Langefeld I, Jaeger K, Külpmann W. Procalcitonin in fever of unknown origin after liver transplantation: A variable to differentiate acute rejection from infection. *Crit Care Med* 2000; 28(2): 555-559.
95. Giamarellos-Bourboulis EJ, Grecka P, Poulakou G, Anargyrou K, Katsilambros N, Giamarellou H. Assessment of procalcitonin as a diagnostic marker of underlying infection in patients with febrile neutropenia. *Clin Infect Dis* 2001; 32(12): 1718-1725.
96. Balç C, Sungurtekin H, Gurses E, Sungurtekin U, Kaptanoglu B. Usefulness of procalcitonin for diagnosis of sepsis in the intensive care unit. *Crit Care* 2003; 7(1): 85-90.
97. Meisner M. Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin. *Clin Chim Acta* 2002; 323(1-2): 17-29.
98. Muller B, Becker KL. Procalcitonin: how a hormone became a marker and mediator of sepsis. *Swiss Med Wkly* 2001; 131(41-42): 595-602.
99. Ferriere F. [Procalcitonin, a new marker for bacterial infections]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2000; 58(1): 49-59.

100. Bohuon C. A brief history of procalcitonin. *Intensive Care Med* 2000; 26: S146-S147.
101. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* 1993; 341(8844): 515-518.
102. Dandona P, Nix D, Wilson MF, Aljada A, Love J, Assicot M, et al. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79(6): 1605-1608.
103. Mimoz O, Benoist JF, Edouard AR, Assicot M, Bohuon C, Samii K. Procalcitonin and C-reactive protein during the early posttraumatic systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med* 1998; 24(2): 185-188.
104. Von Heimburg D, Stieghorst W, Khorram-Sefat R, Pallua N. Procalcitonin a sepsis parameter in severe burn injuries. *Burns* 1998; 24(8): 745-750.
105. Carsin H, et al. Evolution and significance of circulating procalcitonin levels compared with IL-6, TNF alpha and endotoxin levels early after thermal injury. *Burns* 1997; 23(3): 218-224.
106. Meisner M, Tschaikowsky K, Hutzler A, Schick C, Schuttler J. Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery. *Intensive Care Med* 1998; 24(7): 680-684.
107. Werra de I, Jaccard C, Corradin SB, Chiolero R, Yersin B, Gallati H, et al. Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations: comparisons in patients with septic shock, cardiogenic shock, and bacterial pneumonia. *Crit Care Med* 1997; 25(4): 607-613.
108. Remskar M, Horvat M, Hojker S, Noc M. Procalcitonin in patients with acute myocardial infarction. *Wien Klin Wochenschr* 2002; 114(5-6): 205-210.
109. Rau B, Steinbach G, Gansauge F, Mayer JM, Grunert A, Beger HG. The potential role of procalcitonin and interleukin 8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Gut* 1997; 41(6): 832-840.
110. Name Bayona O, Fernández López A, Luaces Cubells C. Procalcitonina: una nueva herramienta diagnóstica en la infección bacteriana. *Med Clin (Barc)* 2002; 119(18): 707-714.
111. Nylén ES, Snider RH, Thompson KA, Rohatgi P, Becker KL. Pneumonitis-associated hyperprocalcitoninemia. *Am J Med Sci* 1996; 312(1): 12-18.
112. Gendrel D, Raymond J, Assicot M, Moulin F, Iniguez JL, Lebon P, Bohuon C. Measurement of procalcitonin levels in children with bacterial or viral meningitis. *Clin Infect Dis* 1997; 24(6): 1240-1242.
113. Mary R, Veinberg F, Couderec R. Acute meningitidis, acute phase proteins and procalcitonin. *Ann Biol Clin* 2003; 61(2): 127-137.
114. Whang KT, Steinwald PM, White JC, Nylén ES, Snider RH, Simon GL, et al. Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(9): 3296-3301.
115. Benoist JF, Mimoz O, Assicot M, Edouard A. Serum procalcitonin, but not C-reactive protein, identifies sepsis in trauma patients. *Clin Chem* 1998; 44 (8 Pt 1): 1778-1779.

116. Bernard L, Ferriere F, Casassus P, Malas F, Leveque S, Guillevin L, et al. Procalcitonin as an early marker of bacterial infection in severely neutropenic febrile adults. *Clin Infect Dis* 1998; 27(4): 914-915.
117. Christofilopoulou S, Charvalos E, Petrikkos G. Could procalcitonin be a predictive biological marker in systemic fungal infections?. Study of 14 cases. *Eur J Intern Med* 2002; 13(8): 493-495.
