



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTO DE LA RADIOTERAPIA HOLOCRAREAL EN LOS PATRONES DE SUEÑO Y SU
RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE MARCADORES INFLAMATORIOS EN UN MODELO
MURINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

PAOLA BALLESTEROS ZEBADÚA

DIRECTOR DE TESIS

**DR. CARLOS HERLINDO PAZ TRES
DEPARTAMENTO DE NEUROFISIOLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
“MANUEL VELASCO SUÁREZ”**

COMITÉ TUTOR

**DR. JESÚS GERARDO HERNÁNDEZ FALCÓN
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. FERNANDO ALEJANDRO BARRIOS ÁLVAREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

MÉXICO, D. F., FEBRERO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A ti Padre Poderoso en Todo,
por todo lo que me has dado
junto con el milagro de la vida.

A ti Cielo,
por ser el amor, el equilibrio y la esperanza en mi vida,
por tu paciencia y apoyo,
éste logro también es tuyo.
Gracias por todo.

«Mientras el cerebro sea un misterio, el universo continuará siendo un misterio»

Santiago Ramón y Cajal

AGRADECIMIENTOS

Al *Posgrado en Ciencias Biomédicas*, por los apoyos recibidos para completar mis estudios.

A todos los miembros de mi comité tutorial, en especial al *Dr. Paz* por abrirme las puertas de su laboratorio, confiar en mí y permitirme cumplir este sueño. A todos y cada uno de los integrantes del Laboratorio de Neurofisiología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS por su apoyo, en especial a *Carmen Rubio, Verónica Custodio, Edith González y Javier Franco*, sin su ayuda esto no hubiera sido posible. También a *Cristina Trejo* por su apoyo para la inmunohistoquímica. Al Dr. Jesús Hernández por motivarme y por todo su apoyo y disposición siempre.

A todos los miembros del Jurado por brindarme su tiempo y sus valiosos comentarios en la revisión de esta tesis:

Dra. Anahi Chavarría Krauser

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Dr. José Ramón Eguibar Cuenca

Dr. Miguel Angel Ávila Rodríguez

A José Manuel Lárraga Gutiérrez por impulsarme y darme el apoyo y la oportunidad de concretar este logro y por toda su ayuda para realizar la verificación de dosis. Al Dr. Miguel Angel Celis por su apoyo e impulso siempre para hacer investigación. Al Dr. Sergio Moreno Jiménez por apoyarme siempre y por su disposición al permitirme utilizar los recursos de la Unidad de Radioneurocirugía. A todo el personal de la Unidad de Radioneurocirugía (David Serret, Jesús Linares, Alejandra Ibarra, Héctor Vilchis, Jorge Valderrama, Samuel Olivares, etc) por su disposición, paciencia y apoyo, siempre que hubo que irradiar ratas. Al personal del Departamento de Neuroimagen en especial a Francisco Arzate “Paquito” por su apoyo y disposición siempre para realizar las tomografías computarizadas de ratas. Al técnico Agustín Ortuño y a Eduardo Robles por su apoyo en la construcción del dispositivo de fijación y en la construcción de cajas para el registro de las ratas.

INDICE

I. RESUMEN/ABSTRACT.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	4
III. MARCO TEÓRICO	
3.1 LA RADIACIÓN IONIZANTE.....	6
3.2 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA RADIACIÓN.....	10
3.3 EFECTOS DE LA RADIACIÓN IONIZANTE EN EL CEREBRO.....	12
3.4 SÍNDROME DE SOMNOLENCIA POR RADIACIÓN.....	16
3.5 SUEÑO	
3.5.1 Características electrofisiológicas del sueño.....	18
3.5.2 Mecanismos de regulación del ciclo sueño-vigilia.....	23
3.6 SISTEMA INMUNE Y SUEÑO.....	27
IV. JUSTIFICACIÓN.....	30
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
VI. HIPÓTESIS.....	32
VII. OBJETIVOS.....	33
VIII. VARIABLES.....	34
IX. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	
9.1 Modelo experimental y cirugía.....	35
9.2 Análisis dosimétrico.....	36
9.3 Irradiación.....	37
9.4 Análisis electrográfico de sueño.....	38
9.5 ELISA.....	41
9.6 Inmunohistoquímica.....	43
9.7 Análisis de Datos.....	44

X. RESULTADOS

10.1 DISEÑO DE LA TÉCNICA DE IRRADIACIÓN HOLOCRAREAL

10.1.1 Elaboración de un dispositivo de fijación.....	46
10.1.2 Diseño del plan de tratamiento.....	49
10.1.3 Corrección de artefactos metálicos.....	52
10.1.4 Dosimetría de campos pequeños.....	54
10.1.5 Verificación de Dosis	
10.1.5.1 Monte Carlo.....	56
10.1.5.2 Medidas con cámara de ionización.....	59
10.1.5.2 Medidas con película de tinte radiocrómico.....	60
10.2 RESPUESTA A LA IRRADIACIÓN HOLOCRAREAL	
10.2.1 Efectos de la radiación holocraneal en el ciclo sueño-vigilia.....	64
10.2.2 Efecto de la radiación holocraneal en la expresión de IL-1 β y TNF- α	
10.2.2.1 ELISA.....	71
10.2.2.2 Inmunohistoquímica.....	75

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

11.1 LA IRRADIACIÓN AUMENTA EL TIEMPO DE SUEÑO.....	78
11.2 LA IRRADIACIÓN AUMENTA LA EXPRESIÓN DE IL-1 β EN EL HIPOTÁLAMO.....	79
11.3 LA IRRADIACIÓN GENERA UNA RESPUESTA TARDÍA.....	84
11.4 LA IRRADIACIÓN INCREMENTA EL SUEÑO DURANTE LA FASE DE OBSCURIDAD.....	87
11.5 EFECTIVIDAD DE LA TÉCNICA DE IRRADIACIÓN HOLOCRAREAL EN RATAS.....	88
11.6 CONCLUSIONES.....	89
11.7 PERSPECTIVAS.....	90

XII. REFERENCIAS..... 92

XIII. ABREVIATURAS..... 98

XIV. ANEXOS

14. 1 PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

14.1.1 Radiation-Induced Neuroinflammation and Radiation Somnolence Syndrome.....	101
14.1.2 Principales neurotransmisores involucrados en la regulación del ciclo sueño-vigilia.....	114
14.1.3 Irradiation Design for an experimental murine model.....	124
14.1.4 Whole-brain irradiation increases NREM sleep and hypothalamic expression of IL-1 β in rats.....	129

14.2 OTROS TRABAJOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

14.2.1 Método de calificación automática para la evaluación de etapas de sueño en registros electrográficos de corteza en animales.....	136
14.2.2 Evaluación de somnolencia en pacientes tratados en la Unidad de Radioneurocirugía del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.....	141

I. RESUMEN

La aplicación terapéutica de la radiación ionizante está limitada por los efectos secundarios que ésta produce. Entre ellos se ha reportado la presencia de somnolencia severa tras la exposición a radioterapia a cráneo total también llamada holocraneal. Este efecto ha sido descrito cualitativamente como un efecto transitorio y se conoce poco acerca de su etiología. En pacientes tratados con radioterapia holocraneal es difícil discriminar si los efectos observados se deben a la enfermedad misma, a la localización de la lesión o el tumor, a los medicamentos o la radioterapia en sí. Por lo tanto, en este trabajo se diseñó un modelo de irradiación holocraneal en rata, utilizando un acelerador lineal dedicado para radioneurocirugía del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez, que permitió medir cambios en los patrones de sueño-vigilia después de la irradiación en tejido sano. Para cada rata se realizaron registros electrográficos y conductuales (de 24 h) antes y después de ser expuestas a irradiación a cráneo total con una dosis de 12 Gy. Las ratas se registraron a los 1, 30 y 60 días tras la irradiación. Se encontró que durante la fase de oscuridad, las ratas pasan más tiempo en la etapa de sueño de no-movimientos oculares rápidos (NMOR), 30 días después de ser irradiadas. Los resultados de esta tesis demuestran que en la rata la exposición a irradiación a cráneo total aumenta el tiempo de sueño después de varias semanas, similar a lo observado en pacientes tratados con radioterapia holocraneal. Por otro lado, se evaluó la expresión proteica de dos citocinas pro-inflamatorias: interleucina-1 β (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) en el tallo, corteza e hipotálamo cerebrales. Se encontró que, para el mismo intervalo en el que se observó el aumento en el sueño NMOR, también aumentó la expresión proteica de la citocina pro-inflamatoria IL-1 β en el hipotálamo. Adicionalmente se observó mediante inmunohistoquímica un aumento en la expresión de IL-1 β en la región preóptica media

del hipotálamo anterior. Ésta citocina ha demostrado participar en la generación del sueño NMOR actuando en ésta región. Los resultados de esta tesis muestran que la radiación produce un aumento de IL-1 β en el hipotálamo después de 30 días y sugieren que este aumento puede estar relacionado con el incremento encontrado en el sueño. Así mismo los resultados de esta tesis muestran que se cuenta con un modelo de irradiación craneal en rata útil para la evaluación de los efectos de la radiación ionizante.

ABSTRACT

The therapeutic application of ionizing radiation is limited by the secondary effects it may produce. Among them, severe somnolence has been reported in patients after exposure to whole brain radiotherapy. This effect has been widely described qualitatively as a transitory effect, although little is known about its etiology. In patients, it is difficult to discriminate if the observed effects are due to sickness, lesion or tumor location, adjuvant medication or whole brain radiotherapy itself. Therefore, we used a rat model to quantify the effects of irradiation of healthy brain tissue on both sleep-wake patterns and the expression of the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), which is known to induce sleep. We designed an irradiation method using a dedicated linear accelerator in order to perform brain irradiation in rats. Different groups were examined at three time points after irradiation (1 day, 30 days and 60 days). Electrographic and behavioral recordings were performed on each rat before and after total cranial irradiation (with a dose of 12 Gy). IL-1 β and TNF- α protein levels in several brain regions were assessed by enzyme-linked immunosorbent assays, and site-specific immunoreactivity was observed by immunofluorescence.

We found that both non-rapid eye movements sleep and IL-1 β protein expression in the hypothalamus increased 30 days after irradiation. Whole brain irradiation increases sleep in our rat model, and this finding is similar to qualitative reports from patients. Because IL-1 β has been proposed as a sleep-promoting molecule, we propose that the electrographic results may be attributable, at least in part, to the delayed overexpression of IL-1 β in the hypothalamus.

II. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, se calcula que durante el 2012 se dieron 256,213 nuevos casos cáncer en el sistema nervioso central (Ferlay,2013). Hoy en día la radioterapia es una de las principales opciones empleadas para el tratamiento de tumores y metástasis cerebrales. Sin embargo, desde los inicios de la aplicación de la radiación ionizante en tratamientos craneales, se han observado diversos efectos secundarios. Uno de estos efectos reportados es la somnolencia diurna severa, la cual se ha descrito como un efecto transitorio principalmente tras la exposición de todo el cráneo a la radiación ionizante. Este tipo de exposición, comúnmente conocida como radioterapia holocraneal, se asocia con un síndrome, más frecuentemente reportado en niños, caracterizado por somnolencia, anorexia, apatía e incluso dolores de cabeza, que se presenta varias semanas tras la radioterapia holocraneal (Freeman et al.,1973), (Garwicz et al.,1975),(Littman et al.,1984). Este síndrome ha sido denominado como Síndrome de Somnolencia por Radiación (SSR) y existen escalas propuestas en base a cuestionarios para determinar el grado de severidad del síndrome (Freeman et al.,1973). Se considera que en el grado más severo de este síndrome los pacientes pasan entre 10 y 20 horas al día dormidos y que sufren además de inactividad, fiebre de baja intensidad y anorexia (Freeman et al.,1973).

Aunque actualmente este síndrome es reconocido como un efecto transitorio y tardío frecuente (incidencia promedio 56%) tras la radioterapia holocraneal (Tofilon et al.,2000; Ballesteros-Zebadua et al.,2012), sin embargo se sabe poco de su etiología. La mayor parte de los trabajos sobre el SSR están basados en cuestionarios y solo existe un reporte que incluye evaluación electroencefalográfica de pacientes con probable SSR (Garwicz et al.,1975). Sin embargo dicho reporte presenta algunos resultados controversiales ya que ciertos pacientes presentaban alteraciones en su registro

electroencefalográfico incluso antes de recibir la radioterapia holocraneal (Garwicz et al.,1975). En pacientes resulta difícil discriminar si los cambios observados en su patrón electrográfico y de sueño están asociados a su enfermedad, a la localización del tumor o lesión a tratar, a los medicamentos adyuvantes o a la radioterapia en sí. Por ello en este estudio se decidió medir de manera cuantitativa en ratas los cambios generados en los patrones de sueño tras la radiación holocraneal del tejido cerebral sano. Para ello se diseñó un modelo de irradiación holocraneal en rata y se decidió comparar registros electrográficos antes y después de la irradiación holocraneal. Adicionalmente, se ha observado una respuesta inflamatoria después de la irradiación holocraneal. Por ello se decidió medir, antes y después de la irradiación, la presencia de dos citocinas pro-inflamatorias, la interleucina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), que a su vez han sido ampliamente descritas como moléculas promotoras de sueño (Ballesteros-Zebadua et al.,2012).

III. MARCO TEÓRICO

3.1 LA RADIACIÓN IONIZANTE (Hall,2000; Bohm,2010)

En el sentido más amplio de la palabra, se le llama radiación a la energía que se transfiere, tanto en forma de partículas como en forma de ondas electromagnéticas. Dicha energía transita hasta interactuar con los objetos en los que incide. Ejemplos muy comunes de la radiación en forma de partículas subatómicas en movimiento son la radiación con partículas alpha (o núcleos de Helio – ^4He), radiación beta (que consiste en electrones o positrones) y la radiación con neutrones.

Además de las partículas existe la radiación en forma de radiación electromagnética (fotones). Las ondas electromagnéticas consisten en campos magnéticos y eléctricos oscilantes que se propagan a la velocidad de luz, cuya energía puede variar dentro de un rango, conocido como espectro electromagnético, que incluye desde las ondas de radio, las microondas, la luz visible y la radiación ultravioleta, hasta la radiación de mayor energía, como los rayos X, empleados en radiodiagnóstico y radioterapia, y los rayos γ emitidos principalmente por átomos de materiales radioactivos también empleados en radiodiagnóstico y radioterapia. Los rayos X, que habitualmente se producen desacelerando electrones mediante la interacción eléctrica con algún núcleo, lo cual da lugar a la llamada radiación de frenado o “Bremsstrahlung” (del alemán bremsen "frenar" y Strahlung "radiación") o bien da lugar a los llamados rayos X característicos debido al cambio en los niveles energéticos orbitales. Este es el principio que se aplica para generar la radiación emitida por un acelerador lineal empleado en la radioterapia. Los rayos X, al igual que los rayos gamma, pueden considerarse como radiación ionizante, ya que su energía es suficiente para liberar electrones del medio con el que interactúa. El número de iones que se producen a lo largo de la trayectoria del haz de radiación depende de la energía por unidad de longitud

que se deposita a lo largo de dicha trayectoria. En radiobiología, el depósito de energía por unidad de longitud que genera la radiación ionizante se describe como Transferencia Lineal de Energía o LET (Linear Energy Transfer), normalmente expresada en unidades de keV/ μm . La radiación con electrones, por ejemplo, posee una menor LET y por lo tanto una menor habilidad para ionizar a lo largo de una trayectoria que las partículas alfa. Las partículas alfa suelen depositar su energía en trayectorias rectas, a diferencia de los rayos X, que producen iones de manera dispersa e indirecta. En otras palabras, para los rayos X, el depósito de energía se realiza a través de los electrones secundarios que se liberan de la interacción de los rayos X con los átomos.

La energía de los rayos X comúnmente empleados en radioterapia cubre un rango aproximado entre 20 keV y 20MeV. El electrón-volt (eV) la una unidad de energía comúnmente empleada, donde $1 \text{ eV} = 1.6021 \times 10^{-19}$ Joules. En radioterapia, el depósito de energía por unidad de masa en los tejidos se define como Dosis Absorbida y su unidad de medición es el Grey $1\text{Gy} = 1 \text{ Joule/kg}$.

A diferencia de las partículas cargadas, los fotones son eléctricamente neutros, por lo que, conforme penetran en la materia, pueden viajar determinada distancia antes de interactuar con un átomo. Qué tan lejos puedan viajar estará determinado por la probabilidad de interacción en cada medio, es decir, del coeficiente de atenuación. Cuando un fotón de radiación ionizante interactúa con la materia, éste puede ser absorbido, desintegrarse o ser dispersado, cambiando su dirección original, con o sin pérdida de energía. A continuación se enlistan las tres principales interacciones que sufre la radiación en forma de fotones con la materia.

Radiación Ionizante			
Tipo de Radiación	Nombre	Mecanismos de Generación	Ejemplos de penetración (rango) promedio en agua
Electromagnética	X (rayos X)	Tubo de Rayos X Acelerador lineal	4MeV - D ₅₀ = 139mm 6MeV - D ₅₀ = 156mm
	γ (gamma)	Decaimiento radioactivo	⁶⁰ Co - D ₅₀ 110 mm
Partículas	α (alfa)	Decaimiento radioactivo	²²⁸ Ra - 0.033mm
	β (beta)	Decaimiento radioactivo	⁹⁰ Sr - 1.8 mm
	e (electrones)	Tubo de Rayos X, Acelerador lineal	3MeV - 15 mm
	p (protones)	Ciclotrón, sincrotrón	3MeV - 0.072mm 150MeV - 156 mm
	Iones pesados	Ciclotrón, sincrotrón	¹² C- 260 MeV- 140mm
	n (neutrones)	ciclotrón, sincrotrón Activación neutrónica secundaria,	500-2000mm

Tabla 1. Tipos de radiación ionizante. Cada tipo de radiación puede darse en diversas energías. Dado que la penetración en los tejidos depende directamente de la energía, para ejemplificar en esta tabla se muestra el rango promedio en agua (penetración en mm) para el caso de partículas y para el caso de fotones se muestra la profundidad en agua (mm) a la cual la dosis disminuye en un 50% (D₅₀). (Información extraída de (Khan,1994; Grossweiner,2001; Radiological71,2008; Wilkens et al.,2008; Buzdar et al.,2009; Beyzadeoglu,2010)

Efecto fotoeléctrico

El efecto fotoeléctrico es el efecto más relevante para las energías correspondientes a las imágenes de radiodiagnóstico empleando Rayos X. En este tipo de interacción, un fotón interactúa con un electrón en una órbita interna del átomo y transfiere toda su energía a dicho electrón de manera que éste sale del átomo. El átomo queda con carga neta positiva e inmediatamente un electrón de una de las capas más externas del átomo llena el hueco que dejó la interacción. Cuando estos electrones llenan los huecos, cayendo a las capas más internas del átomo, se producen a su vez fotones característicos, cuya energía corresponde a la diferencia de energía entre los niveles de energía de los orbitales entre los que salta el electrón. La probabilidad de que la radiación incidente sufra una interacción de tipo fotoeléctrico aumenta con la energía del fotón incidente y el número atómico del material. En general, a mayor energía del fotón menor es la probabilidad de que el efecto fotoeléctrico se lleve a cabo.

Efecto Compton

La radiación ionizante que incide sobre los pacientes en los tratamientos de radiocirugía sufre principalmente éste tipo de interacción conocida como dispersión Compton, en la cual fotones de relativamente alta energía interactúan con electrones libres de las capas más externas del átomo. Una fracción de la energía incidente extrae al electrón de su órbita, dejando un ion cargado positivamente. La fracción de energía restante surge en forma de un nuevo fotón de menor energía y de dirección distinta a la original. La desviación que sufren los fotones, tanto en el paciente como en los diferentes materiales con los que interactúa en la unidad de tratamiento, debido al efecto Compton, es también relevante tanto en el diseño de blindajes, como para la protección radiológica.

Producción de Pares

Es un efecto que cobra relevancia únicamente para fotones de energías superiores a los 10MeV, que pueden ser empleadas en radioterapia. En esta interacción los fotones incidentes interactúan con el campo eléctrico del núcleo atómico con el que inciden. Como producto de dicha interacción, se crea materia en forma de un par de partículas cargadas: un electrón y un positrón (electrón con carga positiva). Al igual que en el efecto fotoeléctrico, en la producción de pares, el fotón desaparece por completo y se crean dos nuevas partículas que depositarán su energía a través de colisiones con otros electrones. Para el caso particular del positrón, cuando éste alcanza el reposo se combina con un electrón cercano y ambas partículas son aniquiladas, generando dos fotones de 511 KeV que viajan en direcciones opuestas. Dichos fotones, a su vez, pueden interactuar principalmente a través de dispersión Compton.

3.2 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA RADIACIÓN (Hall,2000)

Los efectos biológicos de la radiación ocurren cuando la radiación ionizante interactúa con los átomos de la materia viva depositando energía ionizándola es decir generando partículas cargadas (electrones libres y iones positivos) que a su vez pueden desencadenar una serie de efectos biológicos. El átomo o molécula que resulta excitado o ionizado puede fragmentarse produciendo radicales libres o regresar a su estado basal. Los radicales libres generados a su vez pueden interactuar con las moléculas circundantes y producir radicales secundarios, iniciando así una reacción en cadena.

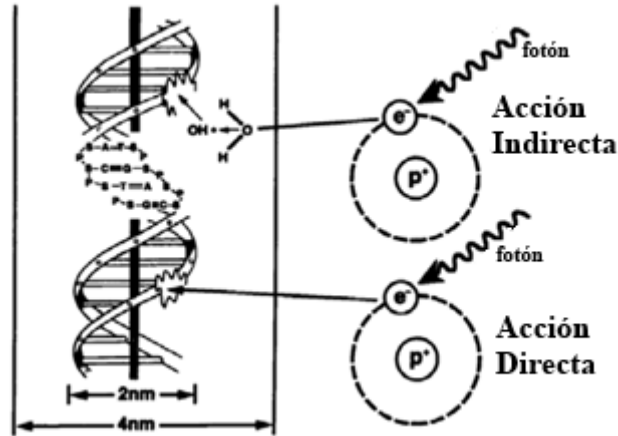


Figura 1. La ilustración muestra las acciones directa e indirecta de la radiación ionizante. Se muestra la estructura del ADN de manera esquemática. En la acción directa un electrón secundario resultante de la absorción de un fotón de rayos X interactúa con el ADN generando un efecto. En la acción indirecta un electrón secundario interactúa por ejemplo con una molécula de agua para producir un radical OH^\cdot el cual produce daño en el ADN (Modificado de Hall, 2000).

Los efectos biológicos de la radiación se clasifican en dos tipos: directos e indirectos (Fig. 1). Cuando la energía de la radiación es depositada en el ácido desoxirribonucleico (ADN) se dice que se produce un daño directo (Fig. 1). Alternativamente la radiación puede interactuar primero con otras moléculas principalmente con agua, ya que es la molécula más abundante en la célula (80%) (Fig. 1). La llamada radiólisis del agua genera radicales libres altamente reactivos incluyendo el radical hidroxilo (OH^\cdot) entre otros. Estos radicales a su vez pueden generar otros (como el peróxido de hidrógeno $-\text{H}_2\text{O}_2$) que pueden resultar tóxicos. Los radicales generados en el agua pueden a su vez generar el llamado daño indirecto en el ADN aunque también pueden dañar otras estructuras como lípidos, membranas o proteínas. Se estima que 2/3 del daño al ADN en células de mamífero es causado por el radical hidroxilo.

El daño provocado por la radiación ionizante induce una serie de eventos moleculares y bioquímicos que pueden reparar el daño o culminar en cambios fisiológicos permanentes o en muerte celular. Existen mecanismos antioxidantes en las

células que pueden contrarrestar los radicales libres. De igual manera existen mecanismos de reparación del ADN, sin embargo no siempre el daño puede ser reparado o no es reparado correctamente. Cuando esto ocurre, en especial las llamadas rupturas de doble cadena del ADN donde ambas hebras son fraccionadas y es difícil de reparar, se desencadena la muerte celular (apoptosis), la pérdida de la capacidad proliferativa o incluso llevar a mutaciones. Para fotones en el intervalo de energía empleado en radioterapia el tipo de daño más frecuente del ADN es el de una sola cadena el cual puede ser reparado con más facilidad en algunos casos.

Se sabe que las células que se encuentran en mitosis (durante la síntesis del ADN) son más sensibles a sufrir daño en el ADN por la radiación ionizante dado que las rupturas de doble cadena de ADN son más probables cuando la cromatina está condensada. Desde 1906 Bergonie y Tribondeau encontraron una relación entre la radiosensibilidad y el tipo de órgano irradiado. Se sabe que la radiosensibilidad varía de acuerdo con la tasa de proliferación celular y el nivel de diferenciación celular. Así pues se sabe que entre más inmadura es el tipo celular y entre más alta es su tasa de proliferación o su tasa metabólica mayor es la radiosensibilidad del tejido.

3.3 EFECTOS DE LA RADIACIÓN IONIZANTE EN EL CEREBRO

El sistema nervioso se encuentra anatómicamente dividido en sistema nervioso central (SNC) que consiste en el encéfalo y la médula espinal y sistema nervioso periférico, la cual es una colección de pares craneales y nervios periféricos que están fuera del ambiente protegido que ofrecen el cráneo y los huesos vertebrales (Bear et al., 2001).

En condiciones normales, los tipos celulares que pueden encontrarse en el parénquima cerebral se limitan a dos clases principales: las neuronas y las células gliales. Existen diversas clasificaciones de neuronas, pero todas son de origen

neuroectodérmico y comparten la característica radiobiológica que dejan de proliferar poco tiempo después de su nacimiento. La glía puede dividirse en dos clases principales de células: la microglía (de origen mesodérmico) y la macroglía (de origen ectodérmico e incluye a los astrocitos y los oligodendrocitos) (Cuadros et al.,1998; Bear et al.,2001). Aún en su estado de madurez, estas células pueden conservar su habilidad de regresar a un estado mitótico. Los astrocitos proveen de un escudo protector a las neuronas y son las principales células involucradas en la reparación de tejido y la cicatrización (Bear et al.,2001). Los oligodendrocitos son las células gliales involucradas en la formación y mantenimiento del recubrimiento de mielina (Bear et al.,2001). La mielina a su vez es responsable de la propagación rápida y eficiente de los impulsos nerviosos. La integridad de la mielina depende de los oligodendrocitos y la pérdida de éstos puede llevar a la desmielinización de los axones (van der Kogel,1986). La microglia actúa como macrófago en caso de daño o lesión en el SNC. También puede actuar como célula presentadora de antígeno en caso de que se presente algún agente infeccioso (Bear et al.,2001). Además de estas células en el cerebro también pueden encontrarse células pluripotenciales también llamadas células madre (stem cells). Estas células se caracterizan por su capacidad de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos mediante lo que se conoce como neurogénesis. Este proceso se da principalmente en ciertas regiones cerebrales (zona subgranular el giro dentado del hipocampo y zona subventricular de los ventrículos laterales) y permite la reparación de poblaciones celulares dañadas (van der Kogel,1986; Bear et al.,2001). En el cerebro también se encuentran las células del endotelio vascular que se encargan de formar la barrera hematoencefálica la cual limita efectivamente el paso de moléculas hidrofílicas, iones y gran número de proteínas desde el torrente sanguíneo al parénquima cerebral (Bear et al.,2001).

La radiación ionizante ha mostrado tener múltiples efectos en el tejido nervioso tanto in vivo como in vitro. Aunque el efecto mayormente reportado es el daño mediante la ruptura de la cadena de ADN actualmente se reconoce que la respuesta a la radiación es un proceso continuo y dinámico, en el que la muerte celular no es la única forma de daño tras la radiación. Existen además componentes de daño secundario y muerte celular que están relacionadas con alteraciones microambientales como la inflamación.

Estos efectos dañinos de la radiación se dividen de acuerdo con el tiempo en el que se expresan clínicamente en agudos, retardados tempranos y retardados tardíos (Tofilon et al.,2000). Los efectos agudos se presentan a los pocos días y semanas tras la irradiación y son muy raros a las dosis terapéuticas empleadas actualmente en radioterapia (v.g. 30 Gy en 10 fracciones (Murray et al.,1997)). Los efectos retardados tempranos, ocurren a mediano plazo entre 1 y 6 meses tras la irradiación y pueden incluir desmielinización temporal y somnolencia (Tofilon et al.,2000). Aunque ambos efectos pueden ser severos, normalmente son reversibles. Por el contrario, los efectos retardados tardíos, caracterizados por anomalías vasculares detectadas histopatológicamente, desmielinización y necrosis de la materia blanca, normalmente se observan después de los seis meses tras la irradiación; estos efectos son progresivos e irreversibles aunque también son poco frecuentes en los esquemas empleado para radioterapia (Schultheiss et al.,1992b; Tofilon et al.,2000; McTyre et al.,2013). Además de estos efectos actualmente existe amplia evidencia de la presencia de déficit cognitivo después de los seis meses en pacientes que recibieron radiación holocraneal pese a que no presentan anomalías anatómicas detectables. La pérdida de la neurogénesis hipocampal se ha asociado con el déficit cognitivo inducido por radiación, sin embargo

también se ha encontrado déficit cognitivo en ratas de mayor edad las cuales no parecen presentar cambios en la neurogénesis hipocampal (Greene-Schloesser et al.,2012a).

Las dosis de radiación empleadas en radioterapia han mostrado experimentalmente provocar cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al menos temporalmente y generar diversos componentes inflamatorios cerebral que a su vez pueden dañar la neurogénesis *in vivo* y limitan la reparación a largo plazo. También diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han reportado aumentos en la expresión de marcadores de inflamación como la IL-1 β , TNF- α , IL-6 (interleucina-6) así como moléculas de adhesión como ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular -1) y VCAM-1(molécula de citoadhesión vascular-1)(Gaber et al.,2003; Hwang et al.,2006; Lee et al.,2010a; Lee et al.,2010b).

La neuroinflamación ya sea por radiación o por algún otra causa, es un proceso que involucra la participación de diversas células del sistema inmune y el sistema nervioso así como citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión (Mrak et al.,2004).

El factor de necrosis tumoral alfa o TNF- α es una citocina inducible multifuncional producida por macrófagos, astrocitos y microglía (Lyman et al.,2013). Por un lado induce la proliferación de astrocitos pero puede ser citotóxica para los oligodendrocitos (Chiang et al.,1991; Li et al.,1996). El TNF- α también puede dañar células del endotelio vascular y estimular la gliosis. Por otro lado también tiene efectos neuroprotectores y se encarga de mediar mecanismos antioxidantes e inducir proteínas anti-apoptóticas (v.g. proteína 2 del linfoma de células B: Bcl-2) (Daigle et al.,2001; Nieder et al.,2007).

Estudios *in vivo*, han mostrado que los niveles de ARNm de TNF- α se encuentran elevados tras la irradiación holocraneal en la corteza pero regresan a sus niveles basales en 24 horas (Kyrkanides et al.,1999). Otros estudios han reportado que los niveles de TNF- α tras la irradiación son 57% más altos en la corteza que en el hipocampo (Lee et

al.,2010b). A largo plazo, se encontró una elevación en el ARNm de TNF- α en todo el cerebro a los 2 meses tras la irradiación y la elevación se mantuvo por 6 meses (Chiang et al.,1997).

La IL-1 β es una citocina pro-inflamatoria principalmente producida por astrocitos microglia y macrófagos activados. Esta citocina es capaz de inducir la transcripción y traducción de ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2) y la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) además de contribuir a la traducción de prostaglandina -E2 (PGE2), factor activador de plaquetas y óxido nítrico (NO) (Dinarello,2009). Otra de sus propiedades es la capacidad de incrementar la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-I y VCAM-1 (Dinarello,2009). Experimentos *in vivo* han demostrado que la irradiación aumenta la expresión del ARNm de la IL-1 β a las 4, 8 y 24 horas tras la irradiación (Lee et al.,2010b). Los niveles de IL-1 β se han encontrado 126% más altos en el hipocampo que en la corteza tras la irradiación, lo que indica que la expresión de IL-1 β no se da de manera uniforme en todo el cerebro (Lee et al.,2010b). No se han encontrado cambios en la expresión de IL-1 β en el cerebro a largo plazo tras la irradiación (Chiang et al.,1997).

Más detalles de la respuesta inflamatoria tras la radiación se pueden ver en Ballesteros-Zebadua et al. 2012 en la sección de ANEXOS 14.1.1.

3.4 SÍNDROME DE SOMNOLENCIA POR RADIACIÓN

La llamada radioterapia a cráneo total u holocraneal es una modalidad de radioterapia en la que se irradia todo el cráneo del paciente. Este tipo de terapia se emplea en la actualidad principalmente en pacientes con metástasis cerebrales (de cualquier tumor primario) y como tratamiento profiláctico en pacientes con leucemia linfocítica aguda o linfoma no Hodgkin (Rades et al.,2008).

El síndrome de somnolencia ha sido definido como exceso de somnolencia y/o sueño, pero puede incluir letargo, fiebre y anorexia y se ha observado principalmente tras la irradiación holocraneal. Este síndrome fue reconocido por primera vez en niños que antiguamente eran tratados con radioterapia holocraneal para la tiña del cuero cabelludo (infección micótica) y posteriormente se observó en niños con leucemia que recibieron irradiación holocraneal profiláctica (Druckman,1929; Freeman et al.,1973; Littman et al.,1984). Se describió como un estado de somnolencia, letargo anorexia y dolores de cabeza de 6 a 8 semana tras la irradiación y que ocurría en ausencia de anomalías intracraneales, considerados como parte de la toxicidad tardía de la irradiación. El síndrome de somnolencia también ha sido reportado en adultos tras la radioterapia de tumores cerebrales. Empleando una escala visual análoga, se estudiaron 19 pacientes tras la irradiación craneal y todos mostraron cierto grado de somnolencia y cansancio (Faithfull et al.,1998). De los 19 pacientes, 16 desarrollaron el síndrome de somnolencia (Faithfull et al.,1998). Todos los pacientes que presentaron somnolencia presentaron un patrón cíclico y desarrollaron los síntomas en la segunda semana tras completar el tratamiento empeorando en los días 11 al 21, y en los días 31 al 35 tras la radioterapia. Los principales síntomas fueron sueño, torpeza, inhabilidad para concentrarse, letargo, lentitud mental y fatiga. Los pacientes con tratamientos de hipofraccionamiento presentaron comparativamente mayor adormecimiento y fatiga. Se ha sugerido con anterioridad que este síndrome está relacionado con una desmielinización transitoria como se ha observado en la médula espinal, aún no se entienden con claridad los mecanismos asociados. De igual forma se sabe poco sobre cómo aliviar estos síntomas de somnolencia. Se ha sugerido que el uso de corticoesteroides puede reducir los síntomas (Uzal et al.,1998), aunque el beneficio real aún es incierto. En la actualidad se conoce poco acerca de estos efectos de la radiación

en el sueño y se desconocen los mecanismos celulares que pudieran estar involucrados. Ya que en los pacientes existen un sin número de variables difíciles de controlar para evaluar los trastornos de sueño debidos a la radioterapia (ver Anexo 14.2.2), este proyecto propone evaluar si existen dichos trastornos en un modelo murino, teniendo a su vez un mayor control de variables involucradas, para poder así mismo buscar los mecanismos que pudieran relacionar la radiación y sus efectos en el sueño.