118. Gerard Y, Hober D, Petitjean S, Assicot M, Bohuon C, Mouton Y, et al. High serum procalcitonin level in a 4-year-old liver transplant recipient with a disseminated candidiasis. *Infection* 1995; 23(5): 310-311.
119. Chiwakata CB, Manegold C, Bonicke L, Waase I, Julch C, Dietrich M. Procalcitonin as a parameter of disease severity and risk of mortality in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 2001; 183(7): 1161-1164.
120. Davis TM, Assicot M, Bohuon C, St John A, Li GQ, Anh TK. Serum procalcitonin concentrations in acute malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88(6): 670-671.
121. Fries M, Kunz D, Gressner AM, Rossaint R, Kuhlen R. Is procalcitonin a new surrogate marker for hypoxic brain damage. *Crit Care (Lond)* 2002; 6: 59.
122. Stiletto RJ, Kirchner G, Ziering E. Procalcitonin (PCT) for monitoring ICU patients with severe polytrauma and early SIRS: results of a prospective study. *Crit Care (Lond)* 1998; 2: 039.
123. Chiesa C, Panero A, Rossi N, Stegagno M, De Giusti M, Osborn JF, et al. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clin Infect Dis* 1998; 26(3): 664-672.
124. Delevaux I, Andre M, Colombier M, Albuisson E, Meylheuc F, Begue R J, et al. Can procalcitonin measurement help in differentiating between bacterial infection and other kinds of inflammatory processes? *Ann Rheum Dis* 2003; 62(4): 337-340.
125. Eberhard OK, Haubitz M, Brunkhorst FM, Kliem V, Koch KM, Brunkhorst R. Usefulness of procalcitonin for differentiation between activity of systemic autoimmune disease (systemic lupus erythematosus/systemic antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis) and invasive bacterial infection. *Arthritis Rheum* 1997; 40(7): 1250-1256.
126. Sudhoff T, Giagounidis A, Karthaus M. Serum and plasma parameters in clinical evaluation of neutropenic fever. *Antibiot Chemother* 2000; 50: 10-19.
127. Fleischhack G, Kambeck I, Cipic D, Hasan C, Bode U. Procalcitonin in paediatric cancer patients: its diagnostic relevance is superior to that of C-reactive protein, interleukin 6, interleukin 8, soluble interleukin 2 receptor and soluble tumour necrosis factor receptor II. *Br J Haematol* 2000; 111(4): 1093-1102.
128. Fleischhack G, Cipic D, Juetter J, Hasan C, Bode U. Procalcitonin a sensitive inflammation marker of febrile episodes in neutropenic children with cancer. *Intens Care Med* 2000; 26: 202-211.
129. Le Moullec JM, Jullienne A, Chenais J, Lasmoles F, Guliana JM, Milhaud G, et al. The complete sequence of human preprocalcitonin. *FEBS* 1984; 1567: 93-97.
130. Liu YC, Nakano T, Elly C, Ishizaka K. Requirement of posttranslational modifications for the generation of biologic activity of glycosylation-inhibiting factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 9(23): 11227-11231.

131. Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S, Stonane E, Vogelsang H, Junker U, et al. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. *J Lab Clin Med* 1999; 134(1): 49-55.
132. Meisner M, Lohs T, Huettemann E, Schmidt J, Hueller M, Reinhart K. The plasma elimination rate and urinary secretion of procalcitonin in patients with normal and impaired renal function. *Eur J Anaesthesiol* 2001; 18 (2):79-87.
133. Russwurm S, Wiederhold M, Oberhoffer M, Stonans I, Zipfel PF, Reinhart K. Molecular aspects and natural source of procalcitonin. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37(8): 789-797.
134. Boucher BA. Procalcitonin: clinical tool or laboratory curiosity? *Crit Care Med* 2000; 28(4): 1224-1225.
135. Nijsten MW, Olinga P, The TH, de Vries EG, Koops HS, et al. Procalcitonin behaves as a fast responding acute phase protein in vivo and in vitro. *Crit Care Med* 2000; 28(2): 458-461.
136. Van Leeuwen HJ, Voorbij HA. [Procalcitonin concentrations in the diagnosis of acute inflammatory reactions]. *Ned Tijdschr Geneesk* 2002; 146(2): 55-59.
137. Whicher J, Bienvenu J, Monneret G. Procalcitonin as an acute phase marker. *Ann Clin Biochem* 2001; 38(Pt 5): 483-493.