3.5 SUEÑO

3.5.1 Características electrofisiológicas del sueño.

Nuestro concepto de la naturaleza esencial del sueño ha evolucionado ampliamente en los últimos 60 años de un concepto erróneo que considera el sueño como un simple estado de inactividad que ocurre pasivamente cuando los órganos se fatigan y deben reposar, a una visión del sueño como un estado funcional complejo que constituye cuantitativa y cualitativamente un estado diferente a la vigilia el cual es iniciado y mantenido por determinados mecanismos. Pese a los recientes avances en el tema cabe resaltar que existen muchas preguntas sobre la naturaleza del sueño que aún están por resolverse. Generalmente en un inicio se define el sueño de acuerdo con los siguientes criterios de conducta: 1. Movimiento limitado 2. Postura estereotípica 3. Respuesta reducida a los estímulos 4. Reversibilidad (Nicolau et al.,2000).

Las posibles funciones del sueño que se han sugerido incluyen la reparación y recuperación de las funciones cognitivas; la conservación de la energía de los seres vivos, consolidación de los procesos de memoria, crecimiento cerebral y regulación de las emociones y la conducta, entre otras (Mignot,2008). Sin embargo ninguna de estas asociaciones ha sido suficiente y la función del sueño continúa siendo un enigma lleno de ambigüedades. Sin embargo, es bien sabido que las alteraciones en el ciclo sueño

vigilia pueden afectar considerablemente la habilidad de un individuo para funcionar adecuadamente durante el día, incluso la privación del sueño puede conducir hasta la muerte (Rechtschaffen et al.,1995). Existen diversos trastornos del sueño de severidad variable siendo los más comunes el insomnio, la somnolencia o necesidad de dormir durante el día y las conductas irregulares durante el sueño (Mahowald et al.,2005). El llamado síndrome de somnolencia diurna o EDS suele ser resultado de la privación del sueño o puede estar asociada con narcolepsia, apnea del sueño u otros padecimientos asociados (Johns,1991).

Tradicionalmente tres mediciones primarias se han empleado para caracterizar al sueño fisiológico y las diferentes etapas o fases del mismo. Estas son:

1. El electroencefalograma (EEG): Descubierta en 1929 por Hans Berger, psiquiatra suizo, quien encontró que pequeños cambios en el voltaje entre dos electrodos ocurría cuando se colocaban en contacto con el cuero cabelludo. Para poder medir dichos cambios de voltaje fue necesario amplificar y examinar las variaciones y duración de dichos cambios expresados en frecuencia (Hz) y amplitud (mV). Se relacionan dichos cambios con los cambios de voltaje a nivel membranal de las células nerviosas.
2. El electroculograma. (EOG): Registra movimientos oculares y dado que la retina es negativa respecto a la córnea, un electrodo colocado en la piel cerca del ojo registra los cambios en el voltaje conforme el ojo realiza movimientos de rotación.
3. El electromiograma (EMG): es el registro de la actividad eléctrica generada por músculos activos. Se puede registrar mediante electrodos en la superficie de la piel que cubre al músculo. En los humanos se registra típicamente bajo la

barbilla ya que dicha área presenta cambios drásticos asociados con las fases del sueño.

Otros parámetros que pueden registrarse son la frecuencia cardíaca y respiratoria así como la presencia de actividad en regiones específicas del cerebro, como las ondas ponto-geniculo-occipitales (PGO). A partir de los datos del EEG se puede obtener un análisis del espectro de frecuencia. Este análisis utiliza la transformada de Fourier para convertir los datos del EEG y clasificarlos en 4 bandas de frecuencia: Ritmo delta - δ (0.5-3.9 Hz), Ritmo theta - θ (4-7.9 Hz), Ritmo alfa - α (8-12.9 Hz), Ritmo beta - β (13-30 Hz), Ritmo gamma - γ (>30 Hz)(Bear et al.,2001; Hughes,2008).

Los mamíferos a diferencia del resto de los animales presentan dos tipos de sueño bien desarrollados con excepción de especies muy primitivas como el equidna. El fenómeno del sueño en los mamíferos ha sido subdividido en las siguientes fases: sueño de no movimientos oculares rápidos (NMOR) y sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) (Jouvet,1967a). Cabe mencionar que la investigación básica del sueño se ha llevado a cabo principalmente en modelos animales en ratas y gatos. En todos los mamíferos tanto el NMOR como el MOR presentan patrones conductuales, electrofisiológicos y bioquímicos bien definidos (Corsi,1990).

Durante el sueño de no movimientos oculares rápidos o NMOR la actividad cerebral está constituida por ondas de gran amplitud (150-250 μ V) y baja frecuencia (ritmo δ) (Fig. 2) disminuyendo la actividad muscular; mientras que el MOR se caracteriza por tener un EEG de ondas rápidas (ritmo θ) y bajo voltaje (50-150 μ V) (Fig. 2) presentándose además atonía muscular (Corsi,1990). En la vigilia por el contrario, los animales presentan conductas típicas de su especie así como una actividad electrográfica de bajo voltaje (30-50 μ V) y altas frecuencias (principalmente ritmos α,β) (Fig. 2) junto con un elevado tono muscular (Corsi,1990).

Otros parámetros electrofisiológicos que se presentan durante el ciclo sueño vigilia incluyen los movimientos oculares registrados por el EOG, los cuales disminuyen en frecuencia durante el NMOR y aparecen abruptamente formando ráfagas durante el MOR (Corsi,1990). La actividad muscular se observa elevada en la vigilia, se reduce durante el NMOR y desaparece totalmente durante el MOR; sin embargo durante esta última fase se presentan fuertes sacudidas musculares en las extremidades conocidas como mioclonias (Corsi,1990). Algunas funciones como la respiración y el ritmo cardíaco disminuyen su frecuencia al transitar de la vigilia al NMOR hasta presentar fluctuaciones durante el MOR. Incluso la temperatura corporal sigue un ritmo asociado con la vigilia y el sueño (Corsi,1990; Orem et al.,2002).

En la rata, la transición de NMOR a vigilia tiene una duración corta y consiste en una disminución de la amplitud e incremento en la frecuencia de las ondas registradas en el EEG, precedida de un incremento abrupto del tono muscular (Corsi,1990). Por otra parte la transición de vigilia a NMOR no muestra una continua y clara sincronización del EEG, sino que está marcada por la aparición episódica de ondas en huso (Corsi,1990). Las ondas lentas aparecen generalmente uno o varios minutos después de la presentación de los husos. La transición del NMOR a MOR está marcada por un periodo corto, durante el cual el EEG está todavía sincronizado, aún sin indicios de atonía muscular pero con la presencia de ondas PGO de gran amplitud (Corsi,1990). Cuando el MOR está completamente desarrollado, la desincronización cortical es evidente y el tono muscular se abate totalmente (Corsi,1990).

En general, los animales en vigilia presentan características conductuales particulares como cabeza erguida con respuestas rápidas a estímulos del medio ambiente, ojos abiertos y ritmo respiratorio rápido e irregular. La fase de vigilia en los mamíferos se divide en activa y pasiva. En la activa los animales presentan conductas

típicas de su especie y en la pasiva los animales permanecen quietos con los ojos abiertos y alertas a los estímulos significativos del medio ambiente por lo que presentan un umbral bajo para responder a cualquier estímulo sensorial (Jouvet,1967b).

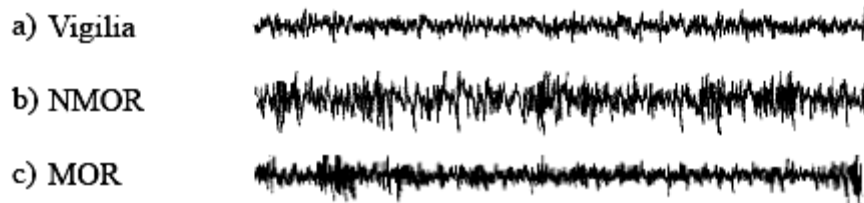


Figura 2. Trazos de EEG representativos de: a) vigilia b) sueño de no movimientos oculares rápidos (NMOR) y c) sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) observados en la rata (Modificada de (Datta et al.,2000)

La vigilia activa en la rata se caracteriza por una actividad de frecuencia variable en un rango de 11.5 a 30 Hz con un voltaje medio que varía de 30 a 50 μ volts (Fig. 2)(Corsi,1990). La vigilia pasiva se distingue por el contrario por un ritmo rápido y de bajo voltaje. En el EMG se presenta una gran actividad, es decir, la amplitud se observa con un voltaje elevado. En el EOG se puede observar un aumento en los movimientos oculares debido a la exploración continua del medio ambiente así como a los estímulos recibidos.

El sueño de no movimientos oculares rápidos (NMOR) en la rata presenta patrones conductuales claramente definidos, la rata se encuentra echada, la pupila se contrae (miosis) y es muy rara la presencia de movimientos oculares rápidos. Se ha observado que la respiración se torna profunda y lenta, mientras que la presión arterial disminuye y el umbral para reaccionar a los estímulos se encuentra elevado en relación con el estado de vigilia (Orem et al.,2002). El registro de las oscilaciones electrográficas del sueño NMOR se caracteriza por los llamados husos de sueño y el ritmo delta sincrónico con frecuencias de 1 a 4 Hz. Conforme avanza el sueño, estos husos se entremezclan con oscilaciones electrográficas lentas (>1 Hz) de alto voltaje (Fig.2). En

el registro del EMG, la actividad muscular disminuye en comparación con la observada en la vigilia y esta disminución se acentúa conforme avanza el tiempo en el cual el animal permanece en esta fase. El registro del EOG presenta una actividad esporádica y lenta (Corsi,1990).

Durante el MOR aparecen movimientos rápidos de los ojos, orejas, vibrisas y extremidades, la respiración se vuelve irregular y con periodos cortos de apnea (Orem et al.,2002). La posición característica que adopta la rata se denomina de “ovillo”. La actividad cortical es una de las características electrofisiológicas que caracterizan el sueño MOR presentándose oscilaciones electrográficas corticales desincronizadas (20 a 30 Hz) y de baja amplitud, paradójicamente similares a las de la vigilia, pese a que el animal se encuentra en la fase más profunda de sueño. Cuando el MOR está completamente desarrollado, las espigas PGO aparecen como potenciales individuales o agrupados como potenciales de pequeña amplitud y la desincronización cortical es evidente y el tono muscular se abate totalmente (atonía) (Corsi,1990).

3.5.2 Mecanismos de regulación del ciclo sueño-vigilia

El sueño es un estado funcional el cual presenta diferentes niveles de control, desde los genes y los mecanismos intracelulares hasta las redes neuronales centrales incluyendo aquellas que controlan el movimiento, despertares, funciones autonómicas, conducta y cognición. Actualmente se consideran la activación o inactivación de muchos grupos neuronales en varias regiones cerebrales a lo largo del ciclo sueño vigilia (Saper et al.,2005a). El sistema nervioso central experimenta una gran variedad de cambios, los cuales son coordinados por una compleja interacción entre múltiples sistemas neuroquímicamente distintos localizados a lo largo del encéfalo.

Hace más de 70 años, von Economo propuso que el sueño estaba regulado por mecanismos opuestos promotores de vigilia y promotores de sueño localizados en el hipotálamo (Saper et al.,2005b). Muchos aspectos de este modelo inicial han sido confirmados y se han refinado en estudios recientes.

La regulación del sueño se da gracias a la participación de diversos grupos neuronales o núcleos interconectados entre sí cada uno capaz de sintetizar diferentes neurotransmisores localizados principalmente en el tallo cerebral, hipotálamo y cerebro anterior basal. Estos núcleos además de estar interconectados tienen proyecciones a otras regiones como el tálamo y la corteza cerebral generándose los ritmos electrográficos observados (Saper et al.,2005b).

Principalmente, dentro del tallo cerebral, cerebro anterior basal y el hipotálamo residen varias poblaciones neuronales que promueven la vigilia usando diferentes neurotransmisores químicos como noradrenalina, dopamina, serotonina, histamina, orexina y acetilcolina (Fig. 3). Estos múltiples sistemas son parcialmente redundantes porque ningún sistema parece ser absolutamente necesario para la vigilia aunque cada uno contribuye en una manera única a su generación y mantenimiento (Saper et al.,2005b).

El hipotálamo puede dividirse en una zona periventricular, que incluye subgrupos que regulan la función hipofisiaria, una zona medial que incluye diferentes grupos incluyendo el núcleo medial preóptico dentro de la llamada área preóptica (POA), una región lateral, y una zona relacionada con el cerebro anterior basal adyacente (forebrain) (Saper et al.,2005b).

Grupos de neuronas localizadas en el área preóptica del hipotálamo anterior y el tallo cerebral están involucrados en la iniciación y mantenimiento del sueño. Por otro lado las neuronas del área preóptica ventrolateral (VLPO) y el area preóptica media

(MPO) contienen neurotransmisores inhibitorios como el ácido amino butírico (GABA) y galanina que proyectan hacia neuronas del hipotálamo y tallo cerebral involucradas en la vigilia (Fig 3). Algunas teorías han propuesto que las actividades recíprocas y las interacciones de grupos neuronales activos durante la vigilia y otros activos durante el sueño determinan la alternancia entre estos dos estados (Fig. 4). Las neuronas monoaminérgicas (sistemas de vigilia: noradrenalina, serotonina e histamina) aumentan su tasa de disparo durante la vigilia, la disminuyen durante el NMOR y prácticamente se inhiben durante el MOR. Esta actividad modula a su vez las regiones GABAérgicas que promueven el sueño NMOR (VLPO y MPO). De esta forma durante el sueño NMOR, dichas regiones GABAérgicas descargan rápidamente e inhiben los grupos monoaminérgicos. Saper denominó a esta interacción recíproca como interruptor flip-flop, ya que es un circuito de retroalimentación que genera dos posibles patrones de descarga y es capaz de producir transiciones entre la vigilia y el sueño NMOR (Fig. 4).

Las neuronas orexinérgicas están principalmente activas durante la vigilia y refuerzan a los otros sistemas promotores de vigilia, mas no inhiben los sistemas promotores de sueño, por lo que se considera que esta relación asimétrica puede ayudar a estabilizar el swich tipo flip-flop y prevenir transiciones inesperadas al sueño (como en el caso de la narcolepsia)(Saper et al.,2005b) (Fig. 4).

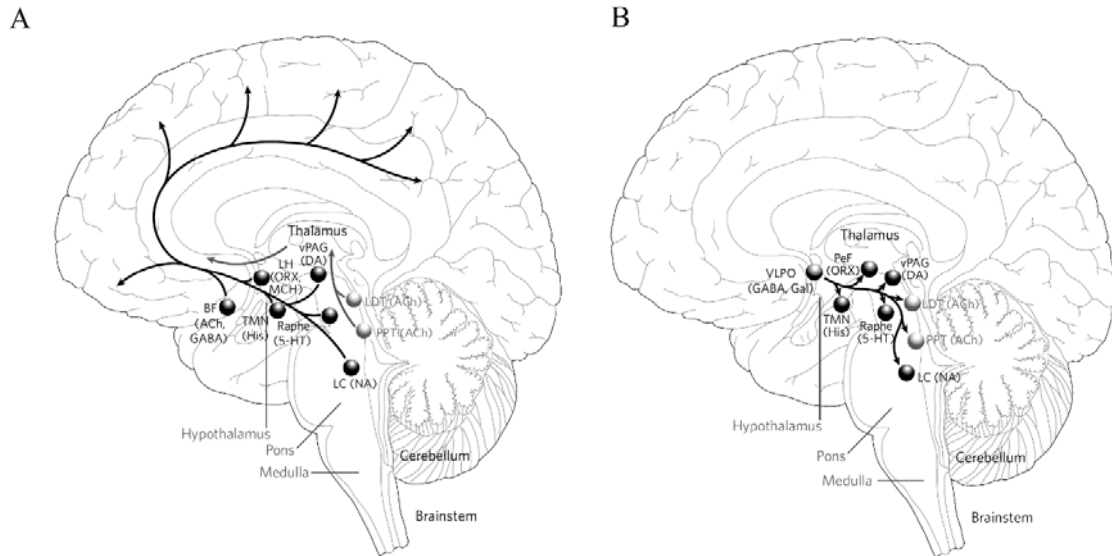


Figura 3. Sistemas neuroquímicos participantes en la regulación de la vigilia y sueño. A. Durante la vigilia los sistemas monoaminérgicos, orexinérgicos y colinérgicos están activos y contribuyen a la desincronización del EEG por medio de sus proyecciones talámicas y corticales. B. Durante el NMOR las neuronas GABAérgicas del VLPO y MPO están altamente activas e inhiben a los núcleos que se encontraban activos durante la vigilia. Abreviaturas: 5-HT serotonina, NA- noradrenalina, HIS, histamina, ORX: orexina, MCH: hormona concentradora de melanina; ACH: acetilcolina, GABA: ácido γ -aminobutírico, Gal: galanina; LC: locus coeruleus, PPT: tegmento pedúnculo pontino, LTD: tegmento laterodorsal, TMN: núcleo tuberomamilar, BF: cerebro anterior basal, LH: hipotálamo lateral, VLPO: área preóptica ventrolateral, mPO: área preóptica media. Tomada de (Saper et al.,2005b)

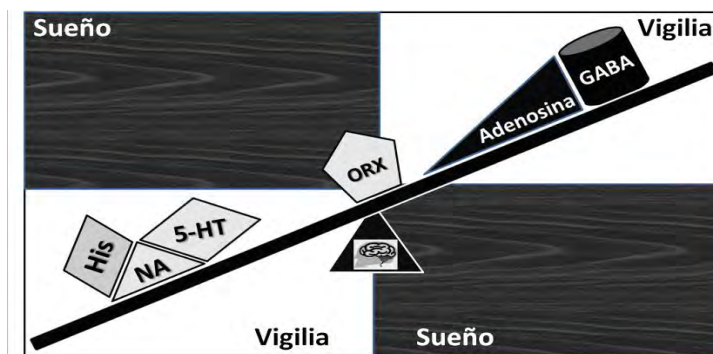


Figura 4. La vigilia es impulsada por el incremento en la actividad de los núcleos monoaminérgicos que inhiben la actividad GABAérgica del área preóptica ventrolateral (VLPO) como se muestra. En esta fase las neuronas orexinérgicas sirven para estabilizar el tono monoaminérgico. Durante el sueño por el contrario la balanza se invierte en sentido inverso de manera que las neuronas GABAérgicas del VLPO inhiben a los núcleos monoaminérgicos y a las neuronas orexinérgicas, previniendo la activación monoaminérgica durante el sueño. Modificada de (Saper et al.,2005a).

Para más detalles ver el artículo de revisión (Franco-Perez et al.,2012) en la sección de ANEXOS 14.1.2.

3.6 SISTEMA INMUNE Y SUEÑO

Los ejes HHA (Hipotálamo-Hipófisis-Adrenales), HHT (Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides) y HHG (Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas) participan en la regulación de la respuesta inmune en tanto que existen receptores comunes tanto para células nerviosas como para células inmunológicas. Así mismo las células inmunológicas pueden producir hormonas y neurotransmisores (Pandi-Perumal et al.,2007).

Las hormonas pueden tener un papel relevante en el ciclo sueño-vigilia. Se ha observado la secreción de hormona del crecimiento durante la primera mitad del sueño y la secreción de dos picos de prolactina en etapas tardías. La secreción de gonadotropinas ocurre durante el sueño predominantemente en la pubertad. La secreción de picos de hormonas tiroideas que ocurre durante la tarde se inhibe por lo general durante el sueño.

Mediante la producción de hormonas y dependiendo de su nivel de concentración se puede estimular o inhibir la producción de citocinas pro y antiinflamatorias (eg. la hormona liberadora de corticotropina CRH puede inhibir la producción de IL-1 β (Angeli et al.,1999)). A su vez estas citocinas pueden estimular la producción de hormonas peptídicas (Pandi-Perumal et al.,2007) (eg. IL-1 β induce la producción de hormona adenocorticotrópica ACTH (Woloski et al.,1985)).

Como ya se ha mencionado, las citocinas son un grupo diverso de moléculas y proteínas de señalización celular que regulan de manera local y sistémica la respuesta inmune e inflamatoria así como otras respuestas biológicas (Galoyan et al.,2008). Diferentes técnicas han mostrado la presencia de receptores para muy diversas citocinas en el cerebro, tanto en condiciones basales como tras la inducción por daño (Galoyan et al.,2008). Por ejemplo las neuronas y las células gliales pueden producir interleucina-1 y asimismo expresar el receptor (Galoyan et al.,2008). Las citocinas tienen un papel

relevante en la regulación del sueño (Krueger et al.,2001) y existe evidencia proveniente de investigaciones con animales y humanos que sugiere la presencia de una interacción entre el sistema inmune, el sistema neuro-endócrino y el ciclo sueño-vigilia (Krueger et al.,2003). Las citocinas representan la unión entre estos sistemas y, de acuerdo con investigaciones recientes, durante la fase aguda de la respuesta a la infección, las citocinas son los principales mediadores de la fatiga y la somnolencia (Dantzer et al.,2007).

Entre las citocinas existentes la IL-1 β y el TNF- α han demostrado en diversos trabajos ser relevantes como sustancias promotoras del sueño NMOR (Moldofsky,1994). Estudios animales han mostrado que dichas citocinas al ser administradas inducen sueño NMOR, mientras que los inhibidores bloquean dicha respuesta (Krueger et al.,2001). Así pues se ha observado que la administración exógena de IL-1 β via intraperitoneal, intravenosa o intracerebroventricular induce incremento del sueño NMOR en ratas, conejos, ratones, gatos y changos (Opp et al.,1991; Moldofsky,1994; Krueger et al.,1998). Por otro lado, estudios en gatos han demostrado un aumento de la IL-1 β en el líquido cefalorraquídeo durante el sueño (Lue et al.,1988). En humanos, se ha asociado al sueño con la elevación de IL-1 β que al parecer está relacionada con una disminución del cortisol en sangre y la aparición de sueño de ondas lentas (o sueño NMOR) (Moldofsky,1994).

Las citocinas como IL-1 β y el TNF- α se han propuesto como mediadores en el incremento de la somnolencia en la respuesta aguda a infecciones virales y bacterianas (Dantzer et al.,2007). También se ha observado que la administración sistémica de IL-1 β o TNF- α en pacientes con cáncer, produce síntomas de somnolencia, anorexia y dolores de cabeza de manera similar a los síntomas de la fase aguda de la respuesta a la infección (Dantzer et al.,2007).

Para más detalles sobre los efectos de las citocinas en el sueño revisar (Ballesteros-Zebadua et al.,2012) en el ANEXO 14.1.1.

IV. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad aún existen muchas preguntas acerca de los efectos de la radiación ionizante en el sueño y se desconocen los mecanismos que pudieran estar involucrados.

Los efectos de la radiación holocraneal en el sueño han sido evaluados únicamente de manera cualitativa. Ya que en los pacientes en tratamiento con radiación holocraneal existen muy diversas variables que pueden influir en el ciclo sueño-vigilia, este proyecto propone evaluar la existencia de dichos cambios en un modelo murino. Teniendo un mayor control de las variables involucradas se espera encontrar más información sobre los mecanismos que pudieran relacionar la radiación y sus efectos en el sueño. Dado que existen características comunes tanto en el sueño como en la respuesta a la radiación en todos los mamíferos, en el caso de que los resultados así los sugieran, pudieran proponerse en un futuro protocolos de estudio en humano para evaluar dichos efectos.

V. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día la radioterapia es una alternativa de tratamiento curativo y paliativo para lesiones cerebrales principalmente neoplasias benignas y malignas, y algunas indicaciones de tipo funcional. La radioterapia es ampliamente usada en la actualidad en México. Como ejemplo la Unidad de Radioneurocirugía del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez se han tratado con radiación aproximadamente 2300 pacientes desde diciembre de 2002 a la fecha. Específicamente la radioterapia holocraneal o a cráneo total se utiliza normalmente como esquema de tratamiento en los casos de metástasis cerebrales así como de manera profiláctica para leucemia linfocítica aguda (LLA) y para el linfoma linfoblástico No-Hodgkin (Rades et al.,2008).

En pacientes, los efectos directos de la radiación son dependientes de la dosis y han sido previamente descritos siendo la apoptosis el mecanismo mayormente descrito a dosis terapéuticas. Recientemente han cobrado mayor relevancia los efectos indirectos de la radiación que son los de tipo inflamatorio y a su vez dependientes de la dosis. Por su parte, los marcadores y las citocinas asociadas a la inflamación han demostrado estar relacionados con trastornos en los patrones de sueño. Es por eso que en este estudio se busca determinar los efectos en los patrones de sueño inducidos por la radiación holocraneal en un modelo murino. Además se busca descubrir su relación con marcadores pro-inflamatorios como lo son la IL-1 β y el TNF- α , ya que ambas citocinas han sido ampliamente descritas como promotoras de sueño. Se busca asimismo conocer la dependencia de dichos efectos con el tiempo ya que se ha reportado en pacientes como una alteración a largo plazo.

VI. HIPÓTESIS

Alterna:

- La irradiación holocraneal producirá un incremento en el tiempo de sueño en las ratas después de la irradiación, asociado a un incremento expresión de la citocinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α .

Nula:

- No se encontrarán cambios en el sueño asociados a la irradiación ni cambios en la expresión de la IL-1 β y TNF- α tras la irradiación o alguna asociación entre ambos.

VII. OBJETIVOS

Objetivo general: Evaluación del posible efecto de la radioterapia holocraneal en los patrones de sueño y en la expresión de IL-1 β y TNF- α en un modelo de rata.

- **Objetivo particular 1.1** Diseñar un método para la irradiación holocraneal en rata que permita medir los efectos de la radiación ionizante en el tejido normal, con validación de la dosis depositada en el tejido mediante la simulación Monte Carlo, validar la dosis depositada en el tejido para el modelo experimental planteado y así poder relacionar la dosis de radiación y los efectos observados.
- **Objetivo particular 1.2:** Determinar variaciones en los patrones de sueño inducidas por radiación en animales irradiados a cráneo total a diferentes tiempos tras la irradiación (1, 30 y 60 días) mediante análisis electrográfico y conductual.
- **Objetivo particular 1.3:** Determinar los niveles de las citocinas pro-inflamatorias IL- 1 β y TNF- α en tejido cerebral de animales con o sin tratamiento de radiación holocraneal a 1, 30 y 60 días post-tratamiento, mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) e inmunohistoquímica.

VIII. VARIABLES

Variables Independientes:

- 1) Dosis (Gy)
- 2) Tiempo tras la irradiación (Días)

Variables Dependientes:

- 1) Duración de fases de sueño (minutos)
- 2) Potencia relativa medida en porcentaje
- 3) Concentración (pg/mg de proteína) en ELISA
- 4) Porcentaje de señal positiva en inmunohistoquímica

Variables de Control

- Sexo
- Edad
- Tasa de dosis y energía de la radiación
- Condiciones de luz oscuridad y cuidados de mantenimiento.

IX. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

9.1 Modelo experimental y cirugía

Los experimentos se realizaron en ratas macho de la cepa Wistar con un rango de pesos entre (180-200g). Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (100mg/kg intraperitoneal) (Pisa, México) y xilacina (10mg/kg intraperitoneal) y colocadas en un aparato de estereotaxia con lápices interauriculares para fijación en los oídos. El cuero cabelludo se limpió con solución yodatada (isodine). Se realizó una incisión en el cuero cabelludo a lo largo de la línea media y la piel fue retraída. Para el registro electrográfico se colocaron quirúrgicamente electrodos para EEG, EMG y EOG. Para el registro de EEG cortical, se emplearon como electrodos tornillos de acero inoxidable tipo “joyero”, colocados de manera bilateral en el cráneo (2.0 mm anterior y 3.5mm lateral a bregma). Un electrodo adicional (tornillo de acero inoxidable tipo “joyero”) se colocó como electrodo de referencia o tierra, en el centro de la sutura craneal lambda. Un par de electrodos, contruidos a partir de alambre de acero inoxidable recubierto de teflón, fueron implantados de manera bilateral en los músculos de la nuca para el registro de EMG. Para el registro de ojo (EOG) electrodos de alambre de acero inoxidable recubierto de teflón, fueron implantados en el canto externo del músculo de ambos ojos. Todos los electrodos fueron asegurados al cráneo empleando acrílico dental. Los electrodos fueron soldados a pines o conectores pequeños y unidos en un conector plástico de siete entradas. Se les inyectó antibiótico vía intramuscular (gentamicina 40 mg/Kg, Pisa, México) y el dolor postquirúrgico fue controlado con un analgésico (clonixinato de lisina 1mg/kg, Pisa, México). Las ratas se recuperaron durante 7 días de la cirugía.

Posteriormente a la recuperación, las ratas fueron habituadas de manera individual a lo largo de 7 días, provistas de comida y agua ad libitum y con ciclo de luz

oscuridad con luz de 0700 a 1900 y oscuridad de 1900 a 0700. La habituación se realizó en cajas transparentes de registro (de plexiglás) y en condiciones de registro electrográfico de libre movimiento.

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizarán bajo condiciones de asepsia de acuerdo con las recomendaciones necesarias para minimizar el dolor o sufrimiento de acuerdo con las regulaciones especificadas por el Comité de Uso y Cuidado Animal del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez y también de acuerdo con los estándares de los Institutos Nacionales de Salud de México, así como las recomendaciones internacionales para la investigación biomédica con animales del Consejo Internacional de Organizaciones de la Ciencias Médicas (Council for International Organizations of Medical Sciences –CIOMS).

9.2 Análisis dosimétrico

Los animales pequeños representan un reto para la medición de la dosis absoluta de radiación depositada en el tejido, dado que por su tamaño y por el tamaño del campo de irradiación pueden carecer de lo que se conoce como equilibrio de partícula cargada en diversas regiones, condición necesaria para una medición confiable de la dosis de radiación. Para validar el depósito de dosis intracraneal en la rata así como el efecto de la presencia de los electrodos metálicos en el cálculo de dosis, se emplearon tanto métodos de simulación Monte Carlo, como métodos de medición dosimétrica como lo son la película de tinte radiocrómico y una cámara de ionización Pinpoint. Para ello se requirió sacrificar dos especímenes. Dichas mediciones se realizaron con la finalidad de garantizar una adecuada relación entre el valor de la dosis depositada y los cambios observados.

9.3 Irradiación

Para garantizar que la dosis depositada cubra adecuadamente la totalidad del encéfalo pero se protejan a su vez las estructuras circundantes más radiosensibles como son las mucosas orofaríngeas, es necesario contar con un sistema de fijación adecuado para el modelo murino, que a su vez reduzca las probabilidades de otitis mediante el uso de lápices. Se optó por emplear un sistema de fijación diseñado a partir de una mascarilla termoplástica empleada en pacientes y una base de acrílico diseñada y construida específicamente para este protocolo. Las ratas previamente anestesiadas (Ketamina 100 mg/Kg) fueron colocadas en dicha base de fijación estereotáxica para ser irradiadas a cerebro total con una dosis de 12 Gy. La dosis se seleccionó de acuerdo con las dosis empleadas in vivo en las cuales se ha reportado un incremento de la inflamación y porque está por debajo de las dosis umbral reportada para observar cambios vasculares, desmielinización y radionecrosis (Monje et al.,2002; Lee et al.,2010b). La irradiación se llevó a cabo en un acelerador lineal dedicado Novalis® con una energía nominal de fotones de 6 MV, empleando una técnica de radioterapia estereotáxica a partir de las imágenes de tomografía computarizada de la rata que se tomarán previamente para la planeación del tratamiento. Se delineó de manera automática corte a corte el cerebro de acuerdo a las imágenes de tomografía. La irradiación se realizó de forma holocraneal o a cráneo total, es decir, cubriendo la totalidad del cráneo, pero protegiendo las estructuras circundantes. A su vez como grupo control se emplearon ratas operadas con electrodos de registro electrográfico y pseudo-tratadas, ya que fueron montadas en la base de fijación y sometidas a las condiciones de irradiación incluyendo la anestesia a manera de simulación pero que no recibieron dosis de radiación alguna.

9.4 Análisis electrográfico de sueño.

Al concluir la recuperación tras la cirugía, y posteriormente a la habituación a las condiciones de conexión, se inició el registro electrográfico control de 24 h para cada animal. En cada caso se realizó registro EEG y EMG (Fig. Posteriormente, las ratas fueron monitorizadas en tres diferentes tiempos tras la irradiación (1 día, 7 días, 30 días) incluyendo 4 ratas para cada intervalo. El registro electrográfico se llevó a cabo mediante cables flexibles conectados desde los electrodos implantados hasta un amplificador para polisomnografía (BioScience Vector PSG32), permitiendo a las ratas libre movimiento y empleando un monitoreo continuo mediante video. A partir del registro electrográfico de 24 h se determinaron visualmente, y de acuerdo con criterios polisomnográficos y conductuales, los periodos de vigilia, sueño de no movimientos oculares rápidos (NMOR) y sueño de movimientos oculares rápidos (MOR). Los registros se realizaron con una frecuencia de muestro de 200Hz y fueron digitalizados y almacenados en una computadora para su evaluación con un software Harmonie v.5.2 (Stellate Systems).

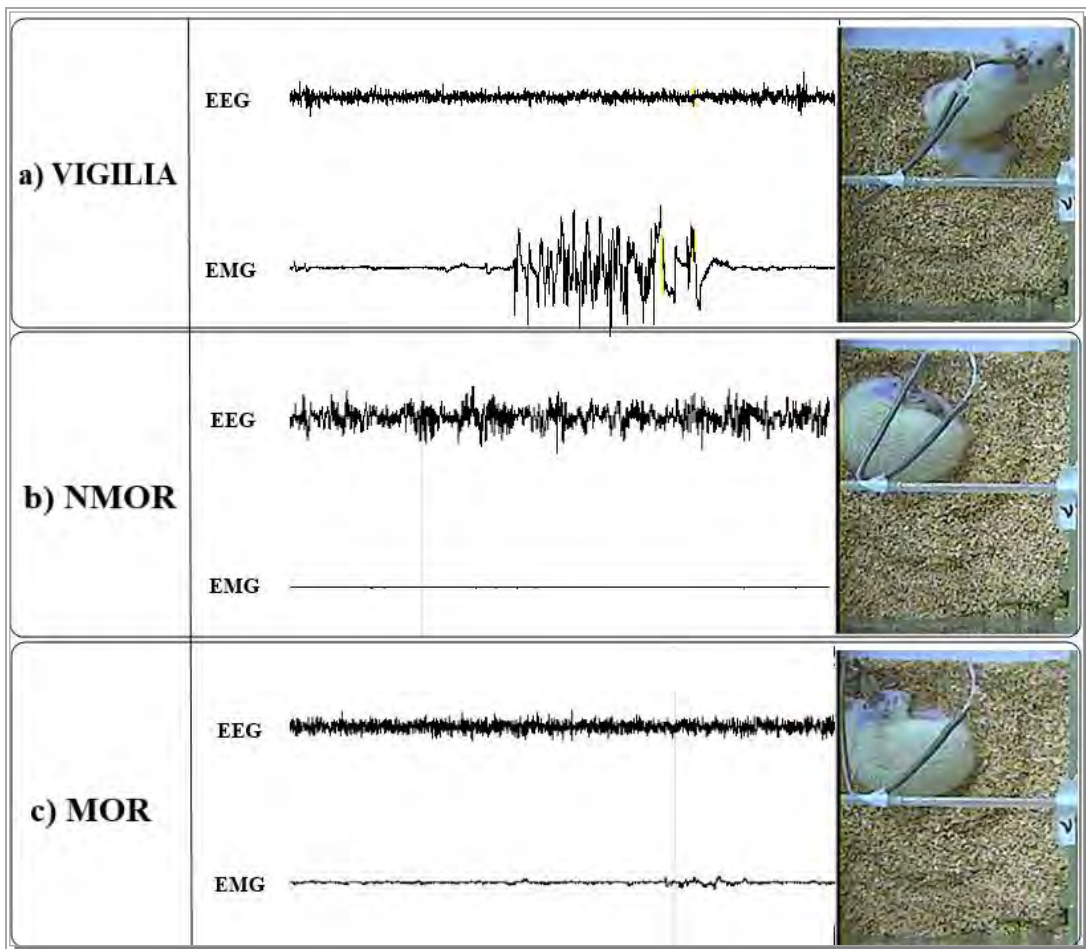


Figura 5. Registros electroencefalográfico (EEG) y electromiográfico (EMG) y la evaluación conductual de cada una de las etapas del ciclo sueño-vigilia: a) Vigilia b) NMOR=Sueño no MOR o de ondas lentas c) MOR= Sueño de movimientos oculares rápidos). Los registros se realizaron durante 24h antes y después de la exposición de las ratas a la irradiación holocraneal (12Gy) A partir de estos registros se realizó la valuación de los tiempos transcurridos en cada una de las etapas de sueño. Imágenes representativas de la conducta de una rata.

Para evaluar y corroborar la técnica de registro y evaluación electrográfica se compararon los valores de los parámetros controles con valores control previamente publicados y con resultados publicados previamente obtenidos en el mismo laboratorio donde se lleva a cabo esta investigación (Franco-Perez et al.,2006), encontrándose grandes similitudes con los encontrados (Tabla 2). Cabe resaltar que no se encontraron diferencias significativas en los tiempos entre el grupo control de 24 h y el grupo control de 30 días tras la irradiación lo cual indica que el efecto del anestésico empleado

durante la irradiación no genera diferencias significativas en el registro, ya que se administró 24 h antes del registro para el grupo control de 24 h y 30 días antes para el grupo control correspondiente a 30 días tras la irradiación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Fig.6).

CONTROLES Takeuchi 1970 Rata adulta			CONTROLES Franco-Perez, et. al 2006 Rata adulta			CONTROLES Valores Experimentales Tesis		
TIEMPO TOTAL	media		TIEMPO TOTAL	media		TIEMPO TOTAL	media	
				675.85 min			682.84min	
Vigilia	control	45.0%	Vigilia	Control	46.9%	Vigilia	control	47.4%
				654.57min			656.87min	
NMOR	control	41.5%	NMOR	Control	45.5%	NMOR	control	45.6%
				109.54min			100.29min	
MOR	control	13.2%	MOR	control	7.6%	MOR	control	7.0%

Tabla 2. Tabla comparativa de los tiempos totales de sueño-vigilia de las ratas controles con valores control previamente publicados (Takeuchi,1970; Franco-Perez et al.,2006).

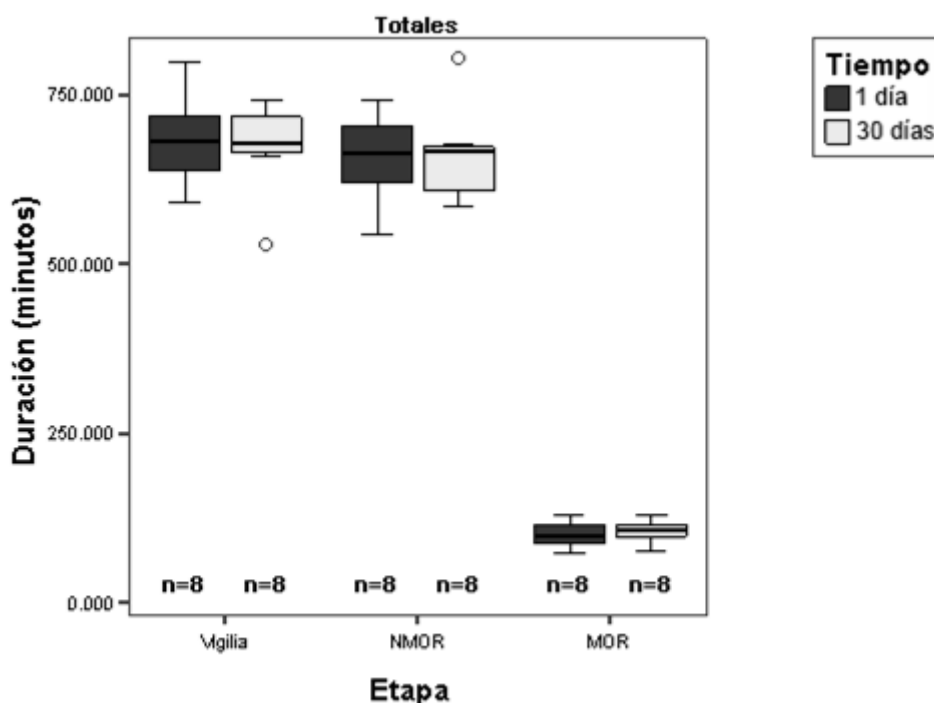


Figura 6. Graficas de caja dónde se comparan los tiempos para cada una de las etapas del ciclo sueño-vigilia entre controles para 1 día y 30 días en los que se evalúa el efecto de la ketamina. Se compararon 8 ratas por grupo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney

para muestras independientes ($P=0.98$). Los diagramas de caja se explican en la sección 9.7.

Adicionalmente se realizó un análisis espectral de las señales electrográficas. Para ello se seleccionaron 10 épocas (40 seg) para a cada una de las etapas de sueño (vigilia, sueño NMOR y MOR), la mitad de ellos en la fase de luz y la otra mitad en la fase de oscuridad. Posteriormente para cada segmento se calculó la potencia (μV^2) empleando la transformada rápida de Fourier para cada una de las siguientes bandas de frecuencia: delta (0.5-3.9 Hz), theta (4-7.9 Hz), alfa (8-14.9 Hz) y beta (15-30 Hz), con una época de 2 segundos empleando el programa Harmonie v.5.2 (Stellate Systems). Posteriormente se expresaron los resultados en términos de potencia relativa en porcentaje y se determinaron las diferencias en dicha potencia antes y después de la irradiación en cada caso.

9.5 ELISA

Tras el registro electrográfico de cada uno de los grupos, las ratas fueron sacrificadas siempre a la misma hora del día (9:00). En la mitad de las ratas de cada uno de los intervalos de tiempo, tras la decapitación se realizó la extracción de tejido de dos principales regiones asociadas al sueño como lo son el hipotálamo y el tallo cerebral (bulbo y puente), incluyéndose además la corteza frontal. Con el tejido extraído se realizó la prueba de ELISA para la IL-1 β y TNF- α . Los tejidos se homogenizaron en un amortiguador de lisis (5 M HCl-guanidina, 50 mM Tris-HCl/pH 8.0, 1x PBS) complementado con el cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, EUA). La concentración de proteínas de los tejidos extraídos se realizó mediante ensayo con ácido bicinonílico (BCA) (Pierce, ThermoScientific, EUA). La ELISA se realizó de acuerdo con las especificaciones y variantes de cada kit. Para la IL-1 β se empleo un kit marca Invitrogen, EUA (KCRC0011). De manera general el anticuerpo específico para IL-1 β

de rata se encuentra ya en los pozos de cada kit. Durante la primera incubación se colocaron 50 μ l de muestra homogenizada o una dilución estándar en cada pozo. El antígeno se une al anticuerpo inmovilizado en un sitio. Durante la segunda incubación se agregó un anticuerpo biotinilado específico para IL-1 β de rata y el anticuerpo se une al marcador capturado durante la primera incubación. Después de remover el exceso del anticuerpo secundario, se añadió la estreptavidina-peroxidasa, la cual se une al anticuerpo biotinilado. Después de la tercera incubación y lavado para remover la enzima libre, se agregó una solución de TMB como sustrato (3,3', 5,5' tetrametilbenzidina), la cual reacciona con la enzima (estreptavidina-peroxidasa) para generar el cambio de coloración. La intensidad de color es proporcional a la concentración del marcador en el espécimen y la absorbancia se midió empleando el espectrofotómetro TECAN modelo Sunrise a 450 nm. A partir de las absorbancias obtenidas y empleando una función de ajuste a partir de concentraciones conocidas se determinó la concentración a medir expresada en pg/ml. La sensibilidad de este kit es <3pg/ml. Posteriormente tras la corrección por concentración de proteína se determinaron los pg/mg de proteína, de cada una de las muestras a evaluar.

Para la medición de TNF- α se empleó un kit de desarrollo de ELISA marca PeproTech, EUA (900-K73). Las indicaciones de este kit son similares, sin embargo, para emplear este kit fué necesario reconstituir el anticuerpo de conejo para TNF- α de rata y recubrir cada uno de los pozos, sellar y dejar reposar una noche a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 100 μ l de muestra homogenizada o una dilución estándar en cada pozo. Posteriormente se agregó el anticuerpo conjugado con avidina-peroxidasa y se empleó ABTS como sustrato para generar el cambio de coloración. Se realizaron las lecturas a 405 nm con una corrección a 620nm.

9.6 Inmunohistoquímica

El resto de los animales de cada grupo fueron sacrificados tras la aplicación de pentobarbital sódico (350 mg/Kg, Pisa, México) mediante perfusión intracardiaca en el ventrículo derecho con 200 ml de solución salina inicial y posteriormente con paraformaldehído (Golden Bell, México) al 4%. El cerebro fue extraído y deshidratado gradualmente en alcohol con xilol para posteriormente incluirlo en parafina y realizar cortes sagitales seriados de 5 μ m según el atlas estereotáxico (Paxinos et al.,1997). Los cortes de cerebro serán rehidratados gradualmente en concentraciones decrecientes de alcohol. Las secciones se incubaron durante una hora con anticuerpo primario policlonal de cabra para IL-1 β (Santa Cruz, USA, SC-1252). Después de la incubación las secciones se lavaron dos veces en PBS con 1 % de BSA y 0.3 % de tritón X-100 (Sigma-Aldrich, EUA). Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra conjugado con fluoresceína (FITC, Jackson, USA, 115-095-146) por 24 a 4°C. Finalmente las secciones se montaron con DAPI para visualizar los núcleos celulares (4',6-diamino-2-fenilindol) (Fluoroshield, Sigma-Aldrich, USA). Las secciones se observaron en un fotomicroscopio equipado con una cámara digital (Olympus IX81-F3). Todas las imágenes se tomaron con un objetivo de 40X bajo las mismas condiciones de luz y procesamiento y fueron filtradas con el programa Image J (NIH, USA) para limpiar el fondo usando un filtro mínimo (2.0 pixeles). Para cada campo se calculó el porcentaje de señal inmunopositiva. El total de células se conto de acuerdo con los núcleos marcados con DAPI.

9.7 Análisis de Datos.

Los resultados se graficaron en diagramas de caja en los que la mediana se representa con una línea gruesa horizontal del interior de la caja. La mediana nos indica que la mitad de los datos se encuentra por debajo y la otra mitad por arriba de ese valor. El conjunto ordenado de los datos puede dividirse en cuatro partes iguales denominadas cuartiles. La caja abarca el rango intercuartílico, que se define como la diferencia entre el tercer cuartil y el primero. El primer cuartil corresponde a la línea horizontal inferior de la caja y el tercero a la línea horizontal superior de la caja. Una línea, o bigote, se extiende desde cada extremo de la caja. El bigote bajo es una línea que va del primer cuartil al punto correspondiente al menor de los datos dentro de 1.5 rangos intercuartílicos a partir del primer cuartil. El bigote superior es una línea que va del tercer cuartil al punto correspondiente al mayor de los datos dentro de 1.5 rangos intercuartílicos a partir del tercer cuartil. Los datos que se encuentran alejados de la caja más allá de los bigotes se grafican como puntos individuales. Los valores atípicos están representados por círculos, y corresponden a aquellos puntos situados después de un bigote, pero a menos de 3 rangos intercuartílicos del borde de la caja. Un punto situado a más de 3 rangos intercuartílicos del borde de la caja se representa con un triángulo y se considera un punto atípico extremo. En las gráficas realizadas en este trabajo cualquier valor por encima de la línea del cero se considera un aumento tras la irradiación y cualquier valor por debajo de la línea del cero un decremento tras la irradiación.

Los resultados de los registros electrográficos y conductuales, los tiempos totales en vigilia, NMOR y MOR, antes y después de la irradiación fueron analizados por medio de una ANOVA no paramétrica de Friedman para muestras pareadas con un valor de

significancia $p \leq 0.05$. Los datos obtenidos de niveles de concentración de proteínas antes y después de la irradiación fueron analizados por medio de una prueba estadística no paramétrica Kruskal Wallis empleando como post-hoc la U de Mann-Whitman con la corrección de Bonferroni, con un valor de significancia $p \leq 0.05$. Las pruebas estadísticas se realizaron empleando el programa SPSS (v. 20, EUA).

X. RESULTADOS

10.1 DISEÑO DE LA TÉCNICA DE IRRADIACIÓN HOLOCRAREAL

10.1.1 Elaboración de un dispositivo de fijación

En este trabajo se construyó un dispositivo de fijación para irradiar ratas con un acelerador lineal comercial dedicado para radioneurocirugía, modelo Novalis 6MV (Brainlab-Varian, Alemania). Existían ciertos requisitos para el dispositivo de fijación. El primero, debía ser lo suficientemente rígido para sostener al animal en caso de que comenzara a despertar inesperadamente de la anestesia durante la irradiación. Por otro lado se buscaba que la distorsión de la radiación causada por el dispositivo fuera la menor posible. A si mismo se evitó emplear el sistema de fijación empleado para cirugía esterotáctica mediante los lápices interauriculares para reducir el riesgo de lesión timpánica debidas a un despertar y/o movimientos repentinos de la rata en un momento dado. El reducir el riesgo de posibles lesiones debidas al sistema de fijación reduce a su vez el riesgo de inflamación debida a dichas lesiones y preserva intactas las condiciones basales del modelo experimental.

La precisión en la localización del blanco de tratamiento del acelerador lineal puede llegar a ser menor a 1mm, cuando se tratan pacientes de radiocirugía, por lo que se buscó que este dispositivo permitiera la irradiación en ratas conservando la precisión del sistema. De esta forma el sistema permite la localización precisa del cerebro de la rata como blanco de irradiación y la protección de las estructuras circundantes.

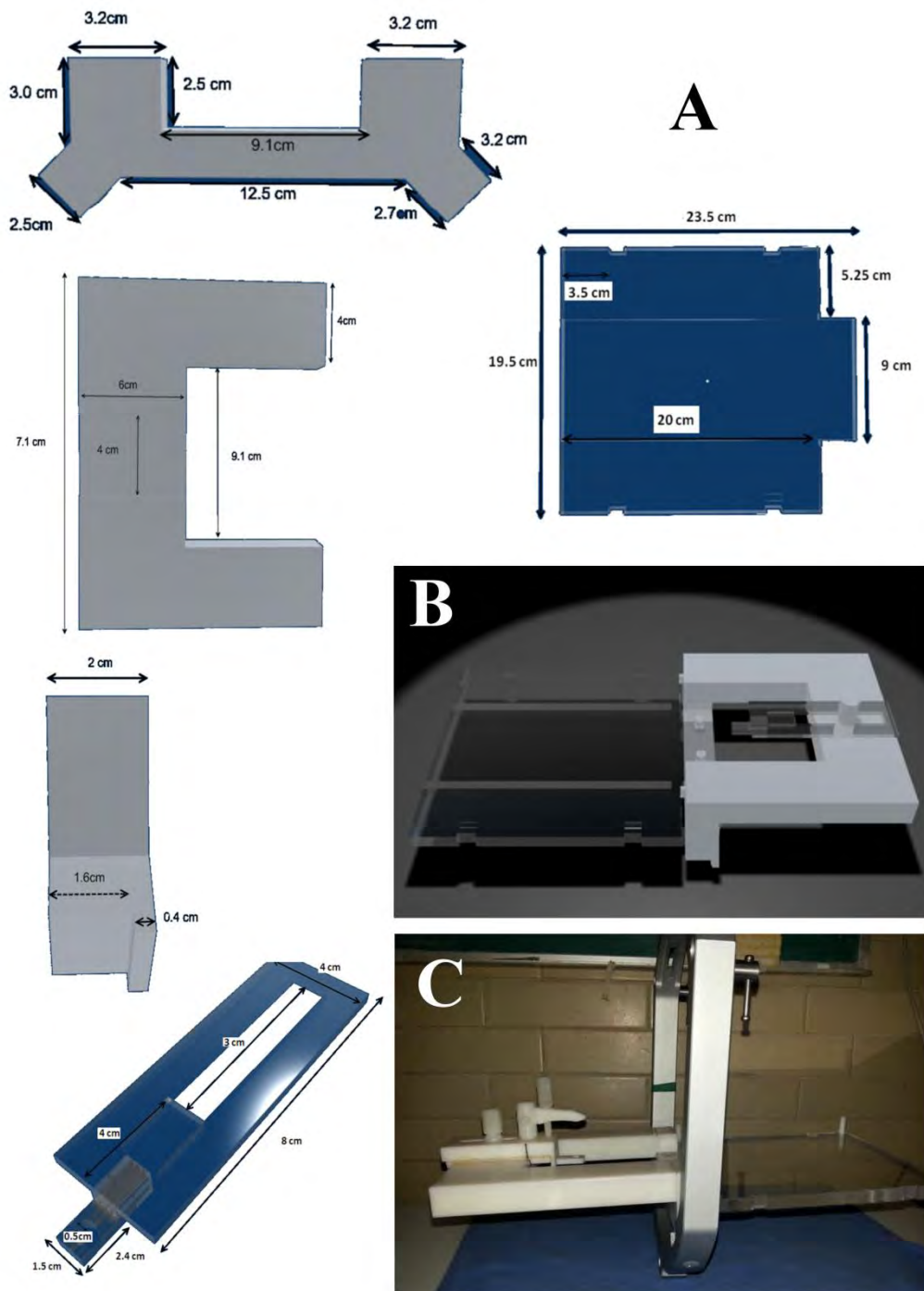


Figura 7. A. Diagramas de fabricación para el soporte de fijación esterotáxico. Se muestran las dimensiones de cada una de las partes que conforman el soporte dibujadas (AutoCad, 2000). B. Simulación tridimensional del soporte de fijación (AutoCad 2000). C. Fotografía del soporte de fijación contruido.

Se construyó un soporte con las dimensiones especificadas (ver Fig. 7A,B) de manera que la superficie de la base en la que se monta la rata se fija perfectamente por un extremo al anillo del fabricante empleado para los tratamientos de radiocirugía (Fig.

7C). Al igual que en el caso de los pacientes, este anillo a su vez se une a un extremo de la mesa de tratamiento y mediante una caja de localización, el sistema permite encontrar la ubicación del blanco de tratamiento como se explicará con más detalle más adelante (Fig 8). La localización del blanco de tratamiento es posible gracias a que, previo al tratamiento, una caja de localización es montada sobre el anillo durante un estudio de tomografía computarizada (TC) del sujeto. Gracias a unas marcas radio-opacas con las que cuenta la caja, el sistema de planeación de tratamientos (Iplan, Brainlab) permite hacer la reconstrucción tridimensional de la imagen de TC y a partir de ella localizar con precisión la ubicación del blanco a irradiar, que en este caso es todo el cerebro de la rata.

A la base de fijación se le agregó una barra de incisivos, similar a la de un estereotáxico para cirugía, para permitir mayor estabilidad de la cabeza y limitar los movimientos de la misma (Fig. 8). Así mismo el cuerpo de la rata fue fijado con una mascarilla termoplástica (Brainlab, Alemania), la cual se vuelve maleable al calentarse y se endurece al enfriar. Esta mascarilla normalmente se emplea para moldear el rostro de los pacientes como sistema de fijación en tratamientos de radioterapia estereotáctica fraccionada. En esta ocasión la mascarilla se empleó para fijar el cuerpo y las extremidades inferiores de la rata y se empleó una misma mascarilla para fijar el cuerpo de todas las ratas irradiadas ya que se encontraban en el mismo rango de peso y por ende morfológicamente similares.

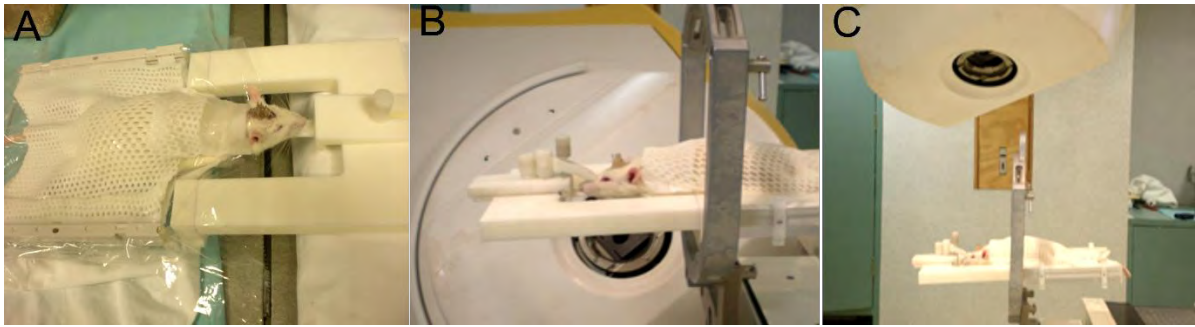


Figura 8. A. Elaboración de la mascarilla termoplástica para la fijación del cuerpo de la rata durante el tratamiento. B. Montaje de una rata en la base para su irradiación fijando los incisivos en una mordedera para limitar el movimiento. C. Montaje de la base de fijación al anillo y a la mesa de tratamiento.

10.1.2 Diseño del Plan de Tratamiento

Para encontrar el plan de tratamiento óptimo para los objetivos de este trabajo se compararon diversos planes de tratamiento. Al igual que trabajos previos de irradiación holocraneal, se seleccionó la técnica que mejor conformó el encéfalo y a su vez que protegió mejor la mucosa orofaríngea como estructura de riesgo (Lee et al., 2010b). La mucosa orofaríngea al ser un tejido con rápido recambio y es altamente radiosensible. Para prevenir la mucositis tanto en la cavidad oral (estomatitis) como en la tráquea y el esófago, se evitó la radiación de estas estructuras. Los ojos y cócleas también se protegieron ya que pueden presentar efectos nocivos debido a la radiación, sin embargo, estos efectos aparecen comúnmente de manera tardía posteriores a los 3 meses tras el periodo de la irradiación. Dado que en este estudio el seguimiento post-irradiación no se prolonga por más de 30 días se puso mayor atención a la dosis recibida en la mucosa orofaríngea la cual puede presentar daño a corto plazo (~4 semanas) tras la irradiación.

La dosis de tolerancia de la mucosa orofaríngea en rata no se conoce con precisión. Es sabido que las radiosensibilidades del cerebro de rata difieren con respecto del humano, por lo que no se espera que los valores absolutos de la dosis de tolerancia de los pacientes puedan aplicarse directamente, sin embargo, se espera que las dosis relativas sean similares, por lo que son útiles como una referencia para evitar la

presencia de estomatitis. Normalmente en pacientes se emplean los valores TD5 y TD50 como referencia. TD5 significa la dosis de tolerancia a la cual el 5% de los pacientes presentó una determinada complicación después de 5 años tras la irradiación y TD50 la dosis a la cual el 50% de los pacientes presentan una complicación a los 5 años tras la irradiación (Perez et al.,2004). En cuanto a lo que se refiere a la mucosa entre 10 Gy – 20 Gy se considera que se afecta la mucosa aerodigestiva siendo el TD5/5 y el TD50 de 5 Gy y 20 Gy respectivamente en dosis única y a la totalidad del órgano (Perez et al.,2004).

Poder realizar la irradiación localizada del cerebro, tras fijar la rata en la base esterotáctica, se toma la imagen de tomografía computarizada. La resolución de la tomografía en X/Y/Z es de 0.7/0.7/1 mm (700/700/1000 μ m) respectivamente.

Posteriormente se empleó una herramienta de segmentación semi-autómata de imágenes para definir el contorno del encéfalo y se corrigió la delineación corte a corte en la totalidad de las imágenes. Como técnica de irradiación se emplearon cuatro arcos dinámicos para irradiación de cerebro total, es decir una modalidad de tratamiento en la que el equipo gira alrededor del blanco y conforma el haz de radiación a la forma del blanco. Se evitó que el haz de radiación incidiera por el sistema de fijación o por el electrodo implantado en las ratas.

Las dosis aplicadas a cráneo total se eligieron en base a reportes previos en los que se relaciona la dosis a cráneo total en modelos animales con la presencia de marcadores de inflamación (Lee et al.,2010b). La prescripción fue 12 Gy al 100%. Para cada rata se delineó manualmente sobre la imagen de TC, la orofaringe en su porción más cercana al encéfalo, para así protegerla empleando 8 Gy como dosis de tolerancia. Las unidades monitor del tratamiento se calcularon automáticamente empleando la

opción de *Forward Planning* con un *guardian* de 100% para una protección alta de los órganos de riesgo.

Las coordenadas del isocentro de radiación en el blanco fueron autocalculadas por el programa como el centro de masa del volumen delineado del encéfalo de la rata. Tras realizar comparaciones entre dos opciones de tratamiento uno en el que los haces de radiación incidían por la parte ventral de la rata y otro donde incidían por la parte superior, como se verá más adelante, se seleccionó este último debido a que mejoraba la protección de la mucosa. Así pues se seleccionó un plan de 4 arcos dinámicos usando tenía los siguientes parámetros de tratamiento:

- Mesa 0 Gantry 280 a 310
- Mesa 0 Gantry 50 a 80
- Mesa 30 Gantry 50 a 80
- Mesa 330 Gantry 280 a 310
- Colimadores optimizados y Margen 0.0

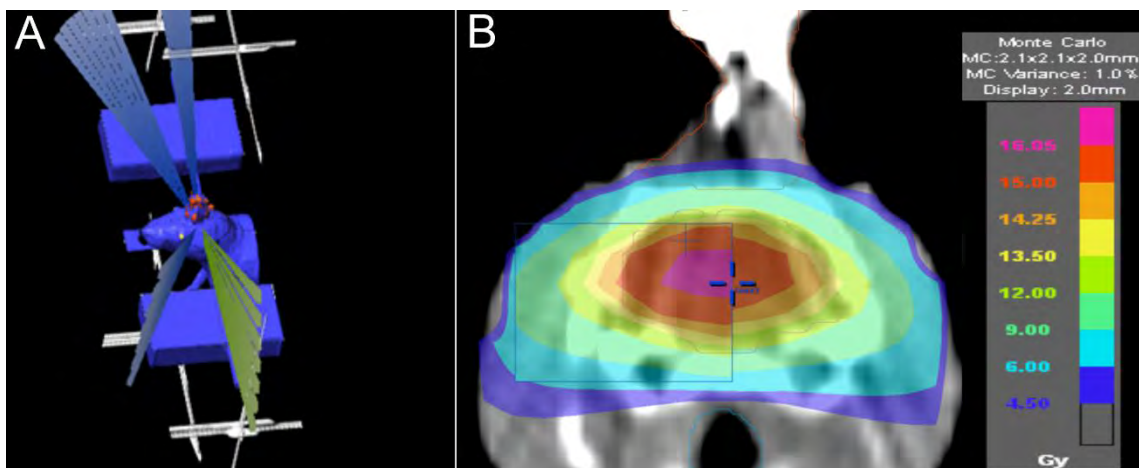


Fig 9. A.Reconstrucción 3D de la imagen de TC de la rata y simulación mostrando la posición de la incidencia de los haces de radiación. B. Corte coronal de la imagen TC de la rata mostrando la cobertura de las curvas de isodosis calculadas con Monte Carlo. En el recuadro se muestra un cálculo simultáneo de la dosis realizado con el algoritmo de Pencil Beam.

10.1.3 Corrección de artefactos metálicos

En el modelo de rata propuesto en este proyecto con fines de evaluar los efectos de la radiación en el sueño existen varias condiciones que deben de tomarse en cuenta en cuanto a la dosimetría. La primera son los artefactos generados por la presencia de electrodos. El realizar una imagen de TC de una rata a la que previamente se la ha realizado el implante de electrodos para registro electrográfico para tener su registro basal, representa diversos retos. La presencia de objetos metálicos en la cabeza de la rata al realizar el estudio de imagen genera artefactos en la imagen que cambian la densidad óptica o tonos de gris en el área a irradiar. Esto puede afectar el cálculo de la dosis ya que el algoritmo emplea los tonos de gris de la imagen asociados a las Unidades Hounsfield (HU) a éstos para corregir la atenuación que sufre el haz al atravesar diferentes tejidos. Esto es gracias a que una calibración previa realizada con materiales conocidos permita la asociación entre las HU y la densidad electrónica de los diferentes materiales. Para reducir el efecto del electrodo en el cálculo de dosis se propusieron dos alternativas en el sistema de planeación. La primera consiste en delimitar en la imagen el área que corresponde a los artefactos y sustituir manualmente sus HU por el promedio tanto de las HU del encéfalo como las del electrodo. La segunda consiste en eliminar la corrección que realiza el algoritmo por densidades electrónicas llamada Path Length Correction (PLC), de manera que el sistema de planeación considerará todos los tejidos con una densidad electrónica equivalente a la del agua, que es muy similar a la de la mayoría de los tejidos. Para analizar cuál de ambas opciones era la más conveniente y generaba menos perturbaciones se calcularon las variaciones porcentuales para un caso en el que no existe el electrodo ni los artefactos asociados al mismo aplicándole ambas alternativas de corrección (Tabla 2). Las dosis se calcularon empleando un método Montecarlo, calculando la dosis mínima,

dosis promedio, dosis máxima, volumen de tejido que recibe la dosis de prescripción, distancia promedio de la piel al isocentro de radiación y distancia equivalente en agua de la piel al isocentro. Posteriormente para cada una de estas mediciones se calculó la variación porcentual existente antes y después de aplicar la corrección para cada una de las opciones de corrección de los artefactos.

	Dosis Mínima	Dosis Promedio	Dosis Máxima	Volumen 12Gy	Distancia Promedio a la piel mm	Distancia equivalente a la Piel mm
Opción A	2.34%±3.3%	0%±0%	0.093%±0.10 %	0.11%±0.001 %	0%±0%	0.061%±.087 %
Opción B	0.65%±0.2%	0.22%±0.1%	1.17%±0.66%	0.11%±.07%	0%±0%	3.71%±0.53%

Tabla 3. Variaciones porcentuales generadas por dos método de corrección de artefactos en diferentes parámetros asociados con el cálculo de dosis (Montecarlo) A. Corrección manual de Unidades Hounsfield B. Eliminación de Path Length Correction.

Se observó que las variaciones eran menores para el caso de la corrección manual de UH (Tabla 3, Opción A). Por lo tanto, en lo subsecuente, para la planeación de cada rata y en cada una de las imágenes de TC se delinearon los artefactos generados por el electrodo (Fig. 10). Tras haber delineado la totalidad del cerebro se remplazan las HU del mismo por el valor de que corresponde a un valor promedio de las unidades Hounsfield del encéfalo sin electrodo ni artefactos (40 HU). También para el caso del electrodo se delineó el mismo y se remplazaron sus HU por un promedio de Unidades Hounsfield (1113 HU) para llenar los huecos que aparecen como producto del artefacto en el electrodo mismo (Fig. 10).

Para conocer la relevancia de llevar a cabo la corrección del artefacto en los valores de la dosis depositada se comparó la dosis calculada con método Monte Carlo sin hacer ninguna corrección y después de hacer la corrección y también se comparó la variación entre ambos métodos (Tabla 4). Se observa que la variación en dosis es mayor al 5% usualmente empleado como límite de tolerancia, por lo que se considera

relevante realizar la corrección de los artefactos de imagen en todos los casos empleando el método seleccionado.

	Dosis Mínima	Dosis Promedio	Dosis Máxima	Volumen 12Gy	Distancia promedio a la piel mm	Distancia equivalente a la piel mm
A vs. B	9.14%±0.041%	7.04%±8.01%	12.56%±18.34%	1.35%±0.91%	2.82%±4.18%	3.75%±3.79%
A vs. C	9.42%±10.01%	6.95%±8.88%	11.71%±18.12%	0.82%±0.35%	2.82%±4.18%	2.83%±3.77%

Tabla 4. Variaciones porcentuales entre el cálculo para la planeación (Monte Carlo) de una misma rata comparando dos opciones diferentes de corrección de artefacto: Path Length Correction y corrección manual de UH (A vs. B) y comparando un caso sin ninguna corrección y realizando la corrección manual las UH (A vs. C).

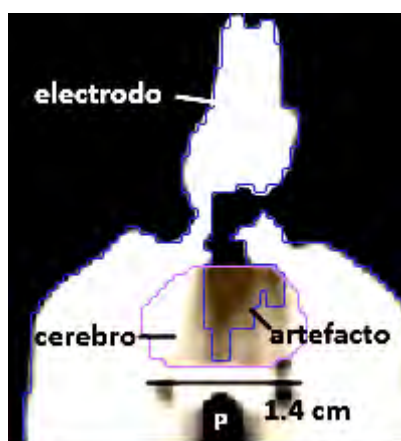


Fig 10. Corte coronal de la imagen de TC de una rata donde se observa el electrodo implantado en la parte superior así como el artefacto generado por el mismo y que incluso se observa dentro del cerebro el cual se encuentra delineado en color lila.

10.1.4 Dosimetría de campos pequeños

La irradiación de animales pequeños comúnmente implica campos pequeños de radiación lo cual representa diversos retos desde la perspectiva de la medición de la dosis depositada en los tejidos. La mayoría de los algoritmos convencionales de cálculo de dosis se basan en mediciones realizadas en el equipo con la finalidad de caracterizar el haz de radiación. El principal problema asociado con la dosimetría de campos pequeños es que la sola presencia del detector produce una perturbación del haz de radiación que es difícil de cuantificar de manera confiable (Das et al.,2008). Por otro

lado el sistema de planeación realiza cálculos de dosis absoluta a partir de estas medidas dosimétricas empleando relaciones que son válidas para campos grandes de fotones (el de referencia es de $10 \times 10 \text{ cm}^2$), pero que no necesariamente aplican para haces de fotones de dimensiones reducidas (Paskalev et al., 2003; Sanchez-Doblado et al., 2005). El medir la dosis de campos pequeños usados en animales de experimentación puede representar también la pérdida de lo que se conoce como equilibrio electrónico lateral así como la presencia de altos gradientes de dosis. En cuanto a los gradientes, los perfiles de depósito de dosis en profundidad cambian bruscamente en los primeros mm de tejido hasta llegar a un punto máximo. Se considera que para el caso de un acelerador de 6 MV el máximo de dosis depositada se encuentra alrededor de 1.5 cm de profundidad en agua. Por otro lado, la presencia de inhomogeneidades en el tejido (v.g. cavidades de aire) así como la proximidad a un borde o superficie también pueden comprometer las condiciones de equilibrio de partícula cargada requeridas para realizar una medición adecuada principalmente con cámara de ionización. Para determinar si se ve afectada la dosis calculada por el sistema de planeación para el caso de los cerebros de rata, se realizaron mediciones de verificación empleando diferentes métodos como el de película de tinte radiocrómico que permite realizar mediciones de alta precisión en estas condiciones.