138. Schifter S, Johansen TE, Johnsen AH. Molecular characterization of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in a rat medullary thyroid carcinoma cell line. *Peptides* 1995; 16(8): 1489-1496.
139. Adema GJ, Baas PD. A novel calcitonin-encoding mRNA is produced by alternative processing of calcitonin/calcitonin gene-related peptide-I pre-mRNA. *J Biol Chem* 1992; 267(11): 7943-7948.
140. Russwurm S, Stonans I, Stonane E, Wiederhold M, Luber A, et al. Procalcitonin and CGRP-1 mRNA expression in various human tissues. *Shock* 2001; 16(2): 109-112.
141. Muller B, White JC, Nysten ES, Snider RH, Becker KL, Habener JF. Ubiquitous expression of the calcitonin-receptor-like receptor gene in multiple tissues in response to sepsis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(1): 396-404.
142. Morgenthaler NG, Struck J, Chancerelle Y, Weglohner W, Agay D, Bohuon C et al. Production of procalcitonin (PCT) in non-thyroidal tissue after LPS injection. *Horm Metab Res* 2003; 35: 290-295.
143. Meisner M, Muller V, Khakpour Z, Toegel E, Redl H. Induction of procalcitonin and proinflammatory cytokines in an hepatic baboon endotoxin shock model. *Shock* 2003; 19(2): 187-90.
144. Suarez Domenech V, White JC, Wagner KE, Snider RH, Nysten ES, Becker KL. Non-neuroendocrine calcitonin gene family of peptides: pathophysiological role of hormones in human sepsis. *Endocrine Society* 2001; 3: 473.
145. Kiriya Y, Nomura Y, Tokumitsu Y. Calcitonin gene expression induced by lipopolysaccharide in the rat pituitary. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282 (6): E1380-E1384.

146. Brunkhorst FM, Forycki ZF, Wagner J. Identification of immunoactivation of infectious origin by procalcitonin-immunoreactivity in different body fluids. *Clin Intens Care* 1997; 7: 41.
147. Struck J, de Almeida P, Bergmann A, Morgenthaler NG. High concentrations of procalcitonin but not mature calcitonin in normal human milk. *Horm Metab Res* 2002; 34(8): 460-465.
148. Slavakis A, Papadimas J. Procalcitonin: does it play a role in male reproduction? *Fertil Steril* 2000; 74(6): 1227-1228.
149. Shimetani N, Shimetani K, Mori M. Levels of three inflammation markers, C-reactive protein, serum amyloid A protein and procalcitonin, in the serum and cerebrospinal fluid of patients with meningitis. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61(7): 567-574.
150. Nathan BR, Scheld WM. The potential roles of C-reactive protein and procalcitonin concentrations in the serum and cerebrospinal fluid in the diagnosis of bacterial meningitis. *Curr Clin Top Infect Dis* 2002; 22: 155-165.
151. Han Y, Carcillo J, Ruppel R, Adelson P, Wisniewski S, Bell M, et al. Cerebrospinal fluid procalcitonin is increased after traumatic brain injury in children. *Crit Care Med* 1999; 27: A75.
152. Oberhoffer M, Russwurm S, Stonans I, Stonane E, Vogelsang H, Junker U, et al. Human peripheral blood mononuclear cells express mRNA for procalcitonin; modulation by lipopolysaccharides and sepsis related cytokines. *Crit Care (Lond)* 1998; 2: 035.
153. Balog A, Ocsosvzki I, Mandi Y. Flow cytometric análisis of procalcitonin expresión in human monocytes and granulocytes. *Immunol Lett* 2002; 84: 199-203.
154. Feyen JHM, Cardinaux F, Gamse R, Bruns C, Azria M, Trechsel U. N-terminal truncation of salmon calcitonin leads to calcitonin antagonists. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 8-13.
155. Cohen D, Thaw C, Varma A, Gershengorn M, Nussenzveig D. Human Calcitonin Receptor Exhibit Agonista-Independent (Constitutive) Signaling Activity. *Endocrinology*, 1997; 138: 1400-1405.
156. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, et al. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998; 393: 333-339.
157. Becker KL, Nylen ES, Cohen R, Snider RH. Calcitonin: structure, molecular biology, and actions. *Principles of Bone Biology* 1996; 1: 471-494.
158. Weglöner W, Struck J, Fisher-Schulz C, Morgenthaler NG, Otto A, Bohuon C et al. Isolation and chacterization of serum procalcitonin from patients with sepsis. *Peptides* 2001; 22: 2099-2103.
159. Wregner S, Kähne T, Bohuon C, Weglöhner W, Ansorge S, Reinhold D. Aminoterminal truncation of procalcitonin, a marker for systemic bacterial infections, by dipeptidylpeptidase IV. *FEBS* 2000; 466: 155-159.
160. Bergmann A, Bohuon C. Decrease of serum DPIV activity in severe sepsis patient: relationship to PCT. *Clinica Chimica Acta* 2002; 321: 123-126.

161. Muller B, Becker KL, Kranzlin M, Schachinger H, Huber PR, Nylen ES, et al. Disordered calcium homeostasis of sepsis: association with calcitonin precursors. *Eur J Clin Invest* 2000; 30(9): 823-831.
162. Guenther HL, Fleisch H. The procalcitonin amino-terminal cleavage peptide (N-proCT) lacks biological activity on normal clonal rat osteoblastic and preosteoblastic cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 1991; 49(2): 138-140.
163. Braithwaite S. Procalcitonin: new insights on regulation and origin. *Crit Care Med* 2000; 28(2): 586-588.
164. Sikora JP, Chlebna-Sokol D, Krzyzanska-Oberbek A. Proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8), cytokine inhibitors (IL-6sR, sTNFRII) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-13) in the pathogenesis of sepsis in newborns and infants. *Arch Immunol Ther Exp* 2001; 49(5): 399-404.
165. Monneret G, Pachot A, Laroche B, Picollet J, Bienvenu J. Procalcitonin and calcitonin gene-related peptide decrease LPS-induced tnf production by human circulating blood cells. *Cytokine* 2000; 12(6): 762-764.
166. Lacour AG, Gervaix A, Zamora SA, Vadas L, Lombard PR, Dayer JM, et al. Procalcitonin, IL-6, IL-8, IL-1 receptor antagonist and C-reactive protein as identifiers of serious bacterial infections in children with fever without localising signs. *Eur J Pediatr* 2001; 160(2): 95-100.
167. Hoffmann G, Czechowski M, Schloesser M, Schobersberger W. Procalcitonin amplifies inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in vascular smooth muscle cells. *Crit Care Med* 2002; 30(9): 2091-2095.
168. Marx SJ, Aurbach GD, Gavin JR, Buell DW. Calcitonin receptors on cultured human lymphocytes. *J Biol Chem* 1974; 249: 6812-6816.
169. Focé T, Bonventre JV, Flannery MR, Gorn AH, Yamin M, Goldring SR. A cloned porcine renal calcitonin receptor couples to adenylyl cyclase and phospholipase C. *Calcitonin Receptor Signal Transduction* 1992; 1: F1110-F1115.
170. Nylen S, Whang KT, Snider RH, Steinwald PM, White JC, Becker KL. Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis. *Crit Care Med* 1998; 26(6): 1001-1006.
171. Wagner KE, Martinez JM, Vath SD, Snider RH, Nylen ES, Becker KL, et al. Early immunoneutralization of calcitonin precursors attenuates the adverse physiologic response to sepsis in pigs. *Crit Care Med* 2002; 30(10): 2313-2321.
172. Redl H, Schiesser A, Togel E, Assicot M, Bohuon C. Possible role of TNF on procalcitonin release in a baboon model of sepsis. *Shock* 2001; 16(1): 25-27.
173. Whang KT, Vath SD, Becker KL, Snider RH, Nylen ES, Muller B, et al. Procalcitonin and proinflammatory cytokine interactions in sepsis. *Shock* 2000; 14(1): 73-78.
174. Steinwald S, Whang KT, Becker KL, Snider RH, Nylen ES, White JC. Elevated calcitonin precursor levels are related to mortality in an animal model of sepsis. *Crit Care (Lond)* 1999; 3(1): 11-16.
175. Monneret G, Arpin M, Venet F, Maghni K, Debard AL, Pachot A, et al. Calcitonin gene related peptide and N-procalcitonin modulate CD11b upregulation in lipopolysaccharide activated monocytes and neutrophils. *Intensive Care Med* 2003; 29(6): 923-928.

176. Jorgensen PF, Wang JE, Solberg R, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO. Procalcitonin does not influence the surface expression of inflammatory receptors on whole blood leukocytes. *Intensive Care Med* 2001; 27: 430-33
177. Kallio R, Surcel HM, Bloigu A, Syrjala H. C-reactive protein, procalcitonin and interleukin-8 in the primary diagnosis of infections in cancer patients. *Eur J Cancer* 2000; 36(7): 889-894.