10.1.5 Verificación de Dosis

Para la verificación de la dosis depositada en el cerebro de la rata, se comparó el cálculo convencional de dosis del sistema de planeación mediante el algoritmo Pencil Beam (Brainlab, Alemania) con el cálculo mediante otros métodos disponibles a manera de validación. Se emplearon para la verificación dosimétrica 3 técnicas diferentes: Monte Carlo, cámara de ionización y película de tinte radiocrómico.

10.1.5.1 Monte Carlo

En radioterapia las técnicas Monte Carlo se aplican para resolver problemas de transporte de la radiación en los tejidos vivos a manera de simulación tomando en cuenta la mayor parte de la física del fenómeno y considerando cada interacción como un fenómeno aleatorio con una probabilidad asociada. La radiación es descompuesta en cuantos individuales (fotones, electrones, positrones). El paso de estas partículas a través de los diferentes medios y del tejido humano es simulado tomando en cuenta las propiedades de los materiales, las propiedades de los diferentes componentes del cabezal del acelerador lineal por donde se está emitiendo la radiación así como de las propiedades del tejido vivo en cada elemento de volumen (voxel). Los fotones, electrones, y positrones interactúan con los electrones de las capas atómicas y el campo electromagnético de los núcleos atómicos. Esto puede provocar eventos de ionización. Las correspondientes interacciones están basadas en las leyes de la física cuántica. Para el cabezal estas propiedades pueden ser calculadas usando la composición atómica conocida de los diferentes componentes; para el tejido blanco pueden calcularse en base a las imágenes de tomografía y las UH de cada voxel. Las propiedades de interacción están dadas como secciones transversales totales y diferenciales. Las secciones transversales totales caracterizan las probabilidades de interacción de una partícula con determinada energía en un medio con una composición atómica definida. Las secciones diferenciales caracterizan las funciones de distribución de probabilidad para la generación de partículas secundarias con parámetros de partículas secundarias definidos, como energía y ángulo de dispersión. Los números aleatorios en una simulación Monte Carlo se requieren para muestrear los parámetros específicos de estas funciones de distribución de probabilidad.

El algoritmo Monte Carlo iPlan RT Dose (BrainLAB, Alemania) empleado en este trabajo para la verificación de dosis, está basado en el algoritmo X-Ray Voxel Monte Carlo desarrollado por Iwan Kawrakow y Matthias Fippel (Kawrakow et al.,1996; Fippel et al.,1997; Fippel,1999a; Fippel et al.,1999b; Kawrakow et al.,2000; Fippel et al.,2003; Fippel,2004). El algoritmo de BrainLab Monte Carlo consiste en tres componentes principales. La primera es usada como la fuente de partículas y se define como Modelo Virtual de Fluencia en Energía. Modela la parte superior del cabezal del acelerador (blanco, colimador primario, filtro primario) y genera fotones así como contaminación de electrones con su correspondiente distribución. Las partículas son entonces transferidas al siguiente componente, el modelo del sistema de colimación. Dependiendo de la configuración del campo, las partículas son absorbidas, dispersadas o pasan a través del sistema de colimación sin interacción. Las partículas sobrevivientes son transferidas al modelo de cálculo de dosis en el paciente. En este tercer componente, se simula el transporte a través de la geometría del paciente y se calcula la distribución de dosis. Para poder correr una simulación Monte Carlo es necesario previamente realizar 185 mediciones en diversas condiciones que permiten caracterizar y modelar la fluencia en energía y modelar el sistema de colimación. Estas mediciones se realizaron en la Unidad de Radioneurocirugía del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, empleando el acelerador lineal Novalis de 6MV. Las mediciones se enviaron directamente a Alemania para poder así obtener la dosimetría necesaria para correr las simulaciones Monte Carlo gracias a una licencia temporal de prueba otorgada por Brainlab.

Se calculó la dosis empleando Monte Carlo con una varianza promedio de 0.5 %; este valor limita la varianza en dosis por voxel para facilitar una distribución exacta y suavizada, además se contó con una resolución espacial de 2.0x2.0x2.0mm, lo cual

representa el tamaño del *grid* o matriz de dosis empleado para el cálculo de los volúmenes en 3D. Se empleó la opción de cálculo de dosis en el medio, la cual calcula la dosis absorbida en el tejido del blanco. Se empleó además la opción *accuracy optimized*, donde el colimador multihojas (MLC) que le da forma al haz de radiación es modelado con el diseño actual (incluyendo los efectos llamados conocidos como *Tongue and Groove*) basándose en el perfil propio de la máquina y tomando en cuenta la fuga de las hojas que conforman el sistema de colimación del haz.

Se analizaron las diferencias porcentuales entre lo planeado con el algoritmo de Pencil Beam y lo calculado con el algoritmo Monte Carlo para un promedio de 5 ratas cada una con su planeación de irradiación (Tabla 5). Así mismo para considerar si existía una ventaja en modificar el plan de irradiación de manera que los campos ingresaran por la parte inferior del cráneo, dado que hay mayor tejido esto podría mejorar las condiciones de equilibrio, se evaluó también la variación porcentual en una planeación con 4 Arcos pero por la parte inferior de la rata (Tabla 5).

		% variación Dosis Mínima	% variación Dosis Promedio	% variación Dosis Máxima	% variación Volumen cubierto 12Gy	% variación Distancia piel superficie mm	% variación Distancia equivalente mm
Con electrodo	Superior	2.48 ±1.77	3.70±0.24	4.49±0.87	1.67±0.76	19.63±9.35	15.48 ±5.42
	Inferior	4.86±3.50	3.59±0.08	4.43±0.78	3.32±1.9	19.39±0.58	19.61± 0.98
	Promedio	3.43±2.51	3.65±0.19	4.47±0.73	2.33±1.45	19.54±6.62	17.13±4.48
Sin electrodo	Superior	2.93±0.14	4.35±0.44	5.64±0.64	2.68±0.018	10.53±8.5	10.9±6.5
	Inferior	4.18±0.18	3.51±0.35	4.16±0.47	2.24±0.015	19.45±3.8	20.2±6.8
	Promedio	3.56±0.90	3.93±0.59	4.89±1.05	2.46±0.30	14.99±6.15	15.55±6.65
Promedio		3.48±1.7	3.79±0.39	4.68±0.88	2.39±0.88	17.26±6.46	16.34±5.53

Tabla 5. Promedio de las diferencias porcentuales entre el cálculo de dosis Monte Carlo y Pencil Beam para ratas con y sin electrodo y planes con campos superiores e inferiores.

De acuerdo con los resultados (Tabla 5) no se encontraron cambios en la variación entre algoritmos para el plan de campos inferiores, y por el contrario se encontró que el volumen cubierto por la dosis de prescripción varía en mayor proporción, además de que la protección a la orofaringe empeoraba considerablemente, por lo que se reiteró

que no se consideraría como una alternativa de planeación ya que no representó ninguna mejoría. En la Tabla 4 también se puede observar que la distancia del isocentro a la superficie es mayor en presencia del electrodo y la diferencia entre lo planeado y lo calculado es ligeramente mayor para el caso sin electrodo, pero sin ser significativa estadísticamente. En promedio la variación entre ambos algoritmos de cálculo de la dosis es menor al <5% para la mayoría de las estimaciones, por lo que se puede concluir que la variación debida al algoritmo es menor a la encontrada por efecto del artefacto en la imagen antes de la corrección previamente propuesta.

10.1.5.2 Medidas con Cámara de ionización

Se sacrificaron dos ratas inyectándoles una dosis elevada de pentobarbital sódico (350 mg/kg) una de las cuales fue previamente implantada con los electrodos para registro polisomnográfico. Se empleó una cámara de ionización Pinpoint Chamber 0.015 cc Tipo TN31006 Serial No. 0558 Calibrada en agua a unas condiciones de referencia de 20°C +400V y 1013hPa de acuerdo con el protocolo IAEA 277. Para ambas ratas post-mortem, se realizó una abertura en la parte basal del cráneo para introducir la cámara de ionización recubierta con parafilm. La cámara de ionización está calibrada para obtener valores de dosis absoluta en agua a partir de mediciones de carga (Coulombs). De acuerdo con los resultados obtenidos la dosis al isocentro medida con la cámara de ionización Pinpoint varía en un 9% respecto de lo planeado para el caso de la rata con electrodo implantado y en un 4% para la planeación sin electrodo. Se observa que existe menor variación entre lo planeado y lo calculado cuando está presente el electrodo. También se observa que las diferencias encontradas entre lo planeado y lo medido son mayores a lo encontrado al comparar lo calculado con Monte Carlo. Esto puede deberse a que al incidir el haz de radiación por el electrodo implantado en la rata aumenta la radiación dispersa y por lo tanto genera fotones de baja energía que se

generan por dispersión Compton. La respuesta de la cámara Pinpoint puede variar ligeramente según la energía de la radiación incidente (Martens et al.,2000). Se sabe que las cámaras Pinpoint pueden tener una sobre respuesta a fotones de bajas energías generadas por dispersión Compton por lo que es probable que al existir mayor dispersión en el caso de la rata con electrodo es por esto que se observa un mayor respuesta de la cámara de ionización. Para éstas comparaciones se emplearon únicamente dos campos incidiendo el haz centrado directamente en el electrodo por lo que el efecto observable de la dispersión de la radiación puede ser aún mayor. Además de la variación en la respuesta se encontraron muchas dificultades técnicas para introducir la cámara de ionización en el cerebro, por lo que se puede concluir que no es un método recomendable para la verificación de dosis en animales pequeños.

10.1.5.3 Medidas con película de tinte radiocrómico

Para realizar una verificación de la distribución espacial en 2D de la dosis depositada y complementar la validación de las técnicas de radiación se empleó película de tinte radiocrómico, que es un tipo de película que se auto-revela cuando se expone a radiación ionizante y el cambio de coloración de la misma puede relacionarse directamente con la dosis de radiación depositada. La película tiene ciertas ventajas operativas por el hecho de tener una muy alta resolución espacial que permite obtener distribuciones de dosis con precisión en un solo experimento. Además de la gran ventaja de que esta película no requiere revelado y se considera que su densidad es tejido equivalente para efectos de la radiación. Dada la dificultad de introducir película de tinte radiocrómico en el interior del cerebro de la rata se construyó un maniquí o fantoma (phantom) para realizar las medidas con película. Para construir un maniquí con dimensiones equivalentes en cuanto a la atenuación de la radiación a las dimensiones de la cabeza de la rata, se determinó la densidad electrónica del acrílico con el que se

contaba, realizando una imagen de TC del material disponible y se realizó un ajuste a la curva de calibración correspondiente al tomógrafo empleado. Así se construyó un cilindro con dos tapas, con una tapa de 1.6 cm de profundidad (Fig. 11).

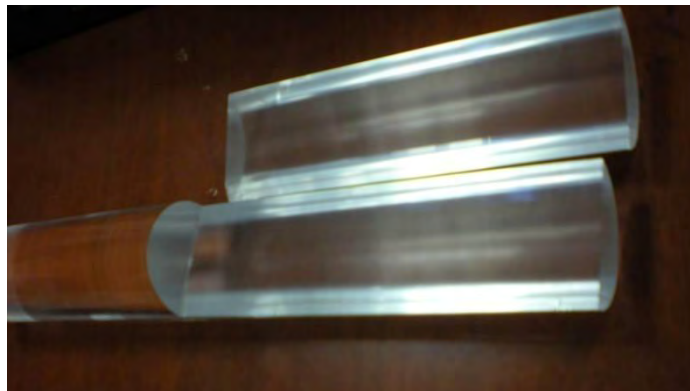


Figura 11. Maniquí de acrílico construido para mediciones con película de tinte radiocrómico.

Con el maniquí construido se realizó una imagen TC y se realizó planeación de tratamiento con el maniquí en dos modalidades, con y sin electrodo adherido a la tapa superior. Se irradiaron ambas películas usando el acelerador lineal.

Posteriormente se realizó la lectura de las películas digitalizándolas en un scanner plano (Microtek 9600XL en transmission mode, 48 bit (RGB) y a 100 puntos por pulgada). Cabe mencionar que el manejo de la película se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones del reporte TG-55 (AAPM). Tanto para las películas como para las distribuciones de dosis calculadas con el sistema de planeación (algoritmo de Pencil Beam) se obtuvieron perfiles de dosis empleando el software Image J (NIH, EUA). Adicionalmente se compararon las distribuciones de dosis usando el programa DoseLab (Mobius, Medical Systems, EUA). Finalmente se calculó la dosis depositada en la película de tinte radiocrómico empleando el método de Monte Carlo.

Empleando la película de tinte radiocrómico se encuentra que las diferencias en dosis se acentúan para las curva de dosis bajas cerca de la superficie del cráneo generando un bajo porcentaje total de voxels (~70%) que cumplen con el criterio del

índice gamma (2%/2mm) (Fig. 12,13). Los resultados del análisis muestran que las diferencias entre la dosis calculada y la dosis medida para los perfiles son mayores en regiones superficiales correspondientes a la piel y al cráneo y relativamente lejanas de las estructuras que se estudiarán en este trabajo (Fig 13).

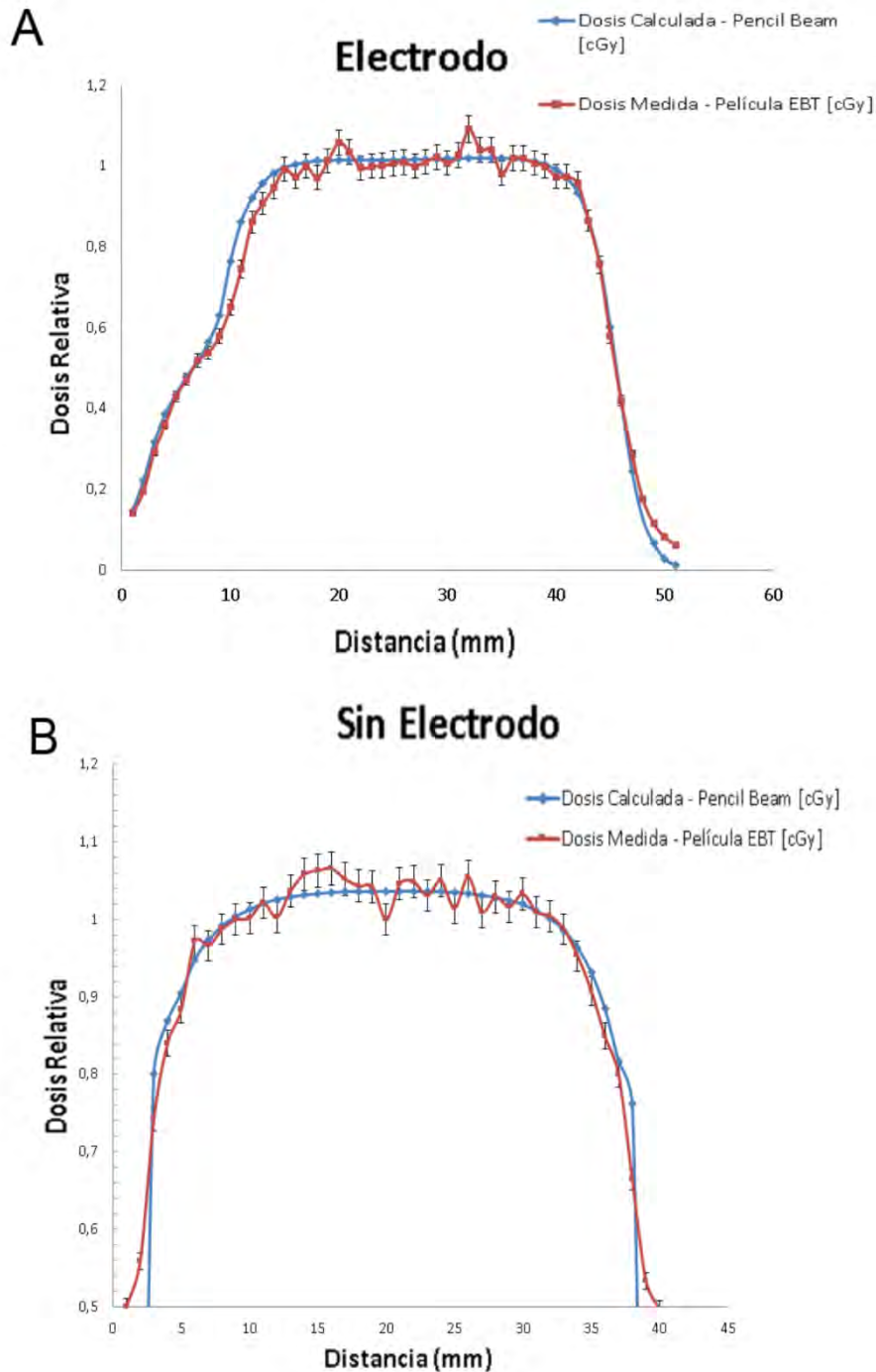


Figura. 12 Comparación entre perfiles de dosis medidos con película de tinte radiocrómico (EBT) y perfiles calculados por el sistema de planeación mediante el algoritmo de Pencil Beam (A) con y (B) sin electrodo.

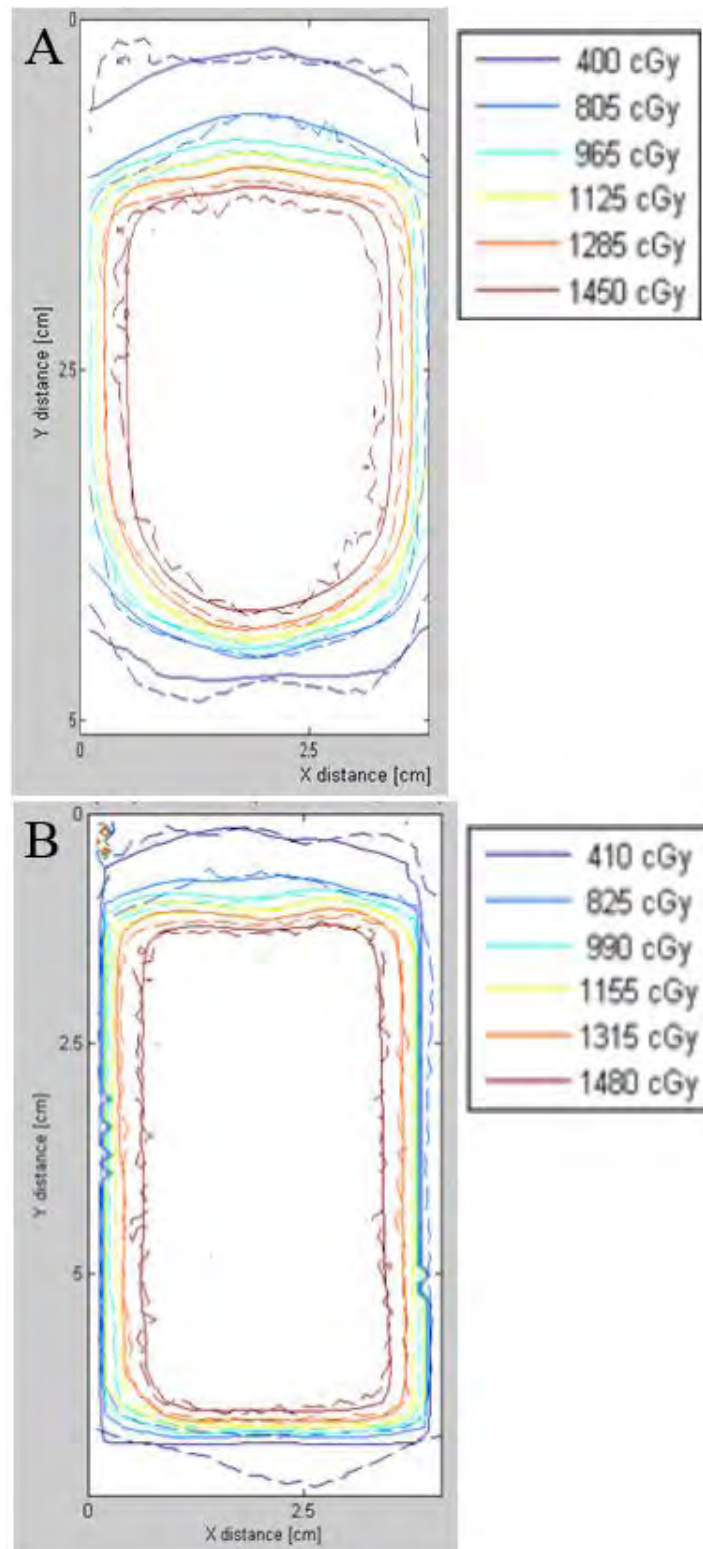


Figura 13. Comparación entre las curvas de isodosis calculadas por el sistema de planeación (línea continua) y las medidas con película de tinte radiocrómico (línea punteada) para A. la irradiación del maniquí con electrodo B. la irradiación del maniquí sin electrodo. Las curvas se obtuvieron empleando el programa DoseLab. Se observan discrepancias entre ambas líneas (continua y punteada) principalmente en las curvas más externas que corresponden a las menores dosis.

10.2 RESPUESTA A LA IRRADIACIÓN HOLOCRAREAL

10.2.1. Efectos de la radiación holocraneal en el ciclo sueño-vigilia

Tras realizar registros electrográficos y conductuales de cada rata antes y después de ser sometidas a irradiación holocraneal se analizaron los cambios en los tiempos totales transcurridos en cada una de las fases del ciclo sueño vigilia. Se calcularon las diferencias en minutos en los tiempos transcurridos antes y después de la irradiación y se graficaron mediante diagramas de caja.

Como se muestra en la gráfica, se encontró una disminución en el tiempo de vigilia tras la irradiación y un aumento en el sueño tanto NMOR como en el sueño MOR (Fig 14). Estos cambios aunque pequeños fueron estadísticamente significativos (decremento promedio en tiempo vigilia=-25.12 min $p=0.016$, aumento promedio en tiempo de NMOR= 19.8 min $p=0.001$, cambio promedio en tiempo MOR= 5 min $p=0.037$)

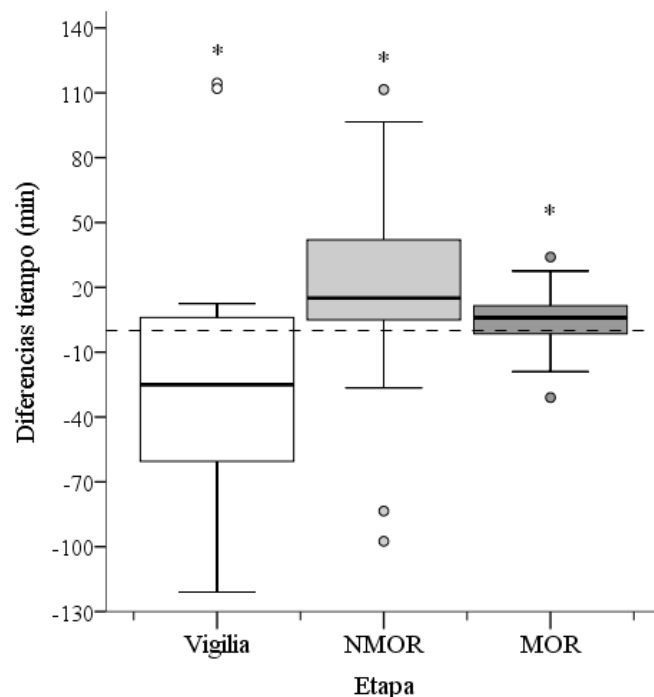


Figura 14. La gráfica muestra las diferencias en minutos en los tiempos transcurridos en cada una de las etapas del ciclo sueño vigilia, antes y después de aplicárseles 12 Gy de radiación holocraneal. Los asteriscos representan una $p < 0.05$ diferencias significativas en los grupos (ANOVA de Friedman: vigilia $\chi^2(1) = 5.76$ $p = 0.016$, NMOR $\chi^2(1) = 11.765$ $p = 0.001$, MOR $\chi^2(1) = 4.333$ $p = 0.001$).

Posteriormente se analizaron los cambios tras la irradiación separando la fase de luz y la fase de oscuridad (Fig. 15). Se observa que los cambios son únicamente significativos para el caso de la fase de oscuridad y para las etapas de vigilia y sueño NMOR. En la vigilia se observa un decremento promedio de 41.29 min ($p= 0.03$) y en el sueño NMOR un aumento promedio de 34.69 min ($p=0.0001$)

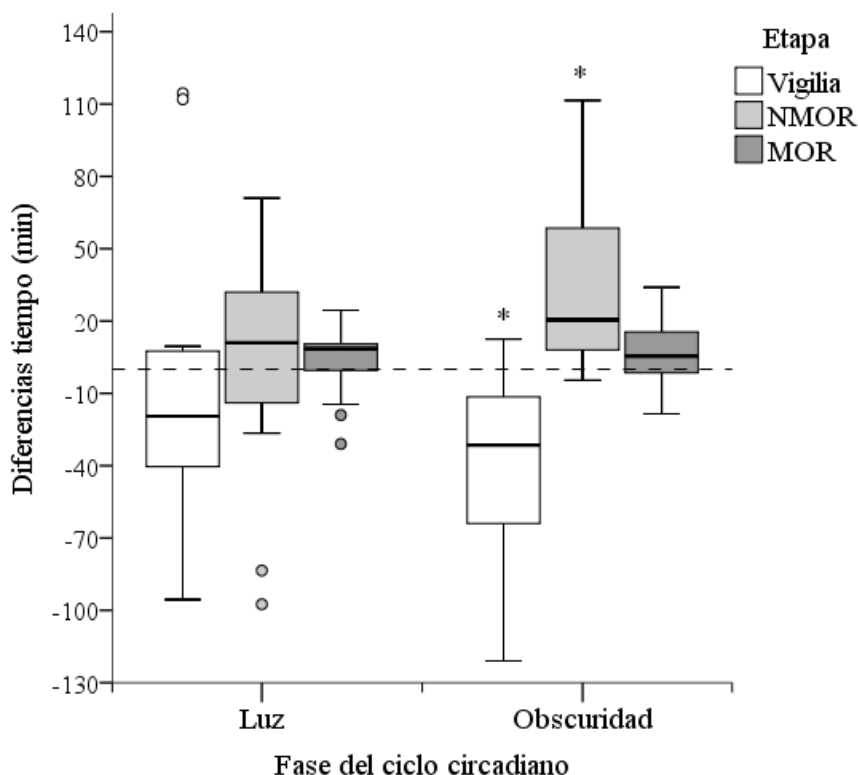


Figura 15. La gráfica muestra las diferencias en minutos en los tiempos transcurridos en cada una de las etapas del ciclo sueño vigilia, antes y después de aplicárseles 12 Gy de radiación holocraneal. Se analizan por separado la fase de luz y la fase de oscuridad. Los asteriscos representan diferencias significativas en los grupos con una $p < 0.05$ (ANOVA de Friedman: vigilia oscuridad $\chi^2(1)= 4.765$ $p=0.03$, NMOR oscuridad $\chi^2(1)=13.25$ $p=0.0001$).

Posteriormente se analizaron por separado los grupos de acuerdo con el tiempo transcurrido tras la irradiación (Fig. 16). Se observó una tendencia a que las diferencias aumenten con el tiempo tras la irradiación y se encontraron diferencias significativas principalmente en el grupo de 60 días tras la irradiación (decremento promedio de vigilia= 49.71 min $p= 0.011$, aumento promedio NMOR= 49.71min $p=.011$) (Fig. 16).

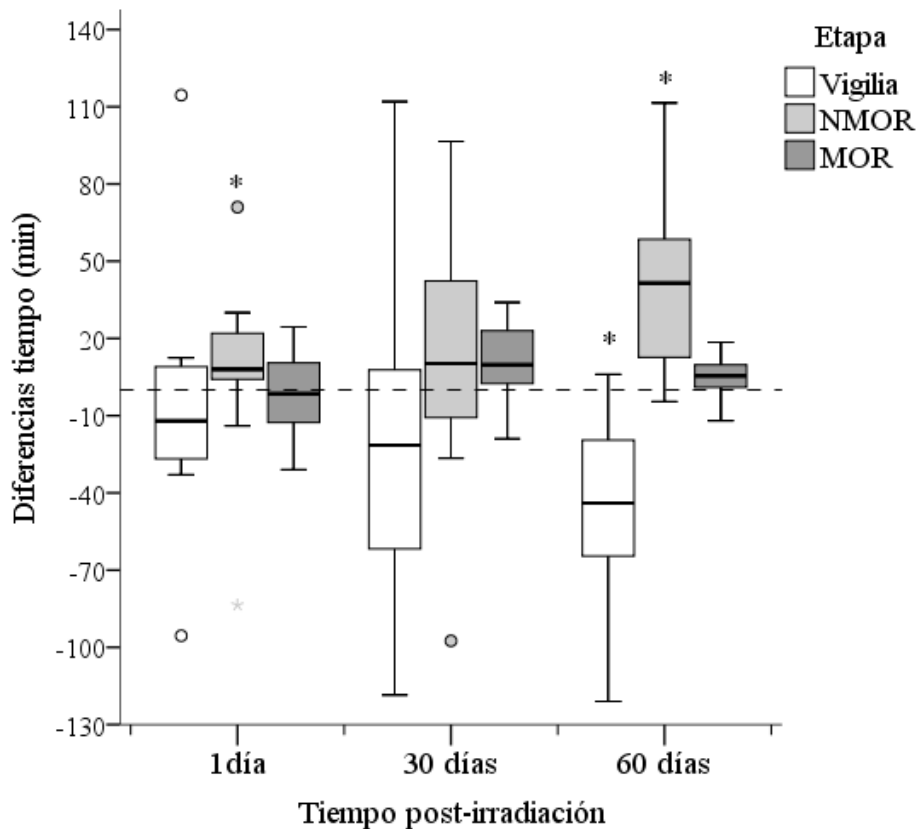


Figura 16. La gráfica muestra las diferencias en minutos en los tiempos transcurridos en cada una de las etapas del ciclo sueño vigilia, antes y después de aplicárseles 12 Gy de radiación holocraneal. El registro post-irradiación de cada rata se comparó a tres tiempos tras la irradiación: 1 día, 30 días, 60 días. Los asteriscos representan diferencias significativas en los grupos con una $p < 0.05$ (ANOVA de Friedman: NMOR 1 día $\chi^2(1)=5.33$ $p=0.021$ vigilia 60 días $\chi^2(1)=6.400$ $p=0.011$, NMOR 60 días $\chi^2(1)=6.4$ $p=0.011$).

Dado que anteriormente se encontró que las diferencias son significativas en la fase de oscuridad se realizó de nuevo el análisis para cada fase esta vez para cada tiempo tras la irradiación (Fig. 17,18). En la fase de luz, donde las ratas control pasan la mayor parte del tiempo dormidas, no se encontraron diferencias tras la irradiación para ningún tiempo tras la radiación (Fig. 17). Sin embargo, se observa una tendencia a incrementar el tiempo de sueño y disminuir el tiempo de vigilia a los 60 días tras la irradiación (Fig 17). En la fase de oscuridad, donde las ratas control pasan la mayor parte del tiempo en vigilia, se encontró que el tiempo trascurrido en sueño NMOR, incluso 1 día tras la irradiación, aumentó (aumento promedio NMOR = 11 min, $p=0.014$) (Fig. 18). El

incremento del tiempo transcurrido en sueño NMOR observado durante la fase de oscuridad 1 día tras la irradiación aumentó con el tiempo, ya que dicho incremento fue aún mayor a los 30 días y 60 días tras la irradiación (Fig 18). Sin embargo este aumento sólo fue estadísticamente significativo a los 30 días tras la irradiación observándose también un decremento significativo en el tiempo de vigilia (aumento promedio NMOR=45.52 $p=0.014$, decremento promedio vigilia = 61.36 $p=0.014$) (Fig. 18). Por lo tanto la radioterapia holocraneal si genera un aumento en el tiempo transcurrido en sueño, mayormente observable durante la fase de oscuridad.

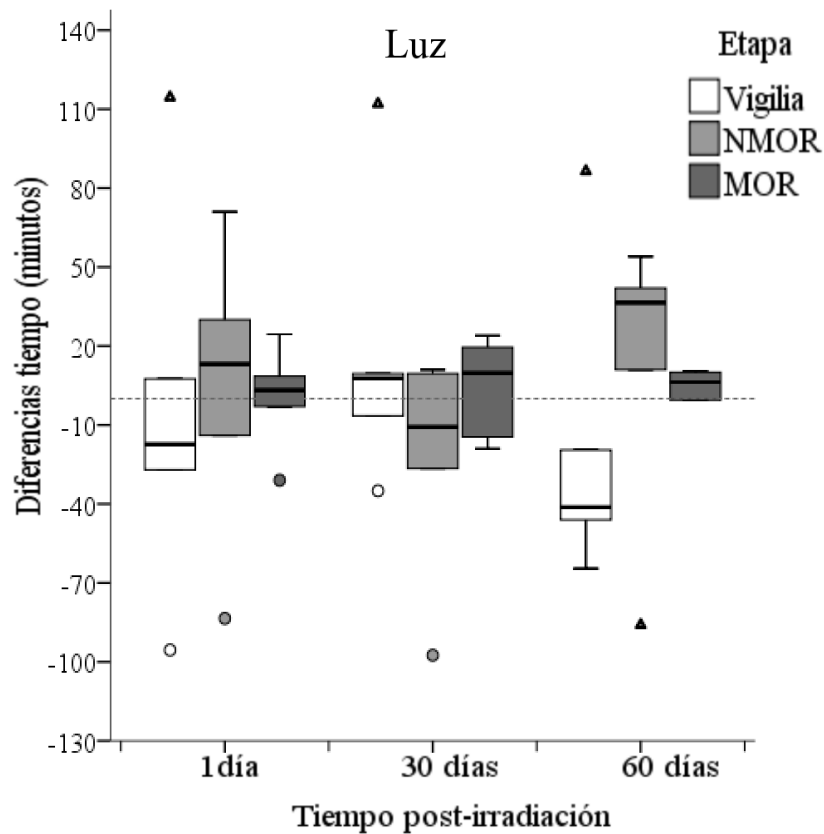


Figura 17. La gráfica muestra las diferencias en minutos en los tiempos transcurridos en cada una de las etapas del ciclo sueño vigilia durante la fase de luz (0700-1900), antes y después de aplicárseles 12 Gy de radiación holocraneal. El registro post-irradiación de cada rata se comparó a tres tiempos tras la irradiación: 1 día, 30 días, 60 días. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos.

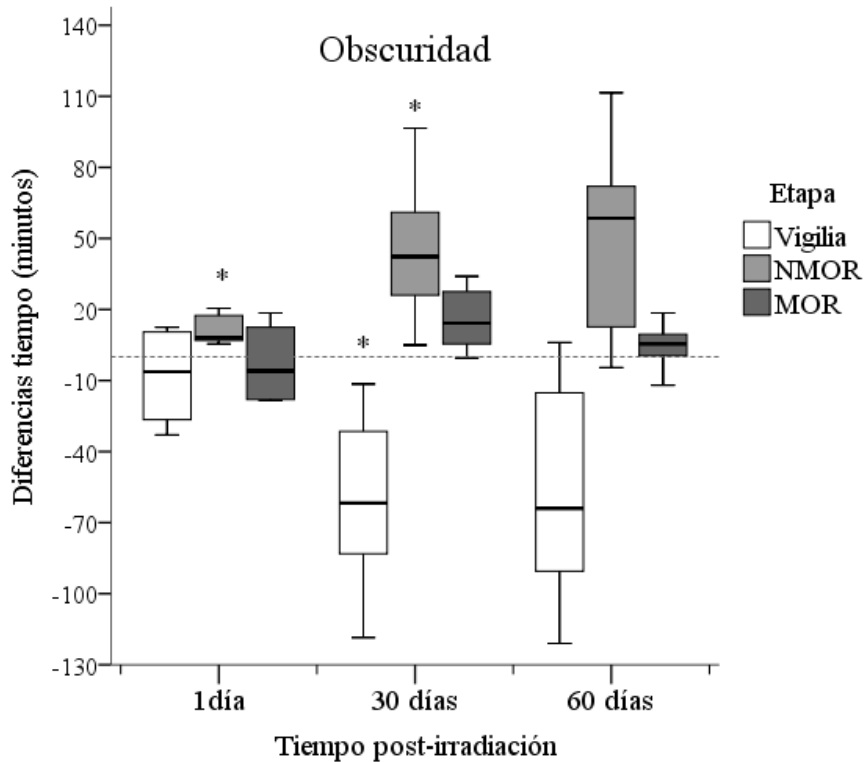


Fig 18. La gráfica muestra las diferencias en minutos en los tiempos transcurridos en cada una de las etapas del ciclo sueño vigilia durante la fase de obscuridad (1900-0700), antes y después de recibir 12 Gy de radiación holocraneal. El registro post-irradiación de cada rata se comparó a tres tiempos tras la irradiación: 1 día, 30 días, 60 días. Se observa que el tiempo de sueño NMOR aumenta para el caso de 1 y 30 días tras la irradiación, siendo mayores dichas diferencias para el caso de 30 días tras la irradiación. Los asteriscos representan diferencias significativas en los grupos con una $p < 0.05$ (ANOVA de Friedman: NMOR 1 día $\chi^2(1)=6.00$ $p=0.014$, vigilia 30 días $\chi^2(1)=6.00$ $p=0.014$, NMOR 30 días $\chi^2(1)=6.00$ $p=0.014$).

Se realizó un análisis de correlación entre el tiempo de cada etapa y el tiempo post-irradiación para la fase de obscuridad. Se encontró un coeficiente de correlación positivo entre el porcentaje de tiempo de sueño NMOR y el tiempo post-irradiación indicando una tendencia a que cuando una variable aumenta la otra aumenta de igual forma, sin embargo, la correlación no fue estadísticamente significativa (coeficiente de correlación de Spearman = 0.411, $p=0.101$). Sin embargo, se encontró un coeficiente de correlación negativo entre el tiempo de vigilia y el tiempo tras la irradiación (coeficiente de correlación de Spearman = -0.450, $p=0.112$), que si fue estadísticamente

significativo indicando que a mayor tiempo tras la irradiación holocraneal más disminuye el tiempo de vigilia durante la fase de oscuridad.

En cuanto al análisis espectral, no se observaron cambios significativos en la potencia relativa al comparar los registros antes y después de la irradiación para la todas las bandas (Figs. 19-21). Únicamente se observó una tendencia a incrementar el porcentaje de ritmo beta durante la etapa de sueño MOR durante la fase de oscuridad ($p=0.063$).

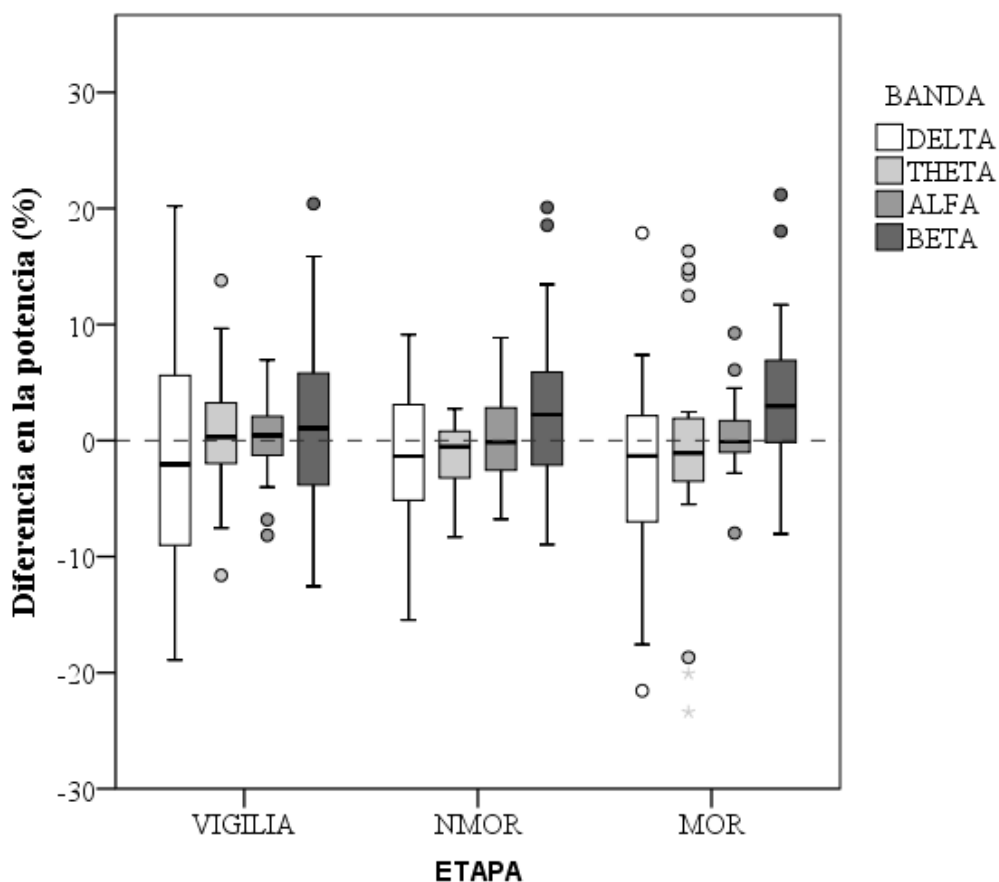


Figura 19. La gráfica muestra las diferencias en potencia relativa antes y después de la irradiación en cuatro bandas: delta (0.5-3.9 Hz) theta (4-7.9 Hz) alfa (8-14.9 Hz) y beta (15-30 Hz) para las tres etapas del ciclo sueño-vigilia (vigilia, sueño NMOR y sueño MOR). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

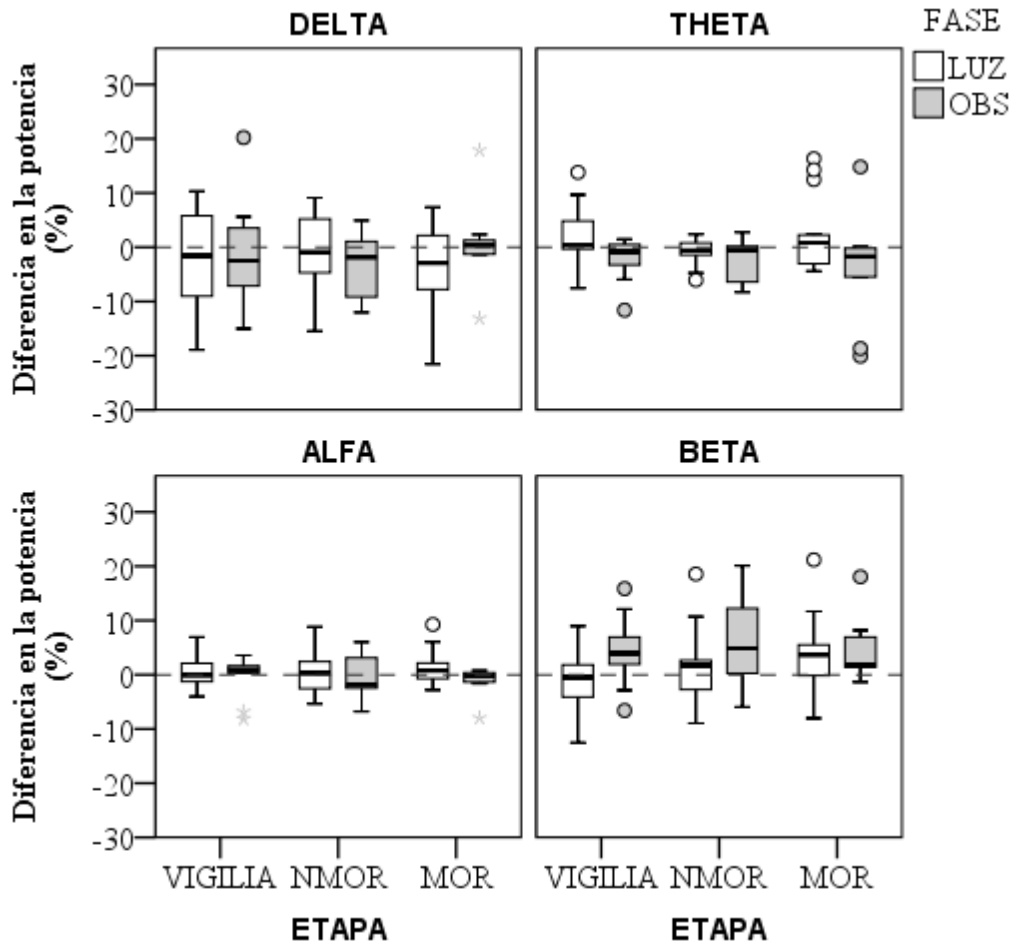


Figura 20. Las gráficas muestran las diferencias en potencia relativa antes y después de la irradiación comparando la fase de luz y la fase de oscuridad, en cuatro bandas: delta (0.5-3.9 Hz) theta (4-7.9 Hz) alfa (8-14.9 Hz) y beta (15-30 Hz) para las tres etapas del ciclo sueño-vigilia (vigilia, sueño NMOR y sueño MOR). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

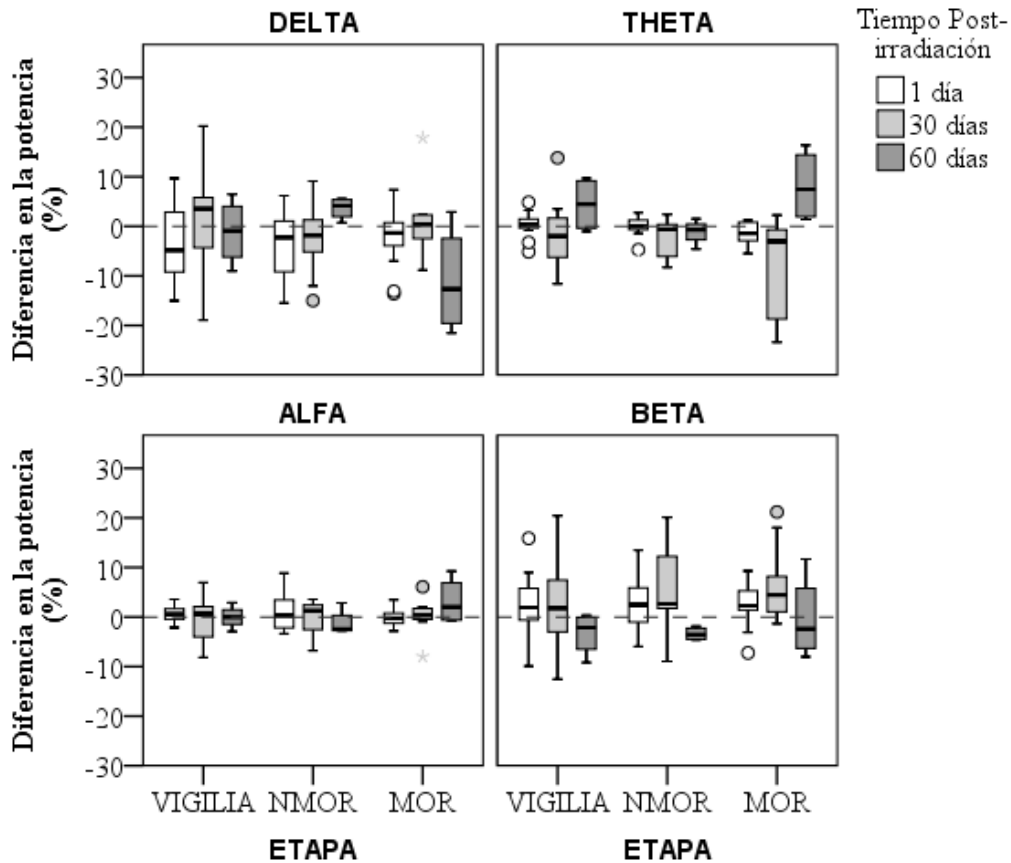


Figura 21. La gráficas muestran las diferencias en potencia relativa antes y después de la irradiación, en cuatro bandas: delta (0.5-3.9 Hz) theta (4-7.9 Hz) alfa (8-14.9 Hz) y beta (15-30 Hz) para las tres etapas del ciclo sueño-vigilia (vigilia, sueño NMOR y sueño MOR). El registro post-irradiación de cada rata se comparó a tres tiempos tras la irradiación: 1 día, 30 días, 60 días No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

10.2.2 Efecto de la radiación a holocraneal en la expresión de IL-1 β y TNF- α

10.2.2.1 ELISA

Como se mencionó con anterioridad, algunas citocinas pro-inflamatorias se han considerado como promotoras de sueño por lo que un aumento en su expresión puede estar asociado con el incremento en el sueño NMOR observado tras la irradiación holocraneal. Se determinó la concentración de IL-1 β y TNF- α a largo plazo empleando los tiempos previamente registrados tras la irradiación (1 día, 30 días y 60 días). Consistentemente con lo esperado se observó un incremento en la concentración de los niveles de proteína de IL-1 β en el hipotálamo a los 30 días y 60 días tras la irradiación.

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el tallo o en la corteza frontal (Fig. 22).

Los resultados encontrados apoyan la hipótesis del papel que tienen las citocinas pro-inflamatorias en el aumento del sueño NMOR tras la irradiación holocraneal. En estudios previos se ha observado que la inyección intraventricular de IL-1 β aumenta el sueño NMOR y los mecanismos reguladores del sueño en los que esta citocina interviene se cree que tienen lugar en el área preóptica del hipotálamo, en el cerebro basal anterior y el núcleo dorsal del rafe. Es aquí donde se cree que inicia una cascada de respuestas bioquímicas que incluyen la expresión del factor nuclear de transcripción κ B (NF- κ B), iNOS, hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), prostaglandina D2 (PGD₂) y receptores de adenosina entre otros (Obal et al.,2003). Nuestros resultados sugieren que al ser mayores las concentraciones de IL-1 β en el hipotálamo es probable que cerca de esta región esta citocina desempeñe una acción promotora de sueño (Fig. 22).

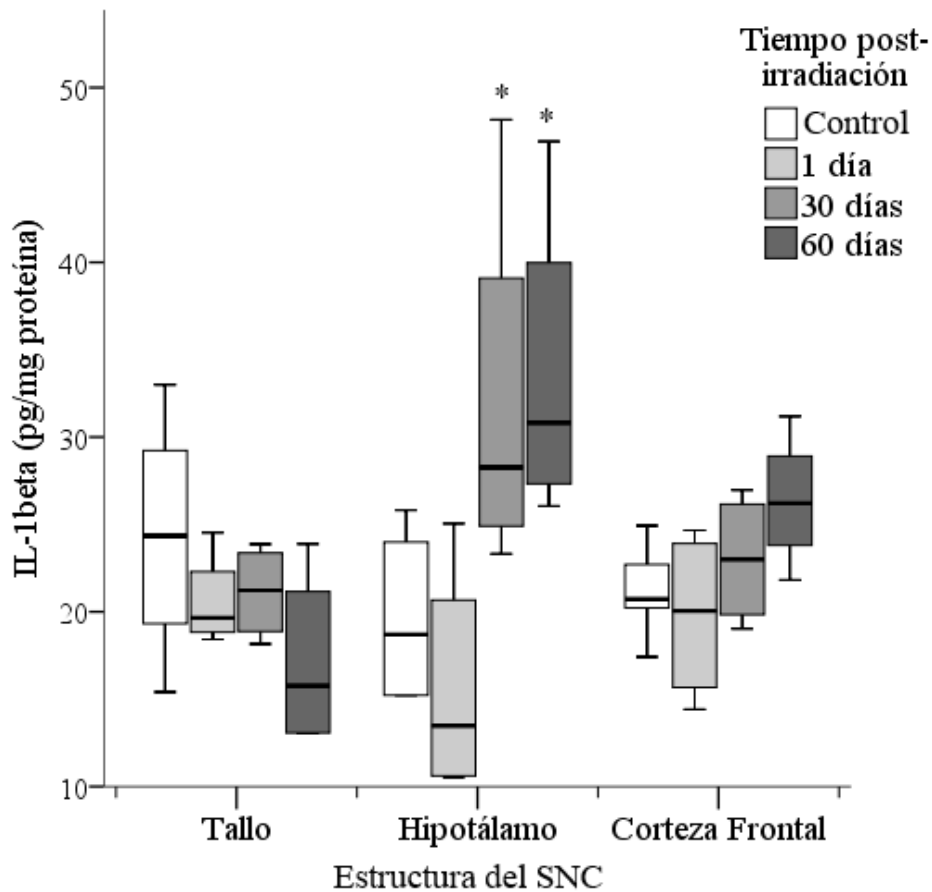


Fig 22. La gráfica muestra las concentraciones de IL-1 β (pg/mg de proteína) por separado tres estructuras del sistema nervioso central: tallo (bulbo y puente), hipotálamo y corteza frontal. Se muestran las concentraciones a tres tiempos tras la irradiación: 1 día, 30 días y 60 días. Se observa que a los 30 y 60 días tras la irradiación existe un incremento en la concentración de IL-1 β en hipotálamo. Los asteriscos representan diferencias significativas en los grupos con una $p < 0.05$ (Kruskal Wallis: $\chi^2(3) = 10.213$, $p = 0.017$, post-hoc U Mann-Whitney respecto a Controles para IL-1 β Hipotálamo 30 días $W(1) = 11$ $p = 0.043$ y 60 días $W(1) = 10.021$ $p = 0.021$)

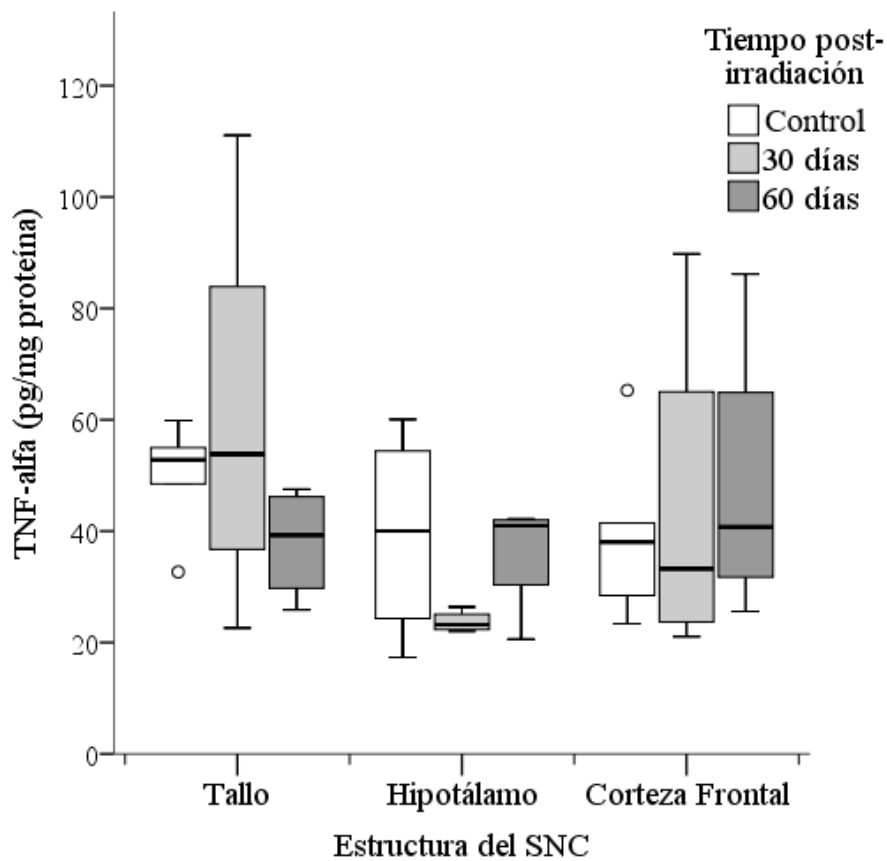


Figura 23. La gráfica muestra las concentraciones de TNF- α (pg/mg) por separado tres estructuras: tallo (bulbo y puente), hipotálamo y corteza frontal) Se muestran las concentraciones a dos tiempos tras la irradiación: 30 días y 60 días. No se encontraron diferencias significativas tras la irradiación para ninguno de los grupos.

Para el caso del TNF- α no se encontraron diferencias significativas tras la irradiación para ninguno de los grupos evaluados (Fig. 23). Cabe mencionar que se encontraron dispersiones muy altas en algunos grupos.

10.2.2.2 Inmunohistoquímica

Se observó que la inmunoreactividad de la IL-1 β en las fotografías de la región preóptica media del hipotálamo incrementó a los 30 días tras la irradiación (Fig. 24C). Un menor incremento se observó en dicha región 1 día y 60 días tras la irradiación (Fig. 24B,D).

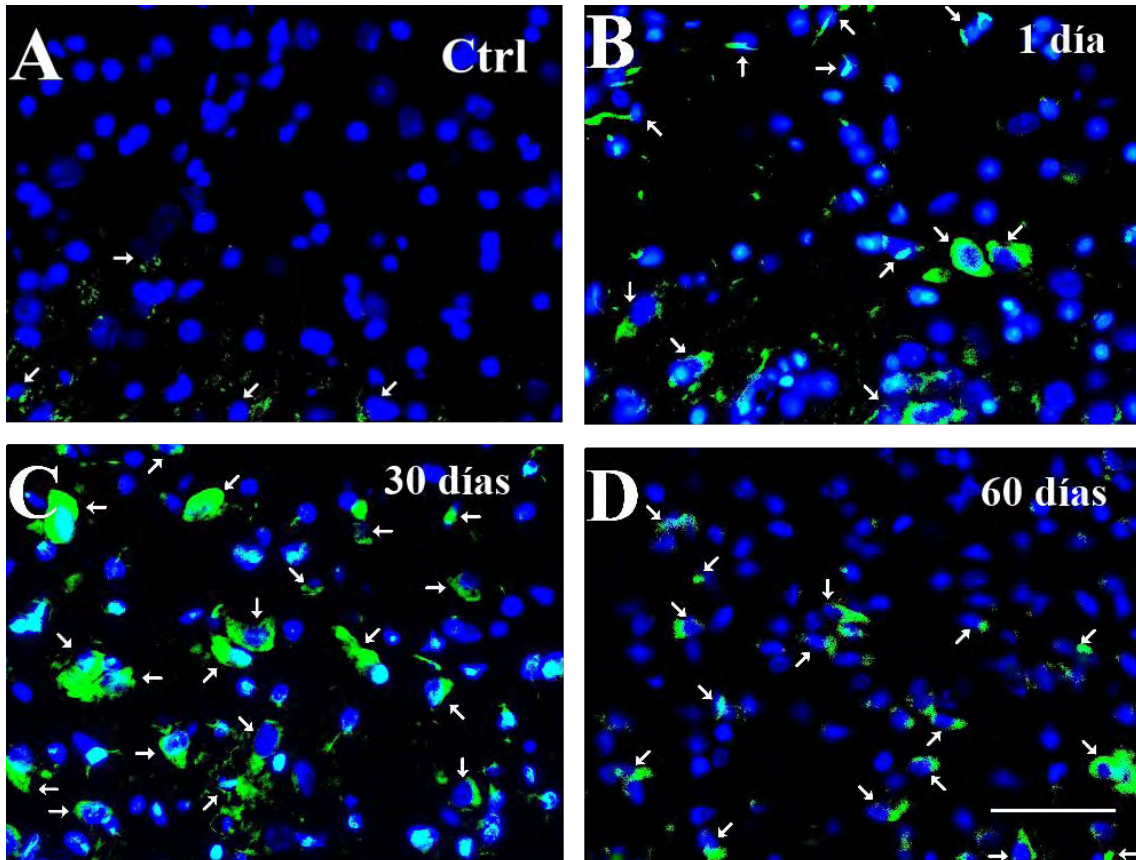


Figura 24. Inmunoreactividad a IL-1 β (verde) y tinción DAPI (azul) en el región preóptica media del hipotálamo después de: (A) pseudo-irradiación (control) y a tres tiempos tras irradiación holocraneal con 12 Gy (B,C,D). Las imágenes fueron capturadas a 40X. La barra representa 100 μ m. Las flechas indican señal positiva alrededor de los núcleos.

En la gráfica se observa el porcentaje de señal positiva promedio observado en todas las ratas y se encontró de igual forma una mayor señal a los 30 días tras la irradiación (Fig. 25).

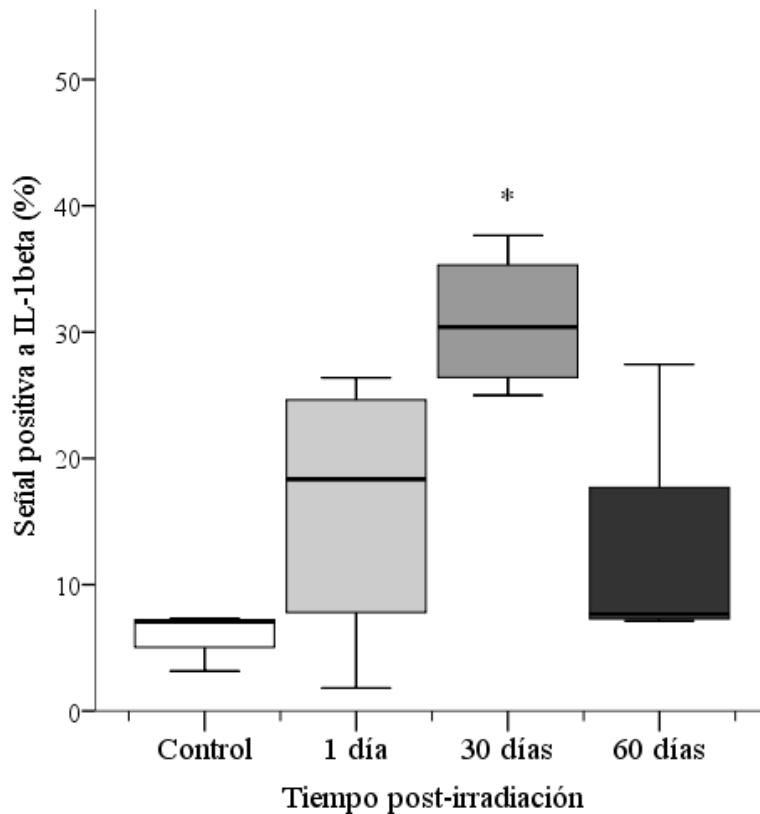


Figura 25. Porcentajes de señal positiva de la IL-1 β después de irradiación Sham o a tres tiempos tras la irradiación holocraneal con 12 Gy. Los asteriscos representan diferencias significativas en los grupos con una $p < 0.05$ (Kruskal Wallis: $\chi^2(3) = 9.196$, $p = 0.27$, post-hoc U Mann-Whitney con corrección Bonferroni para control vs. 30 días $W(1) = -10.124$, $p = 0.016$).

En la figura 26 se puede observar que no se encontraron cambios estadísticamente significativos en el número de núcleos (que incluye tanto neuronas como glia) por campo para los tres tiempos tras la irradiación por lo que el número promedio de células en la región evaluada se mantuvo constante.

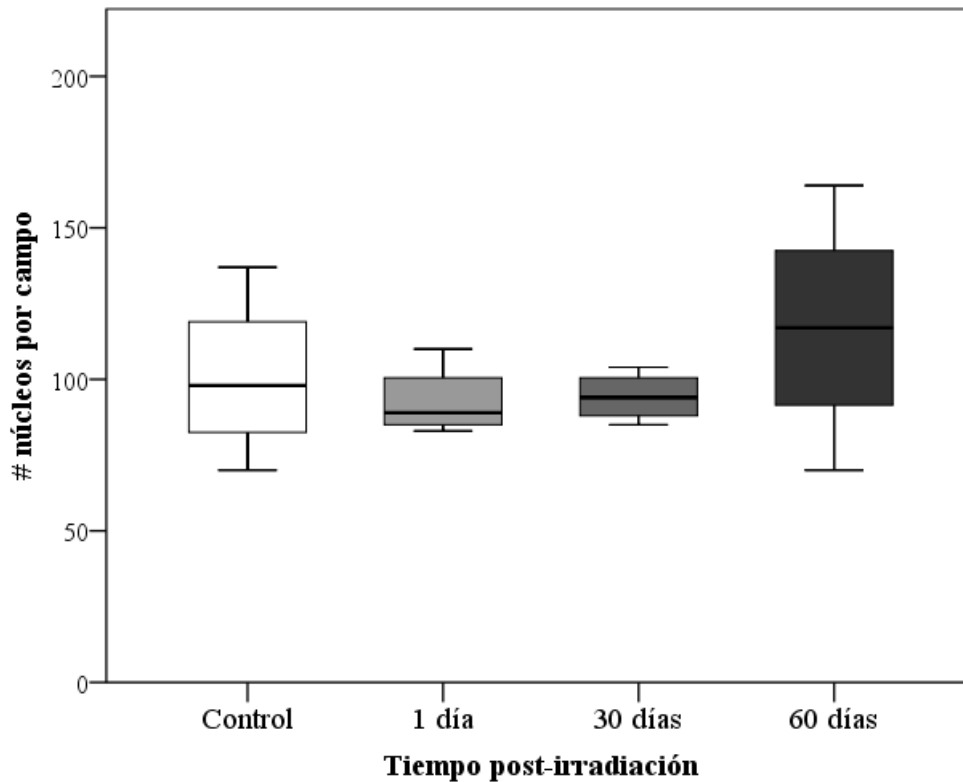


Figura 26. Número de núcleos celulares por campo (40x) observables después de la pseudo-irradiación o a tres tiempos tras la irradiación holocraneal con 12 Gy.

Dado que las mismas ratas de este análisis inmunohistológico fueron las que se analizaron electrográficamente previamente un análisis de correlación entre el tiempo de sueño NMOR y el porcentaje medido de señal positiva de IL-1 β en cada caso. Se encontró un coeficiente de correlación positivo entre el porcentaje de señal positiva de IL-1 β y el tiempo de sueño NMOR, indicando una tendencia a que cuando una variable aumenta la otra aumenta de igual forma, sin embargo, la correlación no fue estadísticamente significativa (coeficiente de correlación de Spearman = 0.467, $p=0.103$). De manera equivalente, se encontró un coeficiente de correlación negativo entre la señal positiva de IL-1 β y el tiempo de vigilia (coeficiente de correlación de Spearman = -0.450, $p=0.112$) aunque tampoco fue estadísticamente significativo.

Aunque no era el objetivo de este trabajo, cabe mencionar que se encontró señal positiva a IL-1 β en el hipocampo a los tres tiempos tras la irradiación como ya se había reportado con anterioridad (Hall,2000; Monje et al.,2002; Lee et al.,2010b).

XI DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

11.1 LA IRRADIACIÓN AUMENTA EL TIEMPO DE SUEÑO

En esta tesis se encontró que la irradiación holocraneal (12 Gy) genera un incremento en el tiempo que las ratas duermen durante la fase de oscuridad o fase activa. Esto es consistente con reportes previos de pacientes tratados con radioterapia holocraneal, pero el efecto pudo evaluarse en un modelo libre de otras variables como lo son la enfermedad preexistente o el tratamiento con medicamentos. En este trabajo el tiempo total de sueño se incrementó después de la irradiación holocraneal durante la fase de oscuridad que es la fase de mayor actividad de la rata (sección 10.2.1, Fig. 15). Esto también es consistente con lo reportado en pacientes, en los cuales se observó mayor somnolencia durante el día (fase de mayor actividad) (Ryan,2000). Los resultados de esta tesis muestran mayores cambios en el sueño a los 30 días tras la irradiación. Esto es consistente con los síntomas observados en pacientes, que se han reportado aproximadamente después de 4 semanas tras la irradiación (Freeman et al.,1973; Ballesteros-Zebadua et al.,2012). En los pacientes se reportan cambios en los patrones de sueño tras la radioterapia holocraneal, que van desde somnolencia ligera hasta periodos muy prolongados de sueño (hasta 20 horas al día) (Freeman et al.,1973). Sin embargo, cabe mencionar que en este modelo de rata se observó únicamente un incremento relativamente pequeño en el tiempo de sueño que no fue mayor a una hora.

11.2 LA IRRADIACIÓN AUMENTA LA EXPRESIÓN DE IL-1 β EN EL HIPOTÁLAMO

En el cerebro normal, la expresión basal de la proteína IL-1 β es baja y ha sido descrita en el hipocampo, tubérculo olfatorio y en el hipotálamo (Breder et al.,1988; Lechan et al.,1990). La IL-1 β puede ser expresada por astrocitos y microglía, pero también por neuronas (Acarin et al.,2000; Safieh-Garabedian et al.,2004). Adicionalmente, las células endoteliales y los macrófagos perivasculares pueden contribuir a su producción en el sistema nervioso central (Garabedian et al.,2000).

La inducción de IL-1 β ha sido ampliamente reportada tras muy diferentes formas de daño cerebral (Acarin et al.,2000). Se ha observado además un incremento en su expresión en diversas condiciones neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple (Hopkins et al.,1995). Las citocinas proinflamatorias como la IL-1 β son responsables de la llamada “conducta de la enfermedad” descrita durante la fase aguda de la infección, en la que los pacientes muestran alteraciones de conducta similares a las reportadas después de la radioterapia holocraneal, incluyendo letargo, anorexia, debilidad, patrones alterados del ciclo sueño-vigilia, etc. (Dantzer et al.,2007). Después de la radioterapia holocraneal, los pacientes que han recibido esteroides anti-inflamatorios mostraron una reducción en los síntomas del SSR, lo cual apoya la teoría de que la inflamación puede estar relacionada con la etiología de dicho síndrome (Uzal et al.,1998). En modelos animales de neuroinflamación conocidos, como el modelo de inflamación por inyección intraperitoneal de lipopolisacárido (LPS) (1mg/Kg), se han reportado incrementos de magnitud similar al encontrado en este trabajo en la expresión proteica de la IL-1 β en el hipotálamo (Nguyen et al.,1998), lo cual también indica la presencia de una respuesta inflamatoria tras la irradiación.