178. Kabir K, Keller H, Grass G, Minor T, Stueber F, Schroeder S, et al. Cytokines and chemokines in serum and urine as early predictors to identify septic patients on intensive care unit. *Int J Mol Med* 2003; 12(4): 565-570.
179. van Langevelde P, Joop K, van Loon J, Frolich M, Groeneveld PH, Westendorp RG, et al. Endotoxin, cytokines, and procalcitonin in febrile patients admitted to the hospital: identification of subjects at high risk of mortality. *Clin Infect Dis* 2000; 31(6): 1343-1348.
180. Bell K, Wattie M, Byth K, Silvestrini R, Clark P, Stachowski E, et al. Procalcitonin: a marker of bacteremia in SIRS. *Anaesth Intensive Care* 2003; 31(6): 629-636.
181. Bossink AW, Groeneveld AB, Thijs LG. Prediction of microbial infection and mortality in medical patients with fever: plasma procalcitonin, neutrophilic elastase-alpha1-antitrypsin, and lactoferrin compared with clinical variables. *Clin Infect Dis* 1999; 29(2): 398-407.
182. Marquez M, Castillo JM, Tavares E, Leon C, Lesmes A, Miñano FJ. Plasma procalcitonin IL-6, IL-6rs, TNF, TNFsr as predictor of antimicrobial therapy in severe sepsis. *Intensive Care Med* 1999; 25: S76.
183. Carvalho PR, Trotta Ede A. Advances in sepsis diagnosis and treatment. *J Pediatr* 2003; 79 Spl 2: S195-S204.
184. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, et al. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(3): 396-402.
185. Ugarte H, Silva E, Mercan D, De Mendonca A, Vincent JL. Procalcitonin used as a marker of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med* 1999; 27(3): 498-504.
186. Pettila V, Hynninen M, Takkunen O, Kuusela P, Valtonen M. Predictive value of procalcitonin and interleukin 6 in critically ill patients with suspected sepsis. *Intensive Care Med* 2002; 28(9): 1220-1225.
187. Reiger J, Tatzber F, Ziervogel G, Köller U, Grimm G. Autoantibodies against oxidated low density lipoproteins (oLab) and procalcitonin (PCT) as prognostic markers for patients suffering from sepsis and systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Crit Care (Lond)* 1998; 2: 006.
188. Tesinsky P, Rusavy Z, Novak I, Sramek V. Procalcitonin, cytokines and C-reactive protein in systemic inflammatory response. *Crit Care (Lond)* 1998; 2: 036.
189. Brunkhorst FM, Forycki ZF, Wagner J. Procalcitonin immunoreactivity in severe human shock. *Intens Care Med* 1995; 21 Supl 1: 12.
190. Brunkhorst FM, Clark AL, Forycki ZF, Anker SD. Pyrexia, procalcitonin, immune activation and survival in cardiogenic shock: the potential importance of bacterial translocation. *Int J Cardiol* 1999; 72(1): 3-10.

191. Meisner M, Tschaikowsky K, Schmidt J, Schuttler J. Procalcitonin indications for a new diagnostic parameter of severe bacterial infection and sepsis in transplantation, immunosuppression and cardiac assist devices. *Cardiovasc Engineering* 1996; 1: 67-76.
192. Adamik B, Kubler-Kielb J, Golebiowska B, Gamian A, Kubler A. Effect of sepsis and cardiac surgery with cardiopulmonary bypass on plasma level of nitric oxide metabolites, neopterin, and procalcitonin: correlation with mortality and postoperative complications. *Intensive Care Med* 2000; 26(9): 1259-1267.
193. Reith HB, Mittelkotter U, Debus ES, Kussner C, Thiede A. Procalcitonin in early detection of postoperative complications. *Dig Surg* 1998; 15(3): 260-265.
194. Athhan F, Akagunduz B, Genel F, Bak M, Can D. Procalcitonin: a marker of neonatal sepsis. *J Trop Pediatr* 2002; 48(1): 10-14.
195. Guibourdenche J, Bedu A, Petzold L, Marchand M, Mariani-Kurdjian P, et al. Biochemical markers of neonatal sepsis: value of procalcitonin in the emergency setting. *Ann Clin Biochem* 2002; 39(Pt 2): 130-135.
196. Fernandez Lopez A, Luaces C, Valls C, Ortega J, Garcia JJ, et al. [Procalcitonin in the early diagnosis of invasive bacterial infection in febrile infants]. *An Esp Pediatr* 2001; 55(4): 321-328.
197. Bonac B, Derganc M, Wraber B, Hojker S. Interleukin-8 and procalcitonin in early diagnosis of early severe bacterial infection in critically ill neonates. *Pflugers Arch* 2000; 440 (5): R72-R74.
198. Kuse ER, Langefeld I, Jaeger K, Kulpmann WR. Procalcitonin in fever of unknown origin after liver transplantation: a variable to differentiate acute rejection from infection. *Crit Care Med* 2000; 28(2): 555-559.
199. Staehler M, Hammer C, Meiser B, Reichart B. Procalcitonin: a new marker for differential diagnosis of acute rejection and bacterial infection in heart transplantation. *Transplant Proc* 1997; 29(1-2): 584-585.
200. Kuse ER, Langefeld I, Jaeger K, Kulpmann WR. Procalcitonin a new diagnostic tool in complications following liver transplantation. *Intens Care Med* 2000; Supl 2: 187-192.
201. Hensel M, Volk T, Docke WD, Kern F, Tschirna D, Egerer K, et al. Hyperprocalcitonemia in patients with noninfectious SIRS and pulmonary dysfunction associated with cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 1998; 89(1): 93-104.
202. Meisner M, Hutzler A, Tschaikowsky K, Harig F, von der Emde J. Postoperative plasma concentration of procalcitonin and C-reactive protein in patients undergoing cardiac and thoracic surgery with and without cardiopulmonary bypass. *Cardiovasc Engineering* 1998; 3: 174-178.
203. Ammori BJ, Becker KL, Kite P, Snider RH, Nylen ES, White JC, et al. Calcitonin Precursors: Early markers of gut barrier dysfunction in patients with acute pancreatitis. *Pancreas* 2003; 27(3): 239-243.
204. Meisner M, Reinhart K. Is procalcitonin really a marker of sepsis? *Int J of Int Care* 2001; 8: 15-24.
205. Brunkhorst FM, Eberhard OK, Brunkhorst R. Early identification of biliary pancreatitis with procalcitonin. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(7): 1191-1192.



206. Marc E, Menager C, Moulin F, Stos B, Chalumeau M, Guerin S, et al. Procalcitonin and viral meningitis: reduction of unnecessary antibiotics by measurement during an outbreak. *Arch Pediatr* 2002; 9(4): 358-364.
207. Gendrel D, Raymond J, Coste J, Moulin F, Lorrot M, Guerin S, et al. Comparison of procalcitonin with C-reactive protein, interleukin 6 and interferon-alpha for differentiation of bacterial vs. viral infections. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18(10): 875-881.
208. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, Osborn JF, Signore F, et al. C-reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection. *Clin Chem* 2003; 49(1): 60-68.
209. Smith MD, Suputtamongkol Y, Chaowagul W, Assicot M, Bohuon C, Petitjean S, White NJ. Elevated serum procalcitonin levels in patients with melioidosis. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 641-645.
210. Carrol ED, Thomson AP, Hart CA. Procalcitonin as a marker of sepsis. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 20(1): 1-9.
211. Al Nawas B, Shah PM. Procalcitonin in patients with and without immunosuppression and sepsis. *Infection* 1996; 24(6): 434-436.
212. Gerard Y, Hober D, Assicot M, Alfandari S, Ajana F, Bourez JM, et al. Procalcitonin as a marker of bacterial sepsis in patients infected with HIV-1. *J Infect* 1997; 35(1): 41-46.
213. Becker KL, Gazdar AF, Carney Dn, Snider RH, Moore CF, Silva OL. Calcitonin secretion by continuous cultures of small cell carcinoma of the lung: Incidence and immunoheterogeneity studies. *Cancer Lett* 1983; 18: 179-185.
214. Jereb M, Muzlovic I, Hojker S, Strle F. Predictive value of serum and cerebrospinal fluid procalcitonin levels for the diagnosis of bacterial meningitis. *Infection* 2001; 29(4): 209-212.
215. Han Y, Carcillo J, Ruppel R et al. Cerebrospinal fluid procalcitonin and severe traumatic brain injury in children. *Crit Care Med* 2002; 3(1): 39-44.
216. Adermahr J, Greb A, Hensler A, Helling HJ, Bouillon B, Sauerland S, Rehm KE, Neugebauer E. Peumonia in multiple injured patients: a prospective controlled trial on early prediction using clinical and immunological parameters. *Inflamm Res* 2002; 51(5): 265-272.