De acuerdo con los resultados encontrados, la expresión de la proteína IL-1 β tras la irradiación no es la misma en las diferentes regiones cerebrales analizadas. De manera similar, otros modelos como el de Parkinson, han mostrado un aumento significativo en la expresión de IL-1 β en el hipotálamo y no así en la corteza o el estriado, corroborando que esta estructura es relevante en los procesos inflamatorios y en la respuesta al daño cerebral, ya que participa en las alteraciones conductuales y neuroendocrinas asociadas como lo son las alteraciones del ciclo sueño-vigilia (Yi et al.,2007). De manera paralela, en pacientes con esclerosis múltiple se han encontrado diferencias en la expresión hipotalámica de IL-1 β respecto a sujetos control (Huitinga et al.,2000). El modelo de inflamación por inyección intraperitoneal de LPS mostró que el incremento en la expresión de IL-1 β fue mayor en el hipotálamo que el observado en la corteza y en el hipocampo (Nguyen et al.,1998). En modelos de irradiación también se han reportado diferencias regionales en la expresión de IL-1 β , y aunque hasta ahora no se había medido en el hipotálamo, se han reportado incrementos en los niveles de citocinas pro-inflamatorias, incluyendo la IL-1 β , entre las 4 y 24h tras la exposición a la irradiación holocraneal (Lee et al.,2010b), encontrándose una mayor expresión de IL-1 β en el hipocampo que en la corteza. En la presente tesis, sin embargo, también se midió la expresión de IL-1 β en la corteza y no se encontraron diferencias en la expresión cortical de la proteína a los 1, 30 o 60 días tras la irradiación. Esta aparente contradicción puede estar asociada al diseño experimental empleado en este trabajo. Las comparaciones realizadas fueron tomando como referencia el grupo de ratas control, las cuales habían pasado por la cirugía para la colocación de electrodos necesarios para el registro electrográfico, lo cual puede generar diferencias en la expresión basal de IL-1 β así como en las comparaciones subsecuentes. De igual modo, si se comparan los valores previamente reportados, medidos en el hipotálamo de ratas control no operadas,

mediante ELISA, los valores de expresión de IL-1 β medidos en este trabajo, son ligeramente más elevados (Nguyen et al.,1998).

El incremento en la IL-1 β medido en el hipotálamo mediante ELISA fue corroborado con los resultados observados en el análisis por inmunohistóquímica. Se ha sugerido que en condiciones basales la IL-1 β expresada en el hipotálamo es principalmente de origen neuronal (Tringali et al.,1996). Sin embargo en los resultados obtenidos no se puede diferenciar el tipo celular que expresa la IL-1 β , por lo que futuros estudios con doble-marcaje son necesarios.

Además de ser pro-inflamatoria, la IL-1 β , al igual que otras citocinas, ha sido descrita como una sustancia reguladora de sueño, ya que es capaz de promover la generación de sueño NMOR (Imeri et al.,2009; Clinton et al.,2011; Ballesteros-Zebadua et al.,2012). Por ejemplo en diversas especies, la inyección central o sistémica de IL-1 β o TNF- α aumenta la duración del sueño NMOR (Shoham et al.,1987). En contraste la inhibición tanto de la IL-1 β como del TNF- α resulta en una pérdida de sueño (Krueger et al.,2001). Adicionalmente cuando los receptores para citocinas son inhibidos por bloqueadores, antagonistas, receptores solubles o mediante modelos genéticos, la duración del sueño se ve reducida (Fang et al.,1998; Krueger et al.,2003). También se sabe que pacientes bajo algún reto de tipo inmunológico tienen alteradas las concentraciones de citocinas tanto en la periferia como en el encéfalo cual correlaciona con cambios en el ciclo sueño-vigilia (Moldofsky,1994). Adicionalmente la privación de sueño ha mostrado alterar la respuesta inmune modificando la respuesta a antígenos y la efectividad de las vacunas (Spiegel et al.,2002). Por ejemplo, endotoxinas como el LPS que como ya se mencionó pueden aumentar la expresión de IL-1 β en el hipotálamo, también aumentan el sueño NMOR (Krueger,1990). Se cree que el incremento del sueño NMOR durante la infección facilita la inducción de fiebre, ya que limita la

locomoción, facilitando el temblor y permitiendo la conservación de energía necesaria para el incremento de la temperatura(Imeri et al.,2009). Cabe mencionar que, aunque muy diversas citocinas han mostrado un efecto en el ciclo sueño-vigilia, la IL-1 β y el TNF- α son consideradas como moléculas reguladoras del sueño, ya que han mostrado un patrón circadiano que presenta picos asociados con los periodos de sueño fisiológico (Churchill et al.,2008; Hight et al.,2010). De igual forma, como se comentará más adelante, los receptores han mostrado variaciones circadianas (Beynon et al.,2010).

Los mecanismos por los cuales las citocinas participan en procesos normales de sueño aun no son del todo claros aún. Se ha postulado que en condiciones normales, la liberación de citocinas es estimulada por la acumulación de ATP asociado con la actividad neuronal (Krueger,2008). Otros estudios han reportado una interacción entre la IL-1 β y los sistemas serotoninérgicos y gabaérgicos (Imeri et al.,2009). El aumento de sueño NMOR debido a la IL-1 β se ha relacionado con su acción en regiones promotoras de sueño (como la región preóptica del hipotálamo y el cerebro anterior basal) dónde esta molécula puede iniciar una cascada bioquímica que incluye la expresión de NF- κ B, iNOS, GHRH, PGD2 y receptores de adenosina entre otros (Krueger,2008).

Por otro lado es bien sabido que las neuronas GABAérgicas del área preóptica del hipotálamo disparan la inducción y mantenimiento del sueño NMOR (McGinty et al.,2001; Szymusiak et al.,2008). La IL-1 β también ha mostrado aumentar el sueño NMOR mediante la activación del núcleo preóptico medio del hipotálamo (Alam et al.,2004; Baker et al.,2005), aparentemente mediante la inducción de hiperpolarización y fomentando la liberación presináptica de GABA (Tabarean et al.,2006; Brambilla et al.,2007). Esto indica que el aumento observado en el sueño NMOR puede estar directamente correlacionado con los niveles elevados de IL-1 β encontrados en la región

preóptica del hipotálamo. Adicionalmente la IL-1 β ha mostrado ser capaz de inhibir el sueño MOR cuando se inyecta en el núcleo laterodorsal tegmental del tallo cerebral (Brambilla et al.,2010). Sin embargo, este trabajo no se observaron cambios en el sueño MOR tras la irradiación, como se esperaría, y esto pudiera estar relacionado con que consistentemente no se encontraron cambios en la expresión proteica de la IL-1 β en el tallo cerebral con el protocolo empleado.

Como ya se mencionó, el TNF- α también ha sido previamente descrito como una molécula inductora de sueño (Shoham et al.,1987; Churchill et al.,2008) y pese a que no se encontraron diferencias en esta tesis, también se ha reportado su presencia a las pocas horas tras la exposición del sistema nervioso central a radiación ionizante tanto *in vitro*, como *in vivo* (para más detalles revisar (Ballesteros-Zebadua et al.,2012). De hecho un trabajo reporta un aumento en el ARNm TNF- α después de la exposición holocraneal de ratas a una dosis de 25 Gy, dos meses tras la irradiación e incluso hasta 6 meses después (Chiang et al.,1997). Por el contrario, en las estructuras evaluadas en esta tesis no se encontró una variación en la expresión de la proteína ni a los 30 ni a los 60 días tras la radiación. Estas diferencias entre los resultados pueden deberse a las variaciones en el diseño experimental como lo son la dosis aplicada (en esta tesis se aplicó una menor dosis), la región evaluada (en esta tesis se evaluaron regiones separadas y no un homogenizado de todo el encéfalo) o las variaciones en el estado basal debido a la cirugía de implantación de electrodos, como ya se comentó con anterioridad. Sería necesario evaluar en un futuro la expresión del TNF- α en otras estructuras cerebrales, para determinar si alguna otra estructura está contribuyendo al incremento en la expresión del TNF- α reportado.

11.3 LA IRRADIACIÓN GENERA UNA RESPUESTA TARDÍA

Se sabe que la radiación ionizante genera radicales libres entre ellos especies reactivas de oxígeno que al ser detectados por la célula pueden generar que enzimas antioxidantes como la tioredoxina que sobre-expresen en el núcleo celular y éstas a su vez promuevan la sobre-expresión de la unión del NF- κ B con el ADN del núcleo (Hirota et al.,1999; Kabe et al.,2005). Dado que el factor de transcripción NF- κ B está directamente relacionado con la respuesta pro-inflamatoria y la transcripción de citocinas como la IL-1 β , éste podría ser un mecanismo de como la radiación produce inflamación. Sin embargo, los radicales libres son de vida corta y este mecanismo de respuesta antioxidante no alcanza a explicar el porqué de la respuesta inflamatoria a largo plazo. Por otro lado la activación de la microglia como producto de la radiación junto con otras células de respuesta inmune que se pueden infiltrar al cerebro, las cuales pueden generar especies de oxígeno y mantener un estado de estrés oxidativo.

Sin embargo, aún se requiere de nuevos trabajos para explicar la evolución temporal y la persistencia de ciertos efectos de la radiación ionizante. La mayoría de los trabajos publicados sobre inflamación tras la irradiación tienen un seguimiento máximo de un día les (para más detalles revisar Ballesteros-Zebadua et al.,2012). Sólo existe un estudio que investiga el perfil pro-inflamatorio varios meses tras la irradiación, analizando tejido de todo el hemisferio cerebral; sin embargo no se reportaron cambios en la expresión del ARNm para IL-1 β para 1, 2 y aún 6 meses tras la irradiación (Chiang et al.,1997). Por el contrario, en los resultados de esta tesis se encontró que la expresión proteica de IL-1 β aumentó en el hipotálamo a los 30 y 60 días tras la irradiación; indicando que esta región cerebral reguladora del ciclo sueño-vigilia muestra una respuesta tardía tras la irradiación. Los cambios en el sueño también se observaron más claramente varias semanas tras la irradiación. El retraso en la respuesta

inflamatoria como se mencionó con anterioridad puede estar asociado a una activación de la microglía la cual es capaz de secretar IL-1 β y contribuye mayormente a un estado crónico inflamatorio del cerebro (Monje et al.,2003; Joo et al.,2012). Así mismo, la activación persistente de la microglía se ha reportado en el cerebro de ratas tras la irradiación cerebral (Conner et al.,2010).

Por otro lado, existen otras propuestas para explicar el retraso en los efectos de la radiación. Una de ellas es la que propone como explicación el daño vascular generado por la radiación en el tejido cerebral (Greene-Schloesser et al.,2012b). El endotelio vascular es altamente proliferativo y la radiación puede generar daño en el tejido vascular y éste a su vez puede generar isquemia y desmielinización del tejido cerebral. También se han observado cambios en las metaloproteinasas (MP-2), y en el colágeno tipo IV y la subsecuente disrupción de la barrera hematoencefálica tras la irradiación (Greene-Schloesser et al.,2012b). Sin embargo, otros autores han reportado daño a largo plazo (necrosis) en ausencia de daño vascular (Schultheiss et al.,1992a) por lo que parece que la hipótesis vascular no es suficiente para explicar el daño tardío. Una propuesta adicional es que el daño tardío por radiación se debe a la muerte de los precursores de oligodendrocitos (O-2A) lo cual impide remplazar los oligodendrocitos perdidos y puede generar desmielinización a largo plazo (van der Kogel,1986). Sin embargo, pese a que el daño en esta población celular se observa tras dosis bajas (≥ 3 Gy) 24 horas tras la irradiación, la desmielinización no se ha encontrado después de estas dosis incluso 12 meses después, por lo que la relación entre la pérdida de oligodendrocitos y los efectos tardíos aún es incierta (Greene-Schloesser et al.,2012b). Dado que ninguno de estos efectos es capaz de explicar por si solo los efectos tardíos de la radiación la tendencia actual es a considerar que son un producto la interacción compleja de diferentes respuestas previamente descritas y los diversos grupos celulares

involucrados (Tofilon et al.,2000), pero aún se requiere caracterizar las diferentes respuestas para poder entender mejor el fenómeno.

Aunque los síntomas del SSR pueden ser graves, se consideran benignos ya que se resuelven con el tiempo, sin embargo, pueden ser un indicador de otras secuelas más graves inducidas por la radiación. Se ha propuesto que el SSR puede ser un indicador clínico capaz de predecir el déficit cognitivo inducido por radiación en pacientes tratados con radioterapia holocraneal, aunque esto no ha sido del todo demostrado (Uzal et al.,1998). Adicionalmente dado que el SSR puede estar asociado con la producción de citocinas como la IL-1 β , dicho síndrome puede ser un indicador de diversos procesos pro-inflamatorios que están ocurriendo tras la irradiación y que son capaces de producir daño a largo plazo (Tofilon et al.,2000). Por otro lado, pese a que la inflamación tiene un papel significativo en enfermedades del sistema nervioso central, también se sabe que las citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β tienen efectos neuroprotectores que promueven la sobrevivencia neuronal y la diferenciación pueden ser cruciales para la reparación del daño inducido por radiación (Morganti-Kossmann et al.,1997). Aún se necesitan más estudios para determinar una posible relación entre el SSR y otras secuelas tras la irradiación (como el déficit cognitivo reportado en pacientes).

Los resultados de ELISA mostraron que el incremento en la expresión de IL-1 β en el hipotálamo completo se observa hasta los 60 días tras la irradiación. Sin embargo, el análisis microscópico de la región preóptica medial del hipotálamo mostró que la expresión se reduce en dicha región en comparación con el grupo de 30 días tras la irradiación. Esto puede explicar porque en este trabajo se observa una tendencia en el tiempo de sueño a incrementarse sin ser estadísticamente significativa. Se podría suponer que la inflamación en el área preóptica está regresando a los niveles normales, pero aún se necesitan experimentos adicionales que exploren esta posibilidad.

11.4 LA IRRADIACIÓN INCREMENTA EL SUEÑO DURANTE LA FASE DE OBSCURIDAD

Las diferencias en el sueño tras la irradiación fueron distinguibles durante la fase de oscuridad. Las ratas son más activas durante esta fase, por lo que las diferencias pueden ser más notorias durante esta fase; sin embargo nuestros resultados también pueden estar relacionados con la influencia circadiana en la respuesta inmunológica (Coogan et al.,2008). Se ha reportado una variación diurna en los niveles normales de IL-1 β en el cerebro, observándose niveles más altos en el hipotálamo de IL-1 β durante el periodo de luz que corresponde al periodo de mayor cantidad de sueño NMOR fisiológico (Taishi et al.,1997). Adicionalmente, existe una variación diurna en el receptor de IL-1 β en el cerebro observándose una mayor expresión del mismo al inicio de la fase de oscuridad (Hight et al.,2010; Taishi et al.,2012). Por lo tanto esta regulación circadiana puede explicar por qué los posibles efectos de la IL-1 β en el sueño se observan en la fase de oscuridad. De manera consistente, aunque inversa a los resultados de este trabajo, se ha reportado una reducción ligera pero estadísticamente significativa en el tiempo de sueño NMOR (de 299.13 a 260.81 min) en ratones carentes del gen para el receptor de IL-1R1 únicamente durante la fase de oscuridad en comparación con controles (Fang et al.,1998).

11.5 EFECTIVIDAD DE LA TÉCNICA DE IRRADIACIÓN HOLOCRAREAL EN RATAS

Para esta tesis, se diseñó y verificó la utilidad de una técnica de irradiación holocraneal empleando un acelerador lineal para irradiar ratas a cráneo total. Se encontró que técnica fue útil y adecuada en la evaluación de los efectos biológicos de esta modalidad de radioterapia. Las variaciones en la dosis calculada y la dosis depositada fueron menores al 5% (tolerancia empleada en los tratamientos de pacientes). Por otra parte, las mayores variaciones en dosis se encontraron cerca de la superficie del blanco de tratamiento, correspondiendo a la dosis depositada en la piel y en el cráneo, dónde no se evaluaron los efectos de la radiación en este proyecto.

El modelo de irradiación a cráneo total en rata reproduce parcialmente los cambios observados en pacientes y puede ser un modelo útil para futuros estudios sobre el SSR y su etiología. Pese a que los resultados *in vivo* observados en ratas no se pueden extrapolar directamente a humanos y pese a que la limitante de que una sola dosis de radiación raramente se usa en humano, de acuerdo con el cálculo de la dosis biológicamente efectiva (BED), la dosis elegida de radiación (12 Gy) es casi equivalente a los 30 Gy que se usan en pacientes aplicados en 10 fracciones por dos semanas (Murray et al.,1997). De manera similar otros autores han sugerido aproximaciones similares (Monje et al.,2002). Sin embargo, es recomendable extender este trabajo a esquemas de irradiación *in vivo* fraccionados.

Aunque se aplicó anestesia tanto las ratas control como a las ratas irradiadas, una limitación de este modelo es el hecho de que las ratas deben estar anestesiadas a lo largo del proceso de irradiación. La mayor parte de los anestésicos generales, incluyendo la ketamina, han mostrado atenuar la respuesta inflamatoria inducida por lipopolisacárido (LPS) reduciendo los niveles de citocinas en diversos modelos animales (Fuentes et

al.,2006), lo que sugiere que los anestésicos comparten un mecanismo de atenuación de la respuesta inflamatoria. Específicamente la ketamina ha mostrado reducir la expresión de citocinas inducida por LPS en la corteza prefrontal de la rata (Yang et al.,2013). Aunque no existen reportes de los efectos protectores de la anestesia durante la irradiación, pueden esperarse efectos anti-inflamatorios similares. A pesar de ello, en este trabajo se encontró una respuesta tras la irradiación, pero es probable que esta respuesta sea la observable sin anestesia. En pacientes la anestesia general no es comúnmente empleada durante la radioterapia holocraneal, por lo que la respuesta inflamatoria puede ser mayor debido a que los efectos protectores de la anestesia están ausentes, sin embargo, esto no ha sido medido en pacientes. En un futuro, sería relevante medir el efecto que tienen otros anestésicos y diferentes antagonistas al receptor a glutamato en la respuesta inflamatoria tras la irradiación.

11.6 CONCLUSIONES

De los resultados de esta tesis se puede concluir que la radiación ionizante es capaz de aumentar el sueño NMOR cuando se aplica al tejido cerebral normal. También podemos concluir que la radiación ionizante en el tejido cerebral normal aumenta la expresión de IL-1 β en el hipotálamo.

En cuanto a los mecanismos asociados al incremento observado en el sueño, podemos construir una hipótesis teórica en base a los resultados:

La radiación que incide sobre el sistema nervioso central genera radicales libres e inicia una respuesta inflamatoria. La dosis de radiación empleada puede producir daño principalmente en las células progenitoras y células endoteliales, lo cual a su vez puede afectar tanto la neurogénesis como la integridad de la barrera hematoencefálica. El daño generado por la radiación

puede subsecuentemente generar la activación de la microglia y los astrocitos lo cual puede llegar a generar astrogliosis. Todos estos eventos pueden estimular la expresión de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β en el hipotálamo. En esta región la IL-1 β es capaz de inducir hiperpolarización en las neuronas gabaérgicas y fomentar la liberación presináptica de GABA en el area preóptica media y por consecuencia propiciar la inhibición de los sistemas involucrados en la vigilia. Cómo en la fase de obscuridad es mayor la expresión del receptor de IL-1 β , es durante esta fase que se observa un incremento en el sueño NMOR como resultado de la irradiación

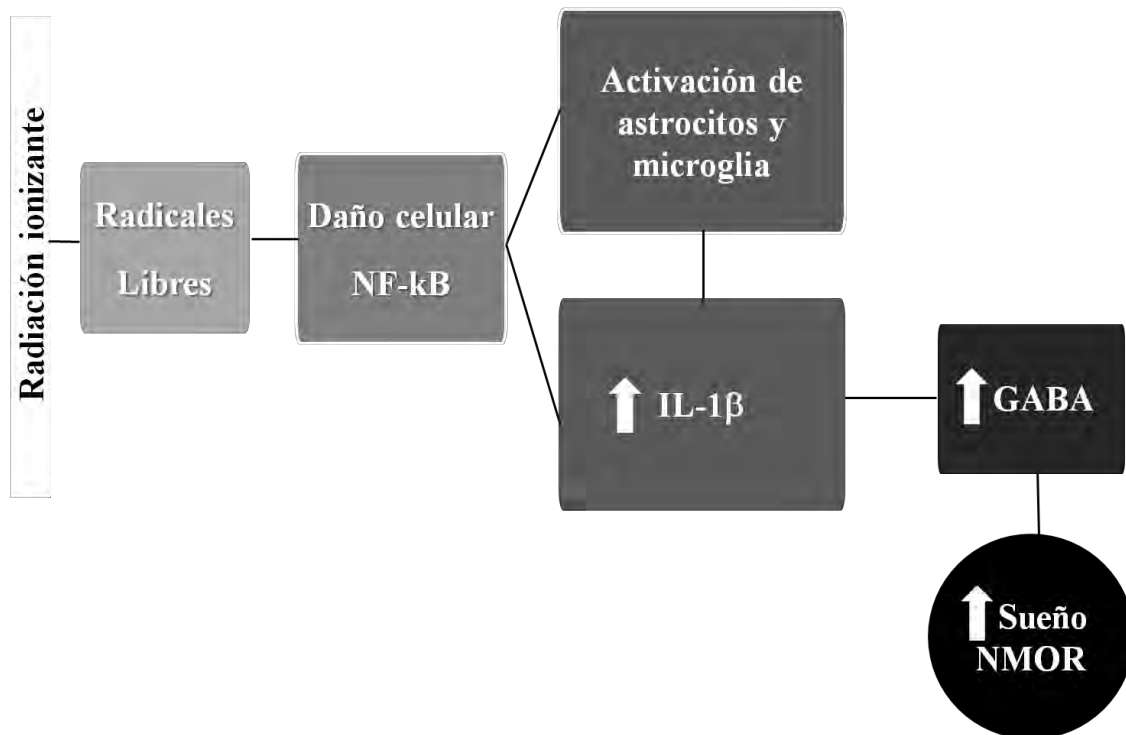


Figura 27. Hipótesis sobre el incremento del sueño NMOR tras la irradiación holocraneal.

11.7 PERSPECTIVAS

Debido a que la muerte neuronal en los núcleos reguladores del sueño es poco probable para la dosis de radiación empleada en este trabajo, se puede concluir que el aumento observado en el sueño NMOR puede estar íntimamente relacionado con la respuesta

inflamatoria del tejido normal a la radiación ionizante. Sin embargo aún es necesario evaluar la expresión de otras citocinas y otros efectos como la desmielinización y la muerte en diferentes tipos celulares causada por la irradiación y su papel en este síndrome. También es recomendable usar bloqueadores de IL-1 β como el receptor soluble IL-1RA o modelos animales transgénicos para determinar la participación existente entre la IL-1 β y los cambios observados en el sueño. En los pacientes, el SSR se resuelve con el tiempo aún sin medicación; el mecanismo asociado a esto así como el papel de los mecanismos reguladores de la respuesta inmune involucrados aún se desconocen. Por lo tanto sería muy útil emplear el modelo de irradiación holocraneal en rata para hacer mediciones a tiempos mayores tras la irradiación.

XII REFERENCIAS

- Acarin, L., B. Gonzalez, et al. (2000). "Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain." Eur J Neurosci **12**(10): 3505-3520.
- Alam, M. N., D. McGinty, et al. (2004). "Interleukin-1beta modulates state-dependent discharge activity of preoptic area and basal forebrain neurons: role in sleep regulation." Eur J Neurosci **20**(1): 207-216.
- Angeli, A., R. G. Maser, et al. (1999). "Modulation by cytokines of glucocorticoid action." Ann N Y Acad Sci **876**: 210-220.
- Baker, F. C., S. Shah, et al. (2005). "Interleukin 1beta enhances non-rapid eye movement sleep and increases c-Fos protein expression in the median preoptic nucleus of the hypothalamus." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **288**(4): R998-R1005.
- Ballesteros-Zebadua, P., A. Chavarria, et al. (2012). "Radiation-induced neuroinflammation and radiation somnolence syndrome." CNS Neurol Disord Drug Targets **11**(7): 937-949.
- Bear, M. F., B. W. Connors, et al. (2001). Neuroscience, exploring the brain., Lippincott, Williams & Wilkins.
- Beynon, A. L. and A. N. Coogan (2010). "Diurnal, age, and immune regulation of interleukin-1beta and interleukin-1 type 1 receptor in the mouse suprachiasmatic nucleus." Chronobiol Int **27**(8): 1546-1563.
- Beyzadeoglu, M. O., G. Ebruli, C. (2010). Basic Radiation Oncology, Springer.
- Bohm, E. L. J. F. (2010). Radiation Biology: A Handbook for teachers and students Vienna, Austria, International Atomic Energy Agency IAEA.
- Brambilla, D., I. Barajon, et al. (2010). "Interleukin-1 inhibits putative cholinergic neurons in vitro and REM sleep when microinjected into the rat laterodorsal tegmental nucleus." Sleep **33**(7): 919-929.
- Brambilla, D., S. Franciosi, et al. (2007). "Interleukin-1 inhibits firing of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus and enhances GABAergic inhibitory post-synaptic potentials." Eur J Neurosci **26**(7): 1862-1869.
- Breder, C. D., C. A. Dinarello, et al. (1988). "Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus." Science **240**(4850): 321-324.
- Buzdar, S. A., M. A. Rao, et al. (2009). "An analysis of depth dose characteristics of photon in water." J Ayub Med Coll Abbottabad **21**(4): 41-45.
- Clinton, J. M., C. J. Davis, et al. (2011). "Biochemical regulation of sleep and sleep biomarkers." J Clin Sleep Med **7**(5 Suppl): S38-42.
- Conner, K. R., V. S. Payne, et al. (2010). "Effects of the AT1 receptor antagonist L-158,809 on microglia and neurogenesis after fractionated whole-brain irradiation." Radiat Res **173**(1): 49-61.
- Coogan, A. N. and C. A. Wyse (2008). "Neuroimmunology of the circadian clock." Brain Res **1232**: 104-112.
- Corsi, M. (1990). Psicofisiología del Sueño México, Trillas.
- Cuadros, M. A. and J. Navascues (1998). "The origin and differentiation of microglial cells during development." Prog Neurobiol **56**(2): 173-189.
- Chiang, C. S., J. H. Hong, et al. (1997). "Delayed molecular responses to brain irradiation." Int J Radiat Biol **72**(1): 45-53.
- Chiang, C. S. and W. H. McBride (1991). "Radiation enhances tumor necrosis factor alpha production by murine brain cells." Brain Res **566**(1-2): 265-269.

- Churchill, L., D. M. Rector, et al. (2008). "Tumor necrosis factor alpha: activity dependent expression and promotion of cortical column sleep in rats." Neuroscience **156**(1): 71-80.
- Daigle, J. L., J. H. Hong, et al. (2001). "The role of tumor necrosis factor signaling pathways in the response of murine brain to irradiation." Cancer Res **61**(24): 8859-8865.
- Dantzer, R. and K. W. Kelley (2007). "Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior." Brain Behav Immun **21**(2): 153-160.
- Das, I. J., G. X. Ding, et al. (2008). "Small fields: nonequilibrium radiation dosimetry." Med Phys **35**(1): 206-215.
- Datta, S. and J. A. Hobson (2000). "The rat as an experimental model for sleep neurophysiology." Behav Neurosci **114**(6): 1239-1244.
- Dinarello, C. A. (2009). "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." Annu Rev Immunol **27**: 519-550.
- Druckman, A. (1929). " Shlafscuct als forge der roentgenbestralung beitragsur strahlenempfindliichkeit des gehunda." Strahlenther **33**(3): 382-384.
- Faithfull, S. and M. Brada (1998). "Somnolence syndrome in adults following cranial irradiation for primary brain tumours." Clin Oncol (R Coll Radiol) **10**(4): 250-254.
- Fang, J., Y. Wang, et al. (1998). "Effects of interleukin-1 beta on sleep are mediated by the type I receptor." Am J Physiol **274**(3 Pt 2): R655-660.
- Ferlay, J. S., I; Ervik, M; Dikshit, R; Eser, S; Mathers, C; Rebelo, M; Parkin, DM; Forman, D; Bray, F. (2013). "GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11." from <http://globocan.iarc.fr>.
- Fippel, M. (1999). "Fast Monte Carlo dose calculation for photon beams based on the VMC electron algorithm." Med Phys **26**(8): 1466-1475.
- Fippel, M. (2004). "Efficient particle transport simulation through beam modulating devices for Monte Carlo treatment planning." Med Phys **31**(5): 1235-1242.
- Fippel, M., F. Haryanto, et al. (2003). "A virtual photon energy fluence model for Monte Carlo dose calculation." Med Phys **30**(3): 301-311.
- Fippel, M., I. Kawrakow, et al. (1997). "Electron beam dose calculations with the VMC algorithm and the verification data of the NCI working group." Phys Med Biol **42**(3): 501-520.
- Fippel, M., W. Laub, et al. (1999). "Experimental investigation of a fast Monte Carlo photon beam dose calculation algorithm." Phys Med Biol **44**(12): 3039-3054.
- Franco-Perez, J., P. Ballesteros-Zebadua, et al. (2012). "[Major neurotransmitters involved in the regulation of sleep-wake cycle]." Rev Invest Clin **64**(2): 182-191.
- Franco-Perez, J., M. Padilla, et al. (2006). "Sleep and brain monoamine changes produced by acute and chronic acetaldehyde administration in rats." Behav Brain Res **174**(1): 86-92.
- Freeman, J. E., P. G. Johnston, et al. (1973). "Somnolence after prophylactic cranial irradiation in children with acute lymphoblastic leukaemia." Br Med J **4**(5891): 523-525.
- Fuentes, J. M., M. A. Talamini, et al. (2006). "General anesthesia delays the inflammatory response and increases survival for mice with endotoxic shock." Clin Vaccine Immunol **13**(2): 281-288.
- Gaber, M. W., O. M. Sabek, et al. (2003). "Differences in ICAM-1 and TNF-alpha expression between large single fraction and fractionated irradiation in mouse brain." Int J Radiat Biol **79**(5): 359-366.

- Galoyan, A. and H. Besedovsky, Eds. (2008). Neuroimmunology. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. New York, NY, Springer.
- Garabedian, B. V., Y. Lemaigre-Dubreuil, et al. (2000). "Central origin of IL-1beta produced during peripheral inflammation: role of meninges." Brain Res Mol Brain Res **75**(2): 259-263.
- Garwicz, S., S. Aronson, et al. (1975). "Postirradiation syndrome and eeg findings in children with acute lymphoblastic leukaemia." Acta Paediatr Scand **64**(3): 399-403.
- Greene-Schloesser, D. and M. E. Robbins (2012a). "Radiation-induced cognitive impairment--from bench to bedside." Neuro Oncol **14 Suppl 4**: iv37-44.
- Greene-Schloesser, D., M. E. Robbins, et al. (2012b). "Radiation-induced brain injury: A review." Front Oncol **2**: 73.
- Grossweiner, L. I. (2001). "Direct action of ionizing Radiation " Internet Photochemistry and Photobiology from www.photobiology.com/educational/len/part2.htm.
- Hall, E. J. (2000). Radiobiology for the Radiologist Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins.
- Hight, K., H. Hallett, et al. (2010). "Time of day differences in the number of cytokine-, neurotrophin- and NeuN-immunoreactive cells in the rat somatosensory or visual cortex." Brain Res **1337**: 32-40.
- Hirota, K., M. Murata, et al. (1999). "Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB." J Biol Chem **274**(39): 27891-27897.
- Hopkins, S. J. and N. J. Rothwell (1995). "Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition." Trends Neurosci **18**(2): 83-88.
- Hughes, J. R. (2008). "Gamma, fast, and ultrafast waves of the brain: their relationships with epilepsy and behavior." Epilepsy Behav **13**(1): 25-31.
- Huitinga, I., M. van der Cammen, et al. (2000). "IL-1beta immunoreactive neurons in the human hypothalamus: reduced numbers in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **107**(1): 8-20.
- Hwang, S. Y., J. S. Jung, et al. (2006). "Ionizing radiation induces astrocyte gliosis through microglia activation." Neurobiol Dis **21**(3): 457-467.
- Imeri, L. and M. R. Opp (2009). "How (and why) the immune system makes us sleep." Nat Rev Neurosci **10**(3): 199-210.
- Johns, M. W. (1991). "Polysomnography at a sleep disorders unit in Melbourne." Med J Aust **155**(5): 303-308.
- Joo, K. M., J. Jin, et al. (2012). "Trans-differentiation of neural stem cells: a therapeutic mechanism against the radiation induced brain damage." PLoS One **7**(2): e25936.
- Jouvet, M. (1967a). "Neurophysiology of the states of sleep." Physiol Rev **47**(2): 117-177.
- Jouvet, M. (1967b). "The states of sleep." Sci Am **216**(2): 62-68 passim.
- Kabe, Y., K. Ando, et al. (2005). "Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus." Antioxid Redox Signal **7**(3-4): 395-403.
- Kawrakow, I. and M. Fippel (2000). "Investigation of variance reduction techniques for Monte Carlo photon dose calculation using XVMC." Phys Med Biol **45**(8): 2163-2183.
- Kawrakow, I., M. Fippel, et al. (1996). "3D electron dose calculation using a Voxel based Monte Carlo algorithm (VMC)." Med Phys **23**(4): 445-457.

- Khan, F. M. (1994). The Physics of Radiation Therapy. Baltimore, Maryland, Williams and Wilkins
- Krueger, J. M. (1990). "Somnogenic activity of immune response modifiers." Trends Pharmacol Sci **11**(3): 122-126.
- Krueger, J. M. (2008). "The role of cytokines in sleep regulation." Curr Pharm Des **14**(32): 3408-3416.
- Krueger, J. M., J. Fang, et al. (1998). "Humoral Regulation of Sleep." News Physiol Sci **13**: 189-194.
- Krueger, J. M. and J. A. Majde (2003). "Humoral links between sleep and the immune system: research issues." Ann N Y Acad Sci **992**: 9-20.
- Krueger, J. M., F. J. Obal, et al. (2001). "The role of cytokines in physiological sleep regulation." Ann N Y Acad Sci **933**: 211-221.
- Kyrkanides, S., J. A. Olschowka, et al. (1999). "TNF alpha and IL-1beta mediate intercellular adhesion molecule-1 induction via microglia-astrocyte interaction in CNS radiation injury." J Neuroimmunol **95**(1-2): 95-106.
- Lechan, R. M., R. Toni, et al. (1990). "Immunoreactive interleukin-1 beta localization in the rat forebrain." Brain Res **514**(1): 135-140.
- Lee, W. H., W. E. Sonntag, et al. (2010a). "Aging attenuates radiation-induced expression of pro-inflammatory mediators in rat brain." Neurosci Lett **476**(2): 89-93.
- Lee, W. H., W. E. Sonntag, et al. (2010b). "Irradiation induces regionally specific alterations in pro-inflammatory environments in rat brain." Int J Radiat Biol **86**(2): 132-144.
- Li, Y. Q., V. Jay, et al. (1996). "Oligodendrocytes in the adult rat spinal cord undergo radiation-induced apoptosis." Cancer Res **56**(23): 5417-5422.
- Littman, P., J. Rosenstock, et al. (1984). "The somnolence syndrome in leukemic children following reduced daily dose fractions of cranial radiation." Int J Radiat Oncol Biol Phys **10**(10): 1851-1853.
- Lue, F. A., M. Bail, et al. (1988). "Sleep and cerebrospinal fluid interleukin-1-like activity in the cat." Int J Neurosci **42**(3-4): 179-183.
- Lyman, M., D. G. Lloyd, et al. (2013). "Neuroinflammation: The role and consequences." Neurosci Res.
- Mahowald, M. W. and C. H. Schenck (2005). "Insights from studying human sleep disorders." Nature **437**(7063): 1279-1285.
- Martens, C., C. De Wagter, et al. (2000). "The value of the PinPoint ion chamber for characterization of small field segments used in intensity-modulated radiotherapy." Phys Med Biol **45**(9): 2519-2530.
- McGinty, D. and R. Szymusiak (2001). "Brain structures and mechanisms involved in the generation of NREM sleep: focus on the preoptic hypothalamus." Sleep Med Rev **5**(4): 323-342.
- McTyre, E., J. Scott, et al. (2013). "Whole brain radiotherapy for brain metastasis." Surg Neurol Int **4**(Suppl 4): S236-244.
- Mignot, E. (2008). "Why we sleep: the temporal organization of recovery." PLoS Biol **6**(4): e106.
- Moldofsky, H. (1994). "Central nervous system and peripheral immune functions and the sleep-wake system." J Psychiatry Neurosci **19**(5): 368-374.
- Monje, M. L., S. Mizumatsu, et al. (2002). "Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction." Nat Med **8**(9): 955-962.
- Monje, M. L., H. Toda, et al. (2003). "Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis." Science **302**(5651): 1760-1765.