217. Sauerland S, Hensler T, Bouillon B, Rixen D, Raum MR, Andermahr J et al. Plasma levels of procalcitonin and neopterin in multiple trauma patients with or without brain injury. *J Neurotrauma* 2003; 20: 953-960.
218. Shward WJ, Lutz EM, Harmar AJ. The expresion of the calcitonin receptor gene in the brain and pituitary gland of the rat. *Neurosci Lett*, 1994; 7; 181(1-2): 31-34.
219. Shankar PP, Wei H, Davee SM, Funk JL. Parathyroid hormone-related protein is expressed by transformed and fetal human astrocytes and inhibits cell proliferation. *Brain research* 2000; 868: 230-240.
220. FunkJL, Trout CR, Wei H, Stafford G, Reichlin S. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) induction in reactive astrocytes following brain injury: a possible mediator of CNS inflamation. *Brain Research* 2001; 915: 195-204

221. Duca E. Fever of unknown origin: infectious etiology and diagnosis principles. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2001; 105(3): 481-485.
222. Chirouze C, Schuhmacher H, Rabaud C, Gil H, Khayat N, Estavoyer JM et al. Low serum procalcitonin level accurately predicts the absence of bacteremia in adult patients with acute fever. *Clin Infect Dis* 2002; 35(2): 156-161.
223. Villanueva JL, Cervin RJ. Serum procalcitonin levels and empirical antibiotic treatment of patients with community-acquired febrile syndromes. *Clin Infect Dis* 2003; 36(6): 823-824.
224. Langevelde P, Joop K, Loon J, Frölich M, Groeneveld P, Westendorp R et al. Endotoxin, Cytokines, and Procalcitonin in febrile patients admitted to the hospital: identification of subjects at high Risk of mortality. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1341-1348.
225. Shin KC, Lee YJ, Kang SW, Baek HJ, Lee EB, Kim HA et al. Serum procalcitonin measurement for detection of intercurrent infection in febrile patients with SLE. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(10): 988-989.
226. Schuttrumpf S, Binder L, Hagemann T, Berkovic D, Trumper L, Binder C. Procalcitonin: a useful discriminator between febrile conditions of different origin in hemato-oncological patients? *Ann Hematol* 2003; 82(2): 98-103.
227. Barnes C, Ignjatovic V, Newall F, Carlin J, Ng F, Hamilton S, et al. Change in serum procalcitonin (delta PCT) predicts the clinical outcome of children admitted with febrile neutropenia. *Br J Haematol* 2002; 118(4): 1197-1198.
228. López-Valpueda FJ, Tavares E, Fernández-Alonso A, Sancibrián M, Miñano FJ. Procalcitonin: A new molecule involved in endotoxin-induced fever. *Abst. XI Int Congress of Pharmacology of Thermoregulation. Sevilla 1999.*
229. Paxinos G, Watson Ch. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2° ed. Australia: Acedemic Press; 1996.
230. Litton M. *Human Cytokine Protocols*. Eds. Debets/Savelkoul. USA: Humana Press; 1997.
231. Qu J, Zhang J, Pan J, He L, Ou Z, Zhang X, et al. Endotoxin tolerance inhibits lipopolysaccharide-initiated acute pulmonary inflammation and lung injury in rats by the mechanism of nuclear factor-kappaB. *Scand J Immunol* 2003; 58(6): 613-619.
232. Kluger MJ, Rudolph K, Suzynski D, Conn CA, Leon LR, Kozac W et al. Effect of heat stress on LPS-induced fever and tumor necrosis factor. *Am J Physiol Regular Integrative Comp Physiol* 1997; 273: R858-R863.
233. Maldonado R, Ojeda ML, Tavares E, Chbihi D, Fernández-Alonso A, Miñano FJ. Role of macrophage inflammatory protein-2 in a rat model of febrile neutropaenia. *J Physiol* 2003; 548P: 169.
234. Ojeda ML, Maldonado R, Tavares E, Chbihi D, Fernández-Alonso A, Miñano FJ. Kinetics of procalcitonin in neutropaenic rats after bacterial and viral fevers. *J Physiol* 2003; 548P: 168.
235. Romanovsky A, Kulchitsky V, Simons C, Sugimoto N. Methodology of fever research: why are polyphasic fevers often thought to be biphasic?. *Am J Physiol* 1998; 275: R332-R338.

236. Romanovsky A, Kulchitsky V, Akulich N, Koulchitsky S, Simons C, Sessler D et al. First and second phases of biphasic fever: two sequential stages of the sickness syndrome?. 1996; 271: R244-R253.