- Morganti-Kossmann, M. C., P. M. Lenzlinger, et al. (1997). "Production of cytokines following brain injury: beneficial and deleterious for the damaged tissue." Mol Psychiatry **2**(2): 133-136.
- Mrak, R. E. and W. S. Griffin (2004). "Welcome to the Journal of Neuroinflammation!" J Neuroinflammation **1**(1): 1.
- Murray, K. J., C. Scott, et al. (1997). "A randomized phase III study of accelerated hyperfractionation versus standard in patients with unresected brain metastases: a report of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 9104." Int J Radiat Oncol Biol Phys **39**(3): 571-574.
- Nguyen, K. T., T. Deak, et al. (1998). "Exposure to acute stress induces brain interleukin-1beta protein in the rat." J Neurosci **18**(6): 2239-2246.
- Nicolau, M. C., M. Akaarir, et al. (2000). "Why we sleep: the evolutionary pathway to the mammalian sleep." Prog Neurobiol **62**(4): 379-406.
- Nieder, C., N. Andratschke, et al. (2007). "Experimental concepts for toxicity prevention and tissue restoration after central nervous system irradiation." Radiat Oncol **2**: 23.
- Obal, F., Jr. and J. M. Krueger (2003). "Biochemical regulation of non-rapid-eye-movement sleep." Front Biosci **8**: d520-550.
- Opp, M. R., F. Obal, Jr., et al. (1991). "Interleukin 1 alters rat sleep: temporal and dose-related effects." Am J Physiol **260**(1 Pt 2): R52-58.
- Orem, J., A. T. Lovering, et al. (2002). "Tonic activity in the respiratory system in wakefulness, NREM and REM sleep." Sleep **25**(5): 488-496.
- Pandi-Perumal, S. R., D. P. Cardinali, et al., Eds. (2007). Neuroimmunology of Sleep. New York, NY Springer.
- Paskalev, K. A., J. P. Seuntjens, et al. (2003). "Physical aspects of dynamic stereotactic radiosurgery with very small photon beams (1.5 and 3 mm in diameter)." Med Phys **30**(2): 111-118.
- Paxinos, G. and C. Watson (1997). The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA, USA, Academic Press.
- Perez, C. A. and L. W. Brady (2004). Principles and practice of radiation oncology. USA, Lippincott Williams & Wilkins.
- Rades, D., J. D. Kueter, et al. (2008). "Comparison of stereotactic radiosurgery (SRS) alone and whole brain radiotherapy (WBRT) plus a stereotactic boost (WBRT+SRS) for one to three brain metastases." Strahlenther Onkol **184**(12): 655-662.
- Radiological71. (2008). "Penetration of Different Types of Radiation." from www.alpharubicon.com/basicnbc/RadiationPenetration.htm.
- Rechtschaffen, A. and B. M. Bergmann (1995). "Sleep deprivation in the rat by the disk-over-water method." Behav Brain Res **69**(1-2): 55-63.
- Ryan, J. (2000). "Radiation somnolence syndrome." J Pediatr Oncol Nurs **17**(1): 50-53.
- Safieh-Garabedian, B., J. J. Haddad, et al. (2004). "Cytokines in the central nervous system: targets for therapeutic intervention." Curr Drug Targets CNS Neurol Disord **3**(4): 271-280.
- Sanchez-Doblado, F., R. Capote, et al. (2005). "Micro ionization chamber dosimetry in IMRT verification: clinical implications of dosimetric errors in the PTV." Radiother Oncol **75**(3): 342-348.
- Saper, C. B., J. Lu, et al. (2005a). "The hypothalamic integrator for circadian rhythms." Trends Neurosci **28**(3): 152-157.
- Saper, C. B., T. E. Scammell, et al. (2005b). "Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms." Nature **437**(7063): 1257-1263.

- Schultheiss, T. E. and L. C. Stephens (1992a). "Invited review: permanent radiation myelopathy." Br J Radiol **65**(777): 737-753.
- Schultheiss, T. E. and L. C. Stephens (1992b). "The pathogenesis of radiation myelopathy: widening the circle." Int J Radiat Oncol Biol Phys **23**(5): 1089-1091; discussion 1093-1084.
- Shoham, S., D. Davenne, et al. (1987). "Recombinant tumor necrosis factor and interleukin 1 enhance slow-wave sleep." Am J Physiol **253**(1 Pt 2): R142-149.
- Spiegel, K., J. F. Sheridan, et al. (2002). "Effect of sleep deprivation on response to immunization." JAMA **288**(12): 1471-1472.
- Szymusiak, R. and D. McGinty (2008). "Hypothalamic regulation of sleep and arousal." Ann N Y Acad Sci **1129**: 275-286.
- Tabarean, I. V., H. Korn, et al. (2006). "Interleukin-1beta induces hyperpolarization and modulates synaptic inhibition in preoptic and anterior hypothalamic neurons." Neuroscience **141**(4): 1685-1695.
- Taishi, P., S. Bredow, et al. (1997). "Diurnal variations of interleukin-1 beta mRNA and beta-actin mRNA in rat brain." J Neuroimmunol **75**(1-2): 69-74.
- Taishi, P., C. J. Davis, et al. (2012). "Brain-specific interleukin-1 receptor accessory protein in sleep regulation." J Appl Physiol **112**(6): 1015-1022.
- Takeuchi, E. (1970). "[Polygraphical study on the wakefulness-sleep cycle of the rat]." Shinrigaku Kenkyu **41**(5): 248-256.
- Tofilon, P. J. and J. R. Fike (2000). "The radioresponse of the central nervous system: a dynamic process." Radiat Res **153**(4): 357-370.
- Tringali, G., C. Mancuso, et al. (1996). "Evidence for the neuronal origin of immunoreactive interleukin-1 beta released by rat hypothalamic explants." Neurosci Lett **219**(3): 143-146.
- Uzal, D., E. Ozyar, et al. (1998). "Reduced incidence of the somnolence syndrome after prophylactic cranial irradiation in children with acute lymphoblastic leukemia." Radiother Oncol **48**(1): 29-32.
- van der Kogel, A. J. (1986). "Radiation-induced damage in the central nervous system: an interpretation of target cell responses." Br J Cancer Suppl **7**: 207-217.
- Wilkens, J. J. and U. Oelfke (2008). "Direct comparison of biologically optimized spread-out bragg peaks for protons and carbon ions." Int J Radiat Oncol Biol Phys **70**(1): 262-266.
- Woloski, B. M., E. M. Smith, et al. (1985). "Corticotropin-releasing activity of monokines." Science **230**(4729): 1035-1037.
- Yang, C., T. Hong, et al. (2013). "Ketamine exerts antidepressant effects and reduces IL-1beta and IL-6 levels in rat prefrontal cortex and hippocampus." Exp Ther Med **5**(4): 1093-1096.
- Yi, P. L., C. H. Tsai, et al. (2007). "Interleukin-1beta mediates sleep alteration in rats with rotenone-induced parkinsonism." Sleep **30**(4): 413-425.

XIII. ABREVIATURAS

ACTH - hormona adenocorticotrópica
ADN - ácido desoxirribonucleico
ARNm – ácido ribonucleico mensajero
BCA- ácido bicinconílico
Bcl-2 - proteína 2 del linfoma de células B
BED - dosis biológicamente efectiva
CIOMS - council for international organizations of medical sciences
COX-2 - ciclooxigenasa tipo 2
CRH - hormona liberadora de corticotropina
EDS - síndrome de somnolencia diurna
EEG - electroencefalograma
ELISA - ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EMG - electromiograma
EOG - electroculograma
eV - electrón-volt
GABA - ácido gama amino butírico
GHRH - hormona liberadora de la hormona del crecimiento
Gy - greys
h - horas
H₂O₂ - peróxido de hidrógeno
HHA - hipotálamo-hipófisis-adrenales
HHG - hipotálamo-hipófisis-gónadas
HHT - hipotálamo-hipófisis-tiroides
HU - unidades hounsfield
Hz - hertz
ICAM-1 - molécula de adhesión intercelular -1
IL-1RA - receptor soluble para interleucina-1
IL-1 β - interleucina-1 β
IL-6 - interleucina-6
iNOS - sintasa inducible de óxido nítrico
keV – kilo electron-volt
LET - linear energy transfer
LLA - leucemia linfocítica aguda
LPS - lipopolisacárido
MeV- Mega electron-volt
MLC - colimador multihojas
MOR - sueño de movimientos oculares rápidos
MP-2 - metaloproteinasas
MPO - area preóptica media
mV - milivolts
NF- κ B - factor nuclear de transcripción κ B
NMOR - sueño de no-movimientos oculares rápidos
NO - óxido nítrico
OH \cdot - radical hidroxilo
PGD₂ - prostaglandina D2
PGE2 - prostaglandina –E2
PGO - ondas ponto-geniculo-occipitales

PLC - path length correction
SNC - sistema nervioso central
SSR - síndrome de somnolencia por radiación
TC - tomografía computarizada
TMB - tetrametilbenzidina
TNF- α - factor de necrosis tumoral- α
VCAM-1- molécula de citoadhesión vascular-1
VLPO - área preóptica ventrolateral

XIV. ANEXOS

Radiation-Induced Neuroinflammation and Radiation Somnolence Syndrome

Paola Ballesteros-Zebadúa^{1,2,3}, Anahi Chavarria⁴, Miguel Angel Celis³, Carlos Paz⁵ and Javier Franco-Pérez^{*,5}

¹Medical Physics Laboratory, National Institute of Neurology and Neurosurgery, Insurgentes Sur No. 3877, Col. La Fama, C.P. 14269, D.F., México

²Biomedical Sciences PhD Program, National Autonomous University of Mexico, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, D.F., México

³Radiosurgery Unit, National Institute of Neurology and Neurosurgery, Insurgentes Sur No. 3877, Col. La Fama, C.P. 14269, D.F., México

⁴Department of Experimental Medicine, Medical School, National Autonomous University of Mexico, Dr. Balmis No. 148, Col. Doctores, C.P. 06726, D.F., México

⁵Department of Neurophysiology, National Institute of Neurology and Neurosurgery, Insurgentes Sur No. 3877, Col. La Fama, C.P. 14269, D.F., México

Abstract: Cranial irradiation remains a standard treatment for malignant and benign brain diseases. Although this procedure helps to lengthen the life expectancy of the patient, the appearance of adverse effects related to radiation-induced injury is inevitable. Radiation somnolence syndrome (RSS) has been described as a delayed effect observed mainly after whole-brain radiotherapy in children. The RSS was first linked to demyelination, but more recently it has been proposed that the inflammatory response plays a primary role in the aforementioned syndrome. To evaluate the feasibility of this hypothesis, we explored previous work about RSS and reviewed published research that included measurements of the inflammatory response in models of brain exposure to ionizing radiation. Pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and interleukin-18 as well as other inflammatory markers such as cyclooxygenase-2, prostaglandin E₂, glial fibrillary acid protein, intercellular adhesion molecule-1 and nuclear factor- κ B appear to be involved in the brain's response to radiation. However, certain publications have described the somnogenic effects of these cytokines and inflammatory markers. Although the radiation response is a complex phenomenon that involves several molecular and cellular processes, we propose that inflammation may be closely related to the adverse effects of brain irradiation and therefore to the etiology of RSS.

Keywords: Radiotherapy, neuroinflammation, radiation somnolence syndrome, sleep, cytokines, whole-brain irradiation.

INTRODUCTION

At present, radiotherapy and radiosurgery are considered to be the major treatment modalities for various brain disorders such as metastatic neoplasms and arteriovenous malformations. Although these treatments have helped to prolong life expectancy among patients, one of the main limitations of brain radiotherapy is the injury to normal tissue induced by radiation. Since the first applications of radiation in brain medicine, somnolence disturbances have been reported. However, reports about sleep and somnolence in patients are mostly recorded using follow-up questionnaires; electrographic measurements or polysomnographic studies are rarely included. The changes in sleep-wake patterns that can be induced by brain radiation therapy may not only affect the quality of life but also help to identify several molecular mechanisms that may be associated with

radiation effects. Among these mechanisms, demyelination and inflammatory responses have been proposed as potential explanations of these behavioral changes. Therefore, this paper reviews the literature published about the presence of inflammatory markers after brain irradiation, to help us understand the symptoms associated with ionizing radiation and their mechanisms.

Radiation Somnolence Syndrome (RSS)

There is controversy about the complications of radiotherapy. However, several findings indicate that radiation induces brain injury as manifested by several symptoms that develop over time [1]. These symptoms have been subdivided into acute, sub-acute (early delayed), and late delayed. Acute injury is expressed days to weeks after irradiation and is often characterized by drowsiness, vomiting, headache and nausea. Early delayed injury typically occurs from 1 to 6 months after irradiation and involves transient demyelination, short-term memory loss, fatigability and especially somnolence. Late delayed effects may include demyelination, vascular abnormalities and

*Address correspondence to this author at the Department of Neurophysiology, National Institute of Neurology and Neurosurgery M.V.S., Insurgentes Sur No. 3877, Col. La Fama, C.P. 14269 México D.F., México; Tel: +52 55 5606 3822; Fax: +52 55 5424 0808; E-mail: jfranco@innn.edu.mx

radionecrosis; these effects are observed 6 months after irradiation [2]. Those who have survived may also show signs of intellectual deterioration, including mainly progressive symptoms ranging from mild lassitude to significant memory loss and progressive declines in cognitive parameters [3] (Table 1). Somnolence has been described recurrently as a sub-acute neurological effect after central nervous system (CNS) irradiation. It has been reported that RSS occurs 4 to 8 weeks after whole-cranial irradiation. The associated symptoms range from mild fatigue and daytime drowsiness to excessive sleep [4]. Patients may also experience decreased activity levels, headache, vomiting/nausea, fever, anorexia, irritability and ataxia [5]. RSS was first described in 1929 by Druckman [6] after observing that children treated for ringworm of the scalp with 150-kV X-rays presented somnolence, anorexia, apathy and headache six weeks after the irradiation. Ever since, different studies have reported similar symptoms mainly in patients after irradiation of the entire brain (Table 2). However, it has been difficult to distinguish whether the somnolence experienced was due to malignant disease itself, medications or to a normal brain tissue reaction to ionizing radiation.

Freeman and colleagues [7] reported a transient cerebral disturbance characterized by somnolence in 28 children who underwent whole-brain radiotherapy (WBRT) with a total

dose of 24 Gy as prophylaxis for acute lymphoblastic leukemia (ALL) in remission. The authors found symptoms that varied from mild drowsiness to prolonged periods of sleep (even as long as 20 hours), and such symptoms appeared approximately 38 days after WBRT and lasted for a mean of 18.5 days [7]. Since then, RSS has become widely recognized in children after cranial irradiation for ALL. Subsequently, a study compared two different fractionation schemes for irradiation in children with ALL. No significant difference in RSS incidence was found when comparing a scheme of 1 Gy in 18 fractions with a scheme of 1.8 Gy in 10 fractions; indeed, RSS occurred in 58% of all of the evaluated children [8]. Interestingly, it has been demonstrated that prednisone, a steroidal anti-inflammatory, decreases the frequency of RSS. Children treated for ALL who are in remission and had received daily doses of prednisone (15 mg/m²) during WBRT with 18 Gy presented a significant decrease in the incidence of RSS [9]. A prospective study showed that in 34 patients receiving WBRT (18 Gy in 10 fractions), the mean time to the development of RSS was 4 weeks. The incidence of RSS was considerably reduced (from 64.3% to 17.6%) when the prednisone dose was doubled (from 2 mg/m² to 4 mg/m²) [5].

We only found one report that included electroencephalographic (EEG) findings after craniospinal irradiation (20-25

Table 1. Chain of Events After the Administration of Ionizing Radiation to the Brain. Each Process May be Triggered by Different Initial Effects, and Each Symptom may be Related to Different Processes Simultaneously

Seconds	Minutes	Hours	Days/Months	Months/Years
Energy transfer	Protein modification	Cell death (stem, precursor, endothelial, parenchymal, etc.)	Demyelination	Somnolence
Ionization	Gene expression changes	Inflammation (cytokines and adhesion molecules)	Inflammation	Necrosis
Free radical formation	Peroxidation and oxidative stress	Changes in blood-brain barrier permeability	Vascular damage Disruption of neurogenesis and cellular repair	Edema
Free radical interaction with molecules		Changes in gap junction properties	Genetic mutations	Organ failure Cognitive deficit
DNA strand breaks				Cancer

Table 2. Reported Cases of Radiation Somnolence Syndrome (RSS) (Modified from [12])

N	Dose (Gy)	Patient Age	Disease Treatment	Target Volume	RSS Incidence	Reference
28	24	<15	ALL	Cranial-spinal	79%	[7]
49	24	<15	ALL	Cranial-spinal	60%	[15]
56	18	1-18	ALL	Cranial	58%	[8]
5	18	1.5-18	ALL-Prednisone	Cranial	13%	[9]
1	13.2	38	Transplant	Whole-Body Irradiation	-	[81]
12	18	2-15	ALL-Dexamethasone	Cranial	40%	[5]
19	44-55 (1.8 per Fx)	20-71	Neoplastic	Cranial	84%	[11]
1	NR	5	Meduloblastoma	Cranial-spinal	-	[4]
1	54 (1.8 per Fx)	29	Meningeoma-Prednisone	Pineal Region	-	[12]

Gy in 18-26 fractions) in patients undergoing ALL treatment. This study followed 12 children for 24 weeks after treatment and found that 8 presented RSS between 5-7 weeks after the completion of treatment. In some cases, the syndrome was accompanied by EEG abnormalities described as diffuse slowing. However, these results appear to be inconclusive because some patients had already presented the EEG abnormalities before irradiation, and radiotherapy seemed to improve this phenomenon [10].

The use of a visual analogue scale and interviews have revealed the presence of RSS in adult patients. Faithfull and Brada [11] performed a prospective study in 19 adult patients who underwent cranial irradiation as treatment for primary brain tumors. They reported that sixteen patients presented RSS with a cyclical pattern, showing drowsiness and fatigue from day 11 to day 21 and from day 31 to day 35 after radiotherapy. More recently, one case of a patient with a meningioma in the pineal region was reported. The patient developed severe fatigue, somnolence, headache and fever 5 weeks after receiving 30 fractions of 1.8 Gy to a total dose of 54 Gy [12]. Although this is the first report of RSS after partial brain radiotherapy, it is necessary to mention that 50% of the total brain was covered by the 10-Gy isodose curve. Hence, although the radiation was directed to a specific region, it is not clear if the reported effects were rather due to the amount of brain tissue that received sufficient radiation to initiate these phenomena. It is important to recognize that there are correlations between tumor localization (hypothalamic/pituitary region) and diurnal somnolence regardless of the type of treatment (e.g., surgery and WBRT). Consequently, it is not easy to determine whether symptoms are associated with intrinsic tumor effects or radiotherapy itself.

Currently, most clinicians would not consider RSS as a relevant symptom because it is transient and only arises in association with apparently spontaneous recovery. Notably, certain consequences such as cognitive deficits have been associated with RSS; however, the issue is still surrounded by controversy because a clear relationship between both phenomena has not yet been elucidated [5]. Regarding this concern, several studies have reported the lack of any cognitive effects or neurophysiological differences in children irradiated with total doses of 18 and 24 Gy [13]. However, this lack of an effect may be due to steroid use or chemotherapy in combination with radiotherapy [14]. On the contrary, it has been hypothesized that RSS may be an early indicator of cognitive dysfunction. This assumption is based on a study that reported a cognitive deficit in 50% of children treated with WBRT for ALL; these deficits also disappeared 3 years after irradiation [15]. On the other hand, several studies have established that sleep plays a key role in memory consolidation and learning [16]. Therefore the correlation between RSS and cognitive impairment needs to be clarified.

In addition, a multi-factorial analysis of clinical histories was conducted with the aim of identifying any correlations with sleep diagnoses in patients with cancer [17, 18]. Although these retrospective studies are limited in terms of the ability to demonstrate correlations among variables, they have emphasized the relevance of sleep and cognitive dysfunction to the quality of life in patients suffering from

CNS cancer. Clearly, multiple factors (e.g., age, treatment type, depression) may contribute to observed changes in fatigability and sleep [18]; however, more research is needed to obtain objective quantitative measurements that would elucidate any potential correlations. We must also consider the prevalence of RSS and cognitive dysfunction as these factors may reduce the patient's quality of life [18]. This may be directly associated with lower survival rates in patients with head and neck cancer [19].

Currently, a large number of patients with ALL and primary or metastatic tumors will still require large-volume radiotherapy or even WBRT. The RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) has performed many randomized trials to determine the optimal dose and fractionation scheme for WBRT [20]. Notably, the importance of RSS cannot be underestimated and should be considered as one additional undesirable effect of brain irradiation.

The mechanisms involved in RSS etiology are still unclear, but two main explanations have been proposed: transient demyelination [7] and, more recently, inflammatory cytokines [12].

The inflammation hypothesis is supported by previously mentioned reports that describe a reduction in the incidence of RSS after treatment with the steroidal anti-inflammatory drugs used during cranial radiotherapy. Moreover, this hypothesis is now widely supported by data, discussed in the following sections, which demonstrate the presence of several pro-inflammatory markers in brain tissue after irradiation.

Radiation-Induced Brain Injury

The term ionizing radiation arises from the fact that energy is deposited in atoms throughout the matter it traverses, which results in ionization or electron excitation. This ionization or excitation may occur in living tissues and can involve certain critical molecules or structures in cells, which in turn initiates a chain of events. Various theories propose that energy deposited by radiation may directly alter sensitive chemical bonds, or is first deposited elsewhere and then transferred to sensitive chemical bonds by means of an appropriate energy transfer system [21]. The complete radiochemical mechanism involved in irradiated mammalian tissue is not yet fully understood. However, the most accepted hypothesis at the present time is that water, both intracellular and extracellular, is the primary site of radiation energy deposition and that the energy deposited could be transferred and thereby indirectly affect sensitive molecules [21]. It is considered that a range of doses of ionizing radiation cause similar molecular and cellular effects, which include cell death due to DNA strand rupture and other effects associated with cell death, such as inflammation, which may trigger the cell and tissue damage observed in certain patients [21].

Inflammation

Post-irradiation signs such as changes in blood-brain barrier (BBB) permeability, edema, demyelination and sleep disturbances are not entirely explained by the effects of radiation-induced cell death. Such radiation-induced effects may be related to secondary processes that occur hours to

days after the initial injury (Table 1). More recent research has shown that ionizing radiation induces cytokine production and secondary reactive processes that result in persistent oxidative stress [2]. Moreover, there is extended evidence that identifies inflammation as a consequence of the administration of ionizing radiation to the brain and suggests that inflammation may play a role in the observed side effects of radiation. Brain irradiation may sometimes result in BBB breakdown within weeks following treatment and after an acute inflammatory response. According to Tofilon and Fike [2], the induced microvasculature damage may lead to increased BBB permeability, edema and lymphocyte infiltration in the early phase after irradiation. At later stages, there is evidence of increasing gliosis and demyelination. It has also been proposed that white matter necrosis is related to demyelination, which may be secondary to aspects of the acute inflammatory response such as cytokine and adhesion molecule expression [22]. Ionizing radiation studies *in vivo* and *in vitro* have reported an increase in the mRNA and protein expression of inflammation markers such as IL-1 β , TNF- α , IL-6, and adhesion molecules such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (Table 3). Therefore, evidence supports the hypothesis that delayed responses to irradiation may be driven by cellular mechanisms triggered by cytokine expression [23].

Cytokines

Inflammation in the brain involves the participation of different types of immune and nervous system cells as well as adhesion molecules, cytokines and chemokines, among other molecules (Table 4).

TNF- α is an inducible multifunctional cytokine produced by macrophages, astrocytes and microglial cells. It induces astrocyte proliferation and is directly cytotoxic to oligodendrocytes [24, 25]. TNF- α damages endothelial cells, induces vascular leakage and stimulates gliosis. However, TNF- α also has certain neuroprotective effects; it mediates antioxidant mechanisms and is able to induce anti-apoptotic proteins such as B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) [26, 27]. Radiation studies *in vivo* showed that TNF- α mRNA levels were elevated in the brain cortex after irradiation and returned to basal levels within 24 hrs [22]. Afterwards, Lee and collaborators also observed an up-regulation of TNF- α mRNA and protein in the hippocampus and cortex of rats after whole-brain radiation with 10 Gy. This up-regulation peaked at 4 hrs and decreased within 24 hrs after irradiation. In addition, there were regional differences with higher expression levels found in cortex as opposed to hippocampus [28]. Interestingly, differences in the expression of TNF- α tend to follow the fractionation scheme used for irradiation. Gaber and colleagues [29] reported a rapid increase in TNF- α mRNA expression in mouse brain at 2, 4, 8, 12, 24 and 48 hrs after whole-brain irradiation with a single dose of 20 Gy.

Table 3. Induction of Pro-Inflammatory Factors in Different Models According to the Received Dose and Time After Irradiation

Dose (Gy)	Time After Irradiation	Measurement	Increased Expression	Reference
Whole Rat/Mouse Brain Irradiation				
15	6 & 24 h	Immunostaining intensity Protein and mRNA expression	GFAP	[32]
10	4, 8 & 24 h	Protein and mRNA expression	IL-1 β , TNF- α , MCP-1	[28]
10	4, 8 & 24 h	mRNA expression	IL-1 β , TNF- α , MCP-1, ICAM-1, ECAM-1, E-selectin, MMP-9	[33]
10	4, 8 & 24 h	DNA-binding activity	NF- κ B, CREB, AP-1	[28]
2, 10, 20 (single Fx) 10, 20, 40 (2 per Fx)	2, 4, 8, 12, 24 & 48 h	Protein and mRNA expression	ICAM-1 TNF- α	[29]
Half Mouse Brain Irradiation				
35	4 & 24 h, 3 & 7 days	mRNA expression	ICAM-1, IL-1 β , TNF- α	[22]
25	4, 6, 24 & 48 h, 2, 3 & 6 months.	mRNA expression	IL-1 β , TNF- α , ICAM-1, GFAP, TNF-RI, IFN- γ R	[23]
Murine Microglia Mixed Cell Culture				
2-10	24 h	mRNA expression	IL-1 β , TNF- α , COX-2, IP-10, IL-18, IL-6	[32]
2-8	30 minutes	DNA-binding activity	NF- κ B	[32]
Murine Microglial and Astrocyte Cell Cultures				
1	4 & 24 h	Protein and mRNA expression	TNF- α	[24]
2, 4, 8 + LPS stimulus	4 & 24 h	Protein expression	TNF- α	[22]
25	4 & 24 h	mRNA expression	IL-1 β , TNF α , COX-2	[24]

Table 4. Main Pro-Inflammatory Molecules Observed After Irradiation and their Main Effects

Molecule	Produced by	Relevant Immune Effects	Effects on Sleep-Wake Cycle
TNF-α	Microglia Macrophages Astrocytes	<ul style="list-style-type: none"> Increased BBB permeability Activation and proliferation of glial cells Cytotoxic to oligodendrocytes and endothelial cells Neuroprotective effects Increased ICAM-1 	↑ NREM ↓ REM
IL-1β	Activated macrophages Microglia Astrocytes	<ul style="list-style-type: none"> Increased levels of adhesion molecules such as ICAM-1 and VCAM-1 Activation and proliferation of glial cells Induced COX-2, iNOS, PGE2 production 	↑ NREM ↓ REM
IL-6	Activated macrophages Microglia Astrocytes	<ul style="list-style-type: none"> Inhibitory effects on TNF-a and IL-1, activation of IL-1Ra and IL-10 Inflammatory response and prostanoid synthesis 	Effects on sleep vary depending on time of the day, dose, route and time after administration
IL-18	Activated macrophages Dendritic cells	<ul style="list-style-type: none"> Increased production of IFN-g 	↑ NREM
COX-2	Microglia Astrocytes Neurons Oligodendrocytes	<ul style="list-style-type: none"> Prostanoid biosynthesis: PGE2 BBB breakage 	↑ NREM
NF-κB	All cell types	<ul style="list-style-type: none"> Expression of several inflammatory mediators 	↑ NREM

↑: increase, ↓: decrease.

In contrast, when irradiation was administered in fractions of 2 Gy, there was an increase in TNF- α mRNA expression related to the number of fractions, e.g., the expression of TNF- α increased noticeably at the end of the 40-Gy fractionated regimen. Furthermore, TNF- α currently seems to be the only cytokine modified over the long term or in association with subacute neurological symptoms such as RSS. It has been reported an elevation in TNF- α mRNA expression as much as 2 months after irradiation; this elevation was maintained for at least 6 months [23, 30].

However, it has been reported that astrocyte cell cultures that were not treated with an additional stimulus such as lipopolysaccharide (LPS), irradiation did not induce TNF- α protein changes [24]. Conversely, other reports have found slight differences in irradiated cultures, including a clear increase in TNF- α mRNA levels. Cultured microglia cells also showed increased levels of TNF- α mRNA at 4 and 24 hrs after irradiation [22]. Previous experiments have also shown that microglial cells can produce approximately 10 times more TNF- α than astrocytes and that 2 Gy can increase TNF- α production in astrocytes and microglial cells after LPS-triggered signaling [24]. Interestingly, in microglia and astrocyte cultures, fractionated doses of irradiation have more potent effects on TNF- α production. This means that repeated administration of smaller doses of irradiation induces more TNF- α mRNA expression than single treatments of higher doses [24].

IL-1 β is a pro-inflammatory cytokine produced by activated macrophages, astrocytes and microglia. IL-1 β is able to induce the transcription and translation of cyclooxygenase type 2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) and contributes to the translation of prostaglandin-E2 (PGE2), platelet activating factor and nitric oxide (NO) [31]. Another important pro-inflammatory property of IL-1 β is its ability to increase the expression of adhesion molecules such as ICAM-1 on mesenchymal cells and VCAM-1 on endothelial cells [31]. *In vivo* experiments demonstrated that irradiation increases the mRNA expression of IL-1 β (Table 3). Specifically, it has been reported that the mRNA and protein expression of IL-1 β is up-regulated in rat cortex and hippocampus at 4, 8 and 24 hrs after whole-brain irradiation with 10 Gy [28]. *In vitro* experiments have confirmed the previously mentioned results; the exposure of microglial cultures to 25 Gy of gamma irradiation resulted in a significant induction of IL-1 β expression, which increased 3-fold at 4 hrs and 7-fold at 24 hrs post-irradiation [22].

The levels of other cytokines have also been measured in irradiated brains. Early experiments using ribonuclease protection assays showed no changes in the mRNA expression of IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 and interferon- γ (IFN- γ) over a time scale from 1 day to 6 months after irradiating brains with 25 Gy [24]. However, Lee and colleagues found an increase in IL-6 mRNA without dramatic changes in protein levels as well as an increase in

the mRNA and protein levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) at 4 and 8 hrs after irradiation in the hippocampus and cortex of rats treated with whole-brain irradiation (10 Gy) [28]. More recently, use of the reverse transcription polymerase chain reaction technique (RT-PCR) revealed an increase in the mRNA levels of IL-6, IL-18, IFN- γ and inducible protein-10 (IP-10) in cultured microglial cells submitted to irradiation [32]. There are few reports indicating that radiation can also modify the expression of cytokine receptors and consequently disrupt cytokine function. It has been reported that TNF-R p55 and IFN- γ R mRNA expression levels are up-regulated over the short term and then decrease gradually until 4 to 6 months after irradiation. This up-regulation can be inhibited by the administration of anti-inflammatory compounds such as dexamethasone and pentoxifylline [23].

Adhesion Molecules

As previously mentioned, cytokines such as TNF- α and IL-1 β have been shown to increase the expression of endothelial cell adhesion molecules (ECAMs). The ECAMs include members of the selectin family (e.g., E-selectin) and the Ig gene superfamily (ICAM-1 and VCAM-1). These molecules mediate the adhesion and trafficking of leukocytes across endothelial cell monolayers into inflamed tissues of the CNS.

ICAM-1 is an adhesion molecule widely expressed by endothelial cells, oligodendrocytes, microglia and astrocytes after irradiation of the brain [22, 27]. Some reports have mentioned that ICAM-1 mRNA levels are elevated *in vivo* at 4, 24 and 72 hrs post-irradiation. Research has consistently shown that ICAM-1 immunoreactivity is elevated in glial and endothelial cells after irradiation at 24 hrs and apparently lasts up to 7 days. Interestingly, it has been reported that, *in vitro*, ICAM-1 expression is induced only in irradiated microglia but not in astrocytes [22]. This suggests that the level of ICAM-1 expression induced by irradiation in the brain varies according to cell type. Additionally, ICAM-1 expression may also differ according to the fractionating scheme utilized. Namely, significantly less ICAM-1 protein was found 48 hrs after irradiation in cells treated with the fractionated scheme as compared to a single dose of irradiation. This indicates that the administration of lower doses of radiation reduces the magnitude of the inflammatory response mediated by ICAM-1 [29].

Along with ICAM-1, E-selectin and VCAM-1 (expressed by endothelial cells) have also been observed in whole brains irradiated with 10 Gy. The mRNA expression of these molecules was increased 4, 8 and 24 hr after exposure [33]. The expression of these molecules was highly correlated with increased leukocyte adhesion in brain venules after brain irradiation, which may enhance vascular permeability and could damage the BBB [34, 35].

Nuclear Factors

Radiation seems to modify transcription factors such as nuclear factor κ B (NF- κ B) and activating protein 1 (AP-1), which are crucial for the expression of several genes and initiation of the inflammatory cascade. The increased activation of AP-1, NF- κ B and cAMP response element-binding protein (CREB) has been demonstrated at 8 hrs post-irradiation in rat brains [28]. Additionally, NF- κ B showed

increased binding activity 30 minutes after irradiation in microglial cell cultures treated with a dose ranging from 2-8 Gy [32]. This finding is significant because it has been proposed that NF- κ B is induced by oxidative stress in the brain and can protect against death by apoptosis [2]; therefore, the intensified activity of NF- κ B may protect against radiation-induced injury. Notably, peroxisomal proliferator-activated receptors (PPAR) are a family of nuclear receptors that regulates gene transcription. It is well known that PPAR- α is expressed in multiple cell types including microglia; it has recently been shown to play a major role in the regulation of inflammatory processes [36]. Various experimental designs have revealed that PPAR- α agonists inhibit the production of NO and the secretion of cytokines in LPS-stimulated microglia [36]. Interestingly, microglial cultures irradiated with 10 Gy were used to show that PPAR- α agonists prevent the increase in TNF- α and IL-1 β transcription as well as the increase in COX-2 protein translation. Finally, these preventive effects could be partially due to a modulation of the activity of certain transcription factors such as AP-1 and NF- κ B [37].