237. Romanovsky A, Simons C, Kulchitsky V. "Biphasic" fevers often consist of more than two phases. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1998; 275: R323-R331.
238. Romanovsky A, Blatteis C. Biphasic fever: what triggers the second temperature rise?. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1995; 269: R280-R286.
239. Morimoto A, Murakami N, Nakamori T, Watanabe T. Multiple control of fever production in the central nervous system of rabbits. *J Physiol* 1988; 397: 269-280.
240. Morimoto A, Murakami N, Nakamori T, Watanabe T. Evidence for separate mechanisms of induction of biphasic fever inside and outside the blood-brain barrier in rabbits. *J Physiol* 1987; 383: 629-637.
241. Morimoto A, Nakamori T, Watanabe T, Ono T, Murakami N. Pattern differences in experimental fevers induced by endotoxin, endogenous pyrogen, and prostaglandins. *Am J Physiol* 1988; 254: R633-R640.
242. Ivanov AI, Pero RS, Scheck AC, Romanovsky AA. Prostaglandin E (2)-synthesizing enzymes in fever: differential transcriptional regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283(5): R1104-R1117.
243. Scammell T, Elmquist J, Saper C. Inhibition of nitric oxide synthase produces hypothermia and depresses lipopolysaccharide fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1996; 275: R333-R338.
244. Melmed S. Series introduction: the immuno-neuroendocrine interface. *J Clin Invest* 2001; 108: 1563-1566.
245. Yang W, Krukoff T. Nitric oxide regulates body temperature, neuronal activation and interleukin-1 $\beta$  gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus in response to immune stress. *Neuropharmacology* 2000, 39: 2075-2089.
246. Lee S, Rivier C. Interactions between corticotropin-releasing factor and nitric oxide in mediating the response of the rat hypothalamus to immune, and non-immune stimuli. *Mol Brain Res* 1998; 57: 54-62.
247. Rivier C. Blockade of nitric oxide formation augments adrenocorticotropin released by blood-borne IL-1 $\beta$ : role of vasopressin, prostaglandins, and  $\alpha$ -1 adrenergic receptors. *Endocrinology* 1995; 136: 3597-3603.
248. Lindberg C, Eriksson C, van Dam A, Winblad B, Schultzberg M. Neuronal expression of caspase-1 immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Neuroimmunol* 2004; 146: 99-113.
249. Scammell T, Griffin J, Elmquist J, Saper C. Microinjection of a cyclooxygenase inhibitor into the anteroventral preoptic region attenuates LPS fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1998; 274: R783-R789.
250. Wiedermann FJ, Kaneider N, Egger P, Tiefenthaler W, Wiedermann CJ, Lindner KH, et al. Migration of human monocytes in response to procalcitonin. *Crit Care Med* 2002; 30(5): 1112-1117.

251. Reyes T, Walker J, DeCino C, Hogenesch J, Sawchwnko P. Categorically distinct acute stressors elicit dissimilar transcriptional profiles in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* 2003; 23(13): 5607-5616.
252. Wan W, Wetmore L, Sorensen CM, Greenberg AH, Nance DM. Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain. *Brain Res Bull* 1994; 34(1): 7-14.
253. Szekely M, Balasko M, Kulchitsky VA, Simons CT, Ivanov AI, Romanovsky AA. Multiple neural mechanisms of fever. *Auton Neurosci* 2000; 85(1-3): 78-82.
254. Dogan MD, Kulchitsky VA, Patel S, Petervari E, Szekely M, Romanovsky AA. Bilateral splanchnicotomy does not affect lipopolysaccharide-induced fever in rats. *Brain Res* 2003; 993(1-2): 227-229.
255. Manner CK, Nicholson B, MacLeod CL. CAT2 arginine transporter deficiency significantly reduces iNOS-mediated NO production in astrocytes. *J Neurochem* 2003; 85(2): 476-482.
256. Sola C, Casal C, Tusell JM, Serratosa J. Astrocytes enhance lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by microglial cells. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 1275-1283.
257. Murakami K, Nakamura Y, Yoneda Y. Potentiation by ATP of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in cultured astrocytes. *Neuroscience* 2003; 117(1): 37-42.

*\* Las citas bibliográficas se han hecho en base a los "Requisitos de uniformidad para manuscritos presentados para publicación en revistas biomédicas" Según el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas. Massachusetts, Medical Society, 1997.*