Oxidative Damage

It is generally assumed that radiation damage is restricted to the irradiated area, but several studies have reported responses in the surrounding regions [38]. This phenomenon, known as a bystander effect, has been proposed to be related to free radical production because treating rats with NO production inhibitors before irradiation reduces the extent of the damage [38]. NO is known for its cytotoxic effects in oligodendrocytes but these are not thought to be affected by brain irradiation because neither NO production nor iNOS mRNA levels are affected by irradiation [23, 32]. In contrast, it has been proposed that radiation promotes white matter damage because the myelin of nerve fibers is highly susceptible to oxidative damage [39]. To evaluate this type of damage, the levels of associated markers of oxidative stress such as heme oxygenase 1 (Hmox1) were measured in the spinal cords of irradiated rats. Hmox1 expression was not detectable after the application of a non- myelopathic dose (18 Gy). However, Hmox1 expression was detected 5 months after irradiation with higher doses. This finding clearly correlates with the presence of myelopathy in rats [2]. It is also well documented that the exposure of cells to ionizing radiation results in the acute generation of short-lived reactive oxygen species (ROS). One of the pathways that mitigates the effects of ROS involves antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD). However, a study that involved the use of irradiated SOD-KO mice (extracellular isoform) showed similar levels of neurogenesis compared with the results obtained in wild-type animals, although the activation of microglia is higher in KO mice [40].

Reactive Gliosis

Ionizing radiation induces astrocyte activation or what is called reactive gliosis and it has been proposed that cytokines are the main effectors of such phenomenon (Fig. 1) [32]. Microglia appears to be the major source of pro-inflammatory cytokines in the context of inflammation in the brain; these pro-inflammatory cytokines facilitate astrocyte proliferation [22]. Studies have revealed that radiation induces an increase in the activation of microglia and

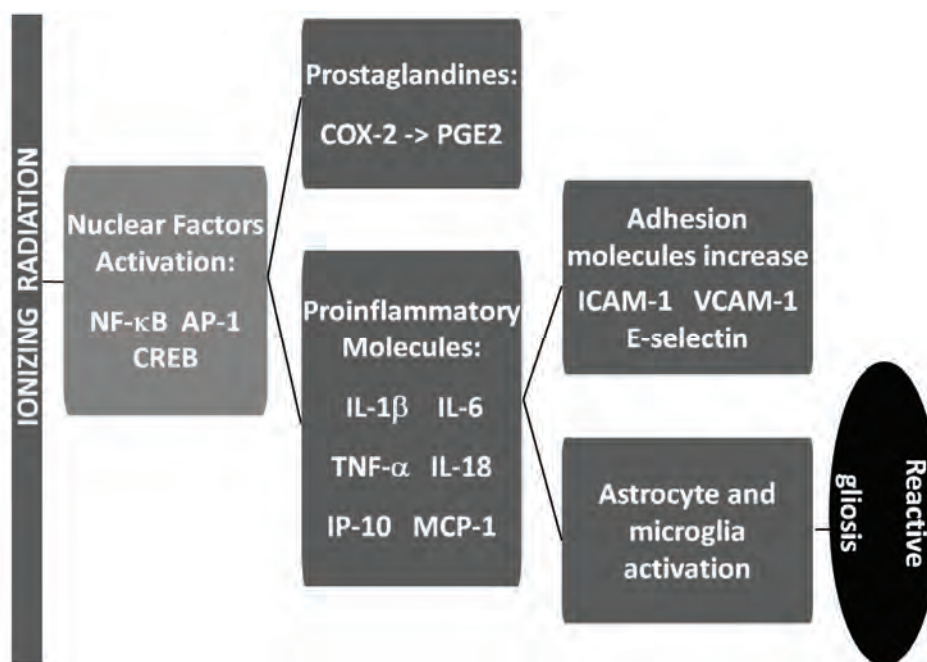


Fig. (1). Diagram of inflammatory events after ionizing radiation exposure in mammalian brain. The ionizing radiation activates nuclear factors that promote the synthesis of prostanoids and pro-inflammatory molecules. These cytokines can facilitate the up-regulation of adhesion molecules and induce astrocyte and microglia activation. Reactive gliosis is the consequence of these events, and it has been proposed that cytokines are the main effectors of such phenomena.

astrocytes as determined through the use of markers such as Mac-1 and glial fibrillary acidic protein (GFAP), respectively [22]. It has been determined that GFAP immunostaining increases in astrocytes at 6 and 24 hrs after whole-brain irradiation with 15 Gy (Table 3). Additionally, irradiated astrocyte cultures showed morphological changes only when they were left in mixed cultures with irradiated microglial cells, which suggests that this interaction is crucial for radiation-induced gliosis in the brain [32].

Prostanoids

The literature on inflammation has emphasized the role of microglia activation preceding astrogliosis *via* PGE2 and COX-2 production. COX-2 is important in the production of prostanoids, including PGE2, a major mediator of inflammation in the peripheral nervous system, which is associated with BBB breakdown [22, 32]. TNF- α and IL-1 β induce COX-2 expression in cultured astrocytes, which results in the increased production of PGE2 [41]. The expression of COX-2 and PGE2 is reported to increase *in vitro* after the irradiation of microglial cells. The same study also showed that COX-2-selective inhibitors may reduce radiation-reactive gliosis because treatment with such drugs reduces the morphological changes in astrocytes in irradiated cultures [32].

In summary, the induction of pro-inflammatory factors in the brain can differ according to the dose of radiation received, the brain region, and the time that has elapsed since irradiation (Table 3). However, it is relevant to note that the opposite effect has been reported for low doses of ionizing radiation. Namely, low doses (< 6 Gy) in fractions between 0.5 Gy-1.0 Gy may be used as treatment for inflammation in the joints or abscesses due to the associated anti-inflammatory effects (for further reading see [42]).

Moreover, the increased expression of transforming growth factor- β (TGF- β) and IL-6 has been proposed as an anti-inflammatory mechanism because the up-regulation of these markers has been related to the decreased adhesion of peripheral blood mononuclear cells, which was observed after low-dose irradiation [42].

Finally, it is noteworthy that transcription factors and pro-inflammatory cytokines are clearly induced by the same doses of radiation related with the RSS (13.2-24 Gy in a single fraction) (Table 3). However, the doses described here are reported to induce less neurotoxic effects such as myelopathy [2]. The further evaluation of other immune markers is required to understand the selective inhibitory pathways that may be involved in the reported differences between early and late molecular profiles [23].

Other Mechanisms of Radiation Injury

As previously mentioned, other processes may contribute to inflammation and, thereby, generate the delayed effects induced by radiation. Depending on the animal model, a single dose of 10 Gy to the brain can be considered to be under the threshold for vascular changes, demyelination or radionecrosis, but this dose may be sufficient to inhibit neural precursor cell proliferation [43]. It has been proposed that changes in neurogenesis play a critical role in the cognitive deficits induced by radiation [44]. Populations of hippocampal precursor cells are considerably damaged in a dose-dependent manner after whole-brain irradiation, even after doses as small as 2 Gy [20, 37, 43, 44]. This is most likely because irradiation inhibits neural precursor cell proliferation by disrupting the microenvironment necessary to support neurogenesis [43]. Various other effects such as microglial activation as well as a dramatic chronic inflammatory response have been shown to be closely

related to this failure [38, 43]. Multipotential stem cells can differentiate into neurons, astrocytes or oligodendrocytes and act as a population of undifferentiated reserve cells that can be recruited after tissue injury; a lack of this reserve may be closely associated with radiation damage [2]. Recently, neuronal loss has also become relevant in the context of brain radiation injury. It has been demonstrated that brain radiation directly induces acute cell death *in vivo*. This mainly involves death of the subependymal neural stem cells but also involves the death of oligodendrocyte type-2 astrocyte (O-2A) progenitors (immature oligodendrocytes) and oligodendrocytes [39, 45, 46].

Neuronal loss is not a primary effect of irradiation; it has rather been considered as previously mentioned as a consequence of chromosomal damage, changes in gene expression and depletion of the stem-cell population. Therefore, the use of ionizing radiation leads to *in vitro* neuronal death mainly *via* the apoptotic pathway. Some have suggested that the main targets of ionizing radiation are endothelial cells and oligodendrocytes and that their response clearly depends on dose and time [25]. It has been observed that glial cells undergo apoptosis 24 hrs after irradiation of the rat spinal cord with doses ranging from 1 to 30 Gy; there is even a significant decrease in oligodendroglial density at 8 hrs after irradiation [25]. Maintenance of the BBB is also dependent on endothelial cells and their interaction with astrocytes; therefore, vascular damage is one of the crucial components that lead to radiation necrosis after high doses [27]. Similarly, it has been reported that rats with whole-brain irradiation exhibit a 15% reduction in endothelial cell density between 24 hrs and 4 weeks after radiotherapy [47]. Vessel dilation, increased permeability, thickening of the vessel wall and necrosis are dose-dependent processes that are visibly present at higher doses (50-120 Gy) [27].

Notably, gap junctions in the CNS are intracellular communications that allow for electrical coupling, which facilitates the transfer of small molecules. Azzam and colleagues [48] have demonstrated the participation of gap junction communication in transmission of the damage signal produced by α -particles transmitted to non-irradiated cells from irradiated cells. Gap junctions are formed by hemichannels composed of a family of proteins called connexins (Cx). Cells in culture show a significant up-regulation of one Cx isoform (Cx43) after irradiation (α -particles and γ -rays) with 1 to 24 Gy; this up-regulation may be correlated with an increase in functional communication through gap junctions [49]. This evidence suggests that connexins could participate in the extension of radiation damage or the by-stander effect. Likewise, synaptic efficacy and spike generation are modified in hippocampal slices, which show that the electrical responses in brain slices are impaired by radiation [50]. This finding demonstrates that ionizing radiation can directly alter the integrated functional activity of neurons. Although the presence of inflammation markers and the disruption of neurogenesis are more clearly present after the application of doses related to RSS, other mechanisms associated with the brain's responses to ionizing radiation cannot be excluded from a discussion of the etiology of RSS.

Inflammation and Sleep

Sleep has been defined as a functional and reversible state characterized by greatly reduced responsiveness and rapid reversibility [51]. This state seems to be involved in cellular recovery, energy conservation, ecological adaptations, learning and synaptic plasticity [52]. Neuronal activity in the CNS undergoes a variety of changes throughout the sleep-wake cycle; these changes are modulated by a complex interaction between different neurotransmission systems located mainly throughout the brainstem, hypothalamus and basal forebrain [53, 54]. In mammals, sleep is clearly divided into two states according to behavioral, physiological and electrographic criteria: non-rapid eye movement (NREM) sleep and rapid eye movement (REM) sleep. Wakefulness is characterized by desynchronized cortical activity with high-frequency and low-amplitude waves simultaneously associated with cognitive, motor and perceptual processing. During NREM sleep, EEG oscillations become relatively larger in amplitude and slower in frequency, whereas during REM sleep, the cortical EEG resembles the desynchronized pattern of wakefulness; however, the latter is characterized by rapid eye movements and muscle atonia. Although several neurotransmitters have been widely involved in sleep regulation, there are some molecules that are considered to induce sleep. Certain cytokines seem to play an important role in the immune response and in sleep promotion. Interestingly, it has been demonstrated that cytokines are produced in the peripheral organs and brain specifically by glia and neurons, and therefore exhibit autocrine and paracrine functions [55].

During the last 25 years, several studies have revealed a close relationship between immune signaling and sleep. The CNS presents receptors for several cytokines and many of these (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IL-18, TNF- α , TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ) promote sleep, even when administered experimentally (Table 4) (reviewed in [56, 57]). For example, in several species, the central or systemic injection of IL-1 β or TNF α increases the duration of NREM sleep and enhances EEG delta power, which is considered an indicator of the intensity of NREM sleep [58]. In contrast, the inhibition of either IL-1 β or TNF α results in sleep loss [59]. Additionally, when cytokine receptors are inhibited by blockers, antagonists, soluble receptors or target deletions (knockout models), the length of sleep is clearly reduced [60, 61]. On the other hand, cytokines with certain immunosuppressive functions such as IL-4, IL-10, IL-13 and TGF- β are proven to suppress sleep [59, 62]. In general, Th1 (type 1 helper lymphocyte) cytokines promote NREM sleep and increase sleepiness, while Th2 (type 2 helper lymphocytes) impair the individual's ability to sleep [62, 63]. It is well known that in patients with immune challenges such as pathological diseases, there are altered concentrations of cytokines in the periphery and brain that correlate with changes in the sleep-wake cycle. However, sleep deprivation seems to alter the immune response by modifying vaccine effectiveness as well as the response to antigens; conversely, these responses are clearly enhanced by sufficient sleep [64, 65]. It has been demonstrated that endotoxins such as LPS, which represent an identified immune challenge, increase the duration of

NREM sleep in animal models and humans [66]. This finding is related to the fact that TNF- α expression is immediately induced after immune challenge while IL-1 β expression is induced a few hours later; both cytokines induce and regulate each other [67]. Sleep may also be promoted during infection *via* cytokines to facilitate fever induction. Namely, NREM sleep limits locomotion but allows the individual to shiver; this permits the energy conservation that is necessary to increase body temperature, all to promote recovery [68]. Although all mentioned cytokines seem to have an effect on the sleep-wake cycle, TNF- α and IL-1 β in particular have been considered as sleep-regulating molecules because they have shown a circadian pattern that presents peaks associated with physiological sleep periods [69, 70]. Likewise, diurnal variations in cytokine receptors such as IL-1R have also been reported [71].

In addition, other molecules such as adenosine, prostaglandin D2 (PGD2), growth hormone-releasing hormone (GHRH) and NO have been involved in sleep regulation because their synthesis and release variations correlate with the sleep-wake cycle [72]. Studies with knockout mice have shown that a lack of NOS reduces the length of both NREM and REM sleep periods in comparison to corresponding controls [73]. Other works have revealed that NO is involved in the induction of GH release from the pituitary by GHRH; moreover, GH is well known to serve as a sleep-regulating substance [74]. PPAR- α is implicated in inflammatory processes and it has also been related to sleep because oleoylethanolamide, an endogenous molecule that binds to PPAR- α , significantly reduced the total duration of REM sleep and showed a tendency to increase wakefulness and reduce the duration of NREM sleep [75]. Furthermore, chronic treatment with bezafibrate, a PPAR- α agonist, increases the duration of NREM sleep and EEG delta-power [76].

The mechanisms by which cytokines participate in sleep processes are still unclear; Krueger [57] postulated that under normal conditions, the local release of cytokines is stimulated by the accumulation of ATP associated with neuronal activity. This contributes to collective electrical changes that promote sleep. Alternatively, cytokines may interact with sleep-regulating systems *via* effects on various molecular intermediates, neuropeptides, and neurotransmitters [62]. Several studies have reported an interaction between IL-1 β and the serotonergic system as well as the GABA-ergic system; it has also been shown that other neurotransmitters such as acetylcholine, glutamate, adenosine and monoamines also interact with IL-1 β [68]. The enhancement of NREM sleep by IL-1 β may be related to its actions in several brain regions related to sleep regulation such as the dorsal raphe nucleus (DRN), preoptic area of the hypothalamus and basal forebrain [68]. Thus, IL-1 β and TNF- α may elicit their actions mainly in sleep-promoting regions (such as the hypothalamic preoptic area and basal forebrain), where these molecules can initiate a complex biochemical cascade that includes expression of the transcription factor NF- κ B as well as iNOS, GHRH, PGD2 and adenosine receptors among others [57]. Furthermore, classical studies have demonstrated that the infusion of IL-1 β or TNF- α in the basal forebrain increases the total amount of NREM sleep. This increase is blocked completely

by the administration of a COX inhibitor. Thus, it has been proposed that IL-1 β and TNF- α induce NREM sleep *via* the production of PGD2 mediated by COX-2 [77].

Inflammation and RSS

As previously mentioned, radiotherapy is still one of the main treatments for intracranial neoplasms, but its benefits are often limited by its adverse effects in normal brain tissue. Even when it has been commonly ignored, RSS represents a clinical indicator of underlying mechanisms in radiation injury. Whereas the clinical and histopathological features of radiation-induced brain injury are well known, the pathogenesis of the associated damage remains unclear. RSS implies three very complex, closely related phenomena: ionizing radiation, inflammation and the sleep-wake cycle; however, each of these events remains to be elucidated. Obviously, the more we know about the pathogenesis of radiation brain injury, the better we will understand all of its associated clinical symptoms and the more effectively we will be able to improve its therapeutic applications.

RSS has generally been reported more in children; nevertheless, these clinical studies are often complex and involve several pathological and pharmacological conditions that limit our conclusions regarding the role of ionizing radiation in the induction of sleep-wake disturbances. Animal models will be necessary to evaluate these effects in non-pathological conditions; namely, animal models will allow for better control of variables and for the elaboration of electrographic measures to quantify any sleep-wake cycle alterations experienced by the patient after brain irradiation.

The doses of radiation implied in RSS (13.2-24 Gy in single doses and 44-55 Gy with the fractionated scheme) induce a clear profile of cytokines and inflammation markers (Table 3). Such molecules have also been implicated in sleep-wake pattern changes and are considered as somnogenic substances (Table 4). IL-1 β and TNF- α are the most frequently described sleep-wake regulating cytokines; these molecules have also been measured experimentally after exposure of the brain to ionizing radiation. They have even been implicated as central mediators of others anorexic responses as observed after RSS. Although there is a lack of detailed information about the inflammatory profile observed in the brain after WBRT in humans, magnetic resonance imaging has demonstrated expanding delayed inflammatory lesions during the first year after irradiation in patients and experimental animals [78]. Therefore, it may be expected that changes in cytokines profiles are also present after WBRT.

Although inflammatory profiles have been measured *in vitro* and *in vivo* primarily over the short term after brain irradiation, extended long-term research protocols are needed to investigate subacute effects such as RSS. A close relationship between radiation and inflammation would implicate that sleep disturbances or RSS may be a sign of inflammatory changes. In support of this hypothesis, larger increases in brain cytokines and adhesion molecules have been described in younger rats as compared to older ones [33], which suggests that the inflammatory response induced by brain irradiation decreases with age. This fact may explain why RSS has been described more widely in

pediatric patients. Finally, treatment with steroids reduces RSS incidence; this confirms that a number of neurologic symptoms due to ionizing radiation are improved by the use of anti-inflammatory treatment.

Other Mechanisms for RSS

Inflammation is clearly related to modifications in sleep-wake patterns or RSS, but other mechanisms triggered by ionizing radiation may contribute to this phenomenon. Radiation doses have been optimized to reduce cell death; however, cell loss is inevitable after high dosage. This cell death could occur in nuclei regulating sleep or wakefulness or even in thalamic or cortical areas, thus contributing to RSS pathogenesis and generating differences in electrographic sleep patterns. Nevertheless, this seems unlikely because RSS has been reported after lower doses of radiation, and these doses are most likely related with low rates of cell death. As previously mentioned, certain effects on brain gap junctions have been associated with exposure to radiation. Recent reviews highlight the role of Cx in the regulation of acute and chronic inflammatory processes [79]. Specifically, *in vitro* treatment with a proinflammatory cocktail containing TNF- α and IL-1 β induces Cx43 activation in astroglial cells [80]. Although there are no studies about the role of Cx43 in sleep, it has been demonstrated that Cx36 may participate in sleep processes because the blockage of gap junctions formed by Cx36 modifies sleep architecture in the rat [81]. However, impaired neurogenesis has been reported even after low doses of ionizing radiation; such processes may even be associated with sleep disturbances because the prolonged disruption of sleep suppresses both hippocampal cell proliferation and neurogenesis [82]. Furthermore, the close relationship between hippocampal neurogenesis and cognitive processes has been well described; however, supplementary work is still needed to identify any correlation between neurogenesis and sleep-wake cycle modifications after brain irradiation. It has been more commonly proposed that demyelination is implicated in RSS but, at the present time, this hypothesis has not been evaluated in the reported cases of RSS; therefore, further investigations of the matter are still required. iNOS is thought to participate in sleep regulation and is also involved in demyelination processes [83]. Despite these findings, no iNOS mRNA or NO changes have been reported in the brain after irradiation. Further experiments with different doses and times after radiation are still needed before excluding the possibility of NO involvement in brain radiation injury and RSS [84].

CONCLUSION

The brain's response to radiation injury implies a very complex network of molecular and cellular mechanisms occurring simultaneously over the short and long term and which may interact to generate behavioral disturbances such as RSS. Although other processes such as radionecrosis, edema, demyelination or extended cell death have been described for high doses of radiation, it is clear that inflammatory processes and impaired neurogenesis are present for a wider range of doses as demonstrated in *in vivo* and *in vitro* models. For this reason, RSS as well as other

mid- and long-term post-radiation symptoms present after mild doses may be strongly related to the inflammatory response. The studies presented here have measured the levels of pro-inflammatory markers after irradiation; these markers are proven to play a relevant role in sleep-wake regulation among other processes. Notably, post-irradiation responses may correlate with several other processes that accompany the inflammatory response.

Finally, a better understanding of the role of the immune response in brain injury and its clinical and behavioral implications is necessary, as this would broaden our knowledge of brain irradiation sequelae with the aim of ultimately reducing its effects on the patient's quality of life.

ABBREVIATIONS

ALL	= Acute lymphoblastic leukemia
AP-1	= Activating protein 1
BBB	= Blood-brain barrier
Bcl-2	= B-cell lymphoma 2
CNS	= Central nervous system
COX	= Cyclooxygenase
CREB	= cAMP response element-binding protein
Cx	= Connexins
DRN	= Dorsal raphe nucleus
ECAMs	= Endothelial cell adhesion molecules
EEG	= Electroencephalographic
Fx	= Fraction
GABA	= Gamma-aminobutyric acid
GFAP	= Glial fibrillary acid protein
GH	= Growth hormone
GHRH	= Growth hormone-releasing hormone
Gy	= Grays
Hmox1	= Heme oxygenase 1
ICAM-I	= Intercellular adhesion molecule-1
IFN	= Interferon
IFN- γ R	= Interferon-gamma-receptor
IL	= Interleukin
iNOS	= Inducible nitric oxide synthase
KO	= Knock out
LPS	= Lipopolysaccharide
MCP-1	= Monocyte chemotactic protein-1
MMP-9	= Matrix metalloproteinase-9
NF- κ B	= Nuclear factor kappa B
NO	= Nitric oxide
NREM	= Non-rapid eye movement sleep
O-2A	= Oligodendrocyte type-2 astrocyte
PGD2	= Prostaglandin-D2

PGE2	= Prostaglandin-E2
PPAR	= Peroxisomal proliferator activated receptors
REM	= Rapid eye movement sleep
ROS	= Reactive oxygen species
RSS	= Radiation somnolence syndrome
RTOG	= Radiation Therapy Oncology Group
RT-PCR	= Reverse transcription polymerase chain reaction technique
SOD	= Superoxide dismutase
TGF-β	= Transforming growth factor beta
Th1	= Type 1 helper lymphocyte
Th2	= Type 2 helper lymphocyte
TNF	= Tumor necrosis factor
TNF-R p55	= Tumor necrosis factor alfa receptor 1 or p55 (weights 55 kD)
VCAM-I	= Vascular cell adhesion molecule-1
WBRT	= Whole-brain radiotherapy

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare to have no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

REFERENCES

- Soussain, C.; Ricard, D.; Fike, J.R.; Mazon, J.J.; Psimaras, D.; Delattre, J.Y. CNS complications of radiotherapy and chemotherapy. *Lancet*, **2009**, 374(9701), 1639-1651.
- Tofilon, P.; Fike, J. The radioresponse of the central nervous system: a dynamic process. *Radiat. Res.*, **2000**, 153(4), 357-370.
- Douw, L.; Klein, M.; Fagel, S.S.; van den Heuvel, J.; Taphoorn M.J.; Aaronson, N.K.; Postma, T.J.; Vandertop, W.P.; Mooij, J.J.; Boerman, R.H.; Beute, G.N.; Sluimer, J.D.; Slotman, B.J.; Reijneveld, J.C.; Heimans, J.J. Cognitive and radiological effects of radiotherapy in patients with low-grade glioma: long-term follow-up. *Lancet Neurol.*, **2009**, 8(9), 810-818.
- Ryan, J. Radiation somnolence syndrome. *J. Pediatr. Oncol. Nurs.*, **2000**, 17(1), 50-53.
- Uzal, D.; Ozyar, M.; Hayran, F.; Zorlu, L.; Atahan, L.; Yetkin, S. Reduced incidence of the somnolence syndrome after prophylactic cranial irradiation in children with acute lymphoblastic leukemia. *Radiother. Oncol.*, **1998**, 48(1) 29-32.
- Druckman, A. Shlafscuct als forge der roentgenbestralung beitragszur strahlenempfindlichkeit des gehunda. *Strahlenther.*, **1929**, 33(3) 382-384.
- Freeman, J.E.; Johnston, P.G.; Voke, J.M. Somnolence after prophylactic cranial irradiation in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br. Med. J.*, **1973**, 4(5891), 523-525.
- Littman, P.; Rosenstock, J.; Gale, G.; Krisch, R.E.; Meadows, A.; Sather, H.; Coccia, P.; DeCamargo, B. The somnolence syndrome in leukemic children following reduced daily dose fractions of cranial radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1984**, 10(10), 1851-1853.
- Mandell, L.R.; Walker, R.W.; Steinherz, P.; Fuks, Z. Reduced incidence of the somnolence syndrome in leukemic children with steroid coverage during prophylactic cranial radiation therapy. *Cancer*, **1989**, 63(10), 1975-1978.
- Garwicz, S.; Aronson, S.; Elmqvist, D.; Landberg, T. Postirradiation syndrome and EEG findings in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Acta Paediatr. Scand.*, **1975**, 64(3), 399-403.
- Faithfull, S.; Brada, M. Somnolence syndrome in adults following cranial irradiation for primary brain tumors. *Clin. Oncol.*, **1998**, 10(4), 250-254.
- Kelsey, C.R.; Marks, L.B. Somnolence syndrome after focal radiation therapy to the pineal region: case report and review of the literature. *J. Neurooncol.*, **2006**, 78(2), 153-156.
- Tamaroff, M. Salwen, R.; Miller, D.; Murphy, M.L.; Nit, Y. Neuropsychological sequelae in irradiated(1800 rads and 2400 rads) and non-irradiated children with acute lymphoblastic leukemia(ALL). *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **1985**, 4(165), C644.
- Waber, D.P.; Tarbell, N.J.; Fairclough, D.; Atmore, K.; Castro, R.; Isquith, P.; Lussier, F.; Romero, I.; Carpenter, P.J.; Schiller, M. Cognitive sequelae of treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia: cranial radiation requires an accomplice. *J. Clin. Oncol.*, **1995**, 13(10), 2490-2496.
- Ch'ien, L.T.; Aur, R.J.; Stagner, S.; Cavallo, K.; Wood, A.; Goff, J.; Pitner, S.; Hustu, H.O.; Seifert, M.J.; Simone, J.V. Long term neurological implications of somnolence syndrome in children with acute lymphocytic leukemia. *Ann. Neurol.*, **1980**, 8(3), 273-277.
- Stickgold, R. Sleep-dependent memory consolidation. *Nature*, **2005**, 437(7063), 1272-1278.
- Rosen, G.M.; Bendel, A.E.; Neglia, J.P.; Moertel, C.L.; Mahowald, M. Sleep in children with neoplasms of the central nervous system: case review of 14 children. *Pediatrics*, **2003**, 112(1), e46-e54.
- Rogers, L.Q.; Courneya, K.S.; Robbins, K.T.; Rao, K.; Malone, J.; Seiz, A.; Reminger, S.; Markwell, S.J.; Burra, V. Factors associated with fatigue, sleep and cognitive function among patients with head and neck cancer. *Head Neck*, **2008**, 30(10), 1310-1317.
- Mehanna, H.M.; Morton, R.P. Does quality of life predict long-term survival in patients with head and neck cancer? *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **2006**, 132(1), 27-31.
- Barani, I.J.; Benedict, S.H.; Lin, P.S. Implications for the conventional radiotherapy of central nervous system malignancies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **2007**, 68(2), 324-333.
- Hall, E.J.; Giaccia, A.J. *Radiobiology for the Radiologist*. 6th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, **2006**, pp. 5-30.
- Kyrkanides, S.; Olschowka, J.A.; Williams, J.P.; Hansen, J.T.; O'Banion, M.K. TNF-alpha and IL-1beta mediate intercellular adhesion molecule-1 induction via microglia-astrocyte interaction in CNS radiation injury. *J. Neuroimmunol.*, **1999**, 95(1-2), 95-106.
- Chiang, C.S.; Hong, J.H.; Stalder, A.; Sun, J.R.; Withers, H.R.; McBride, W.H. Delayed molecular responses to brain irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, **1997**, 72(1), 45-53.
- Chiang, C.S.; McBride, W.H. Radiation enhances tumor necrosis factor alpha production by murine brain cells. *Brain Res.*, **1991**, 566(1-2), 265-269.
- Li, Y.Q.; Jay, V.; Wong, C.S. Oligodendrocytes in the adult rat spinal cord undergo radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.*, **1996**, 56(23), 5417-5422.
- Daigle, J.L.; Hong, J.H.; Chiang, C.S.; McBride, W.H. The role of tumor necrosis factor signaling pathways in the response of murine brain to irradiation. *Cancer Res.*, **2001**, 61(24), 8859-8865.
- Nieder, C.; Andratschke, N.; Astner, S.T. Experimental concepts for toxicity prevention and tissue restoration after central nervous system irradiation. *Radiat. Oncol.*, **2007**, 2, 23.
- Lee, W.H.; Sonntag, W.E.; Mitschelen, M.; Yan, H.; Lee, Y.W. Irradiation induces regionally specific alterations in pro-inflammatory environments in rat brain. *Int. J. Radiat. Biol.*, **2010**, 86(2), 132-144.
- Gaber, M.W.; Sabek, O.M.; Fukatsu, K.; Wilcox, H.G.; Kiani, M.F.; Merchant, T.E. Differences in ICAM-1 and TNF-alpha expression between large single fraction and fractionated irradiation in mouse brain. *Int. J. Radiat. Biol.*, **2003**, 79(5), 359-366.
- Hong, J.H.; Chiang, C.S.; Campbell, I.L.; Sun, J.R.; Withers, H.R.; McBride, W.H. Induction of acute phase gene expression by brain irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1995**, 33(3) 619-626.
- Dinarelo, C.A. Immunological and inflammatory functions of the Interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.*, **2009**, 27, 519-550.
- Hwang, S.Y.; Jung, J.S.; Kim, T.H.; Lim, S.J.; Oh, E.S.; Kim, J.Y.; Ji, K.A.; Joe, E.H.; Cho, K.H.; Han, I.O. Ionizing radiation induces astrocyte gliosis through microglia activation. *Neurobiol. Dis.*, **2006**, 21(3), 457-467.

- [33] Lee, W.H.; Sonntag, W.E.; Lee, Y.W. Aging attenuates radiation-induced expression of pro-inflammatory mediators in rat brain. *Neurosci. Lett.*, **2010**, *476*(2), 89-93.
- [34] Wilson, C.M.; Gaber, M.W.; Sabek, O.M.; Zawaski, J.A.; Merchant, T.E. Radiation-induced astrogliosis and blood-brain barrier damage can be abrogated using anti-TNF treatment. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **2009**, *74*(3), 934-941.
- [35] Yuan, H.; Gaber, M.W.; McColgan, T.; Naimark, M.D.; Kiani, M.F.; Merchant, T.E. Radiation-induced permeability and leukocyte adhesion in the rat blood-brain barrier: modulation with anti-ICAM-1 antibodies. *Brain Res.*, **2003**, *969*(1-2), 59-69.
- [36] Ramanan, S.; Zhao, W.; Riddle, D.R.; Robbins, M.E. Role of PPARs in radiation-induced brain injury. *PPAR Res.*, **2010**, *234975*, 1-12.
- [37] Ramanan, S.; Kooshki, M.; Zhao, W.; Hsu, F.C.; Robbins, M.E. PPARalpha ligands inhibit radiation-induced microglial inflammatory responses by negatively regulating NF-kB and AP-1 pathways. *Free Radic. Biol. Med.*, **2008**, *45*(12), 1695-1704.
- [38] Travis, E.L. Organizational response of normal tissues to irradiation. *Semin. Radiat. Oncol.*, **2001**, *11*(3), 184-196.
- [39] Panagiotakos, G.; Alshamy, G.; Chan, B.; Abrams, R.; Greenberg, E.; Saxena, A.; Bradbury, M.; Edgar, M.; Gutin, P.; Tavar, V. Long-term impact of radiation on the stem cell and oligodendrocyte precursors in the brain. *PLoS One*, **2007**, *2*(7), e588.
- [40] Fike, J.R.; Rosi, S.; Limoli, C.L. Neural precursor cells and CNS radiation sensitivity. *Semin. Radiat. Oncol.*, **2009**, *19*(2), 122-132.
- [41] Kyrkanides, S.; Moore, A.H.; Olschowka, J.A.; Daeschner, J.C.; Williams, J.P.; Hansen, J.T.; Kerry O'Banion, M. Cyclooxygenase-2 modulates brain inflammation-related gene expression in central nervous system radiation injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **2002**, *104*(2), 159-169.
- [42] Roedel, F.; Kley, N.; Beuscher, H.U.; Hildebrandt, G.; Keilholz, L.; Kern, P.; Voll, R.; Herrmann, M.; Sauer, R. Anti-inflammatory effect of low-dose X-irradiation and the involvement of a TGF-beta1-induced down-regulation of leukocyte/endothelial cell adhesion. *Int. J. Radiat. Biol.*, **2002**, *78*(8), 711-719.
- [43] Monje, M.L.; Mizumatsu, S.; Fike, J.R.; Palmer, T.D. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat. Med.*, **2002**, *8*(9), 955-962.
- [44] Rola, R.; Raber, J.; Rizk, A.; Otsuka, S.; VandenBerg, S.R.; Morhardt, D.R.; Fike, J.R. Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Exp. Neurol.*, **2004**, *188*(2), 316-330.
- [45] van der Maazen, R.W.; Kleiboer, B.J.; Verhagen, I.; van der Kogel, A.J. Irradiation *in vitro* discriminates between different O-2A progenitor cell subpopulations in the perinatal central nervous system of rats. *Radiat. Res.*, **1991**, *128*(1), 64-72.
- [46] van der Maazen, R.W.; Kleiboer, B.J.; Verhagen, I.; van der Kogel, A.J. Repair capacity of adult rat glial progenitor cells determined by an *in vitro* clonogenic assay after *in vitro* or *in vivo* fractionated irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, **1993**, *63*(5), 661-666.
- [47] Ljubimova, N.V.; Levitman, M.K.; Plotnikova, E.D.; Eidus, L.K. Endothelial cell population dynamics in rat brain after local irradiation. *Br. J. Radiol.*, **1991**, *64*(766), 934-940.
- [48] Azzam, E.I.; de Toledo, S.M.; Little, J.B. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*(2), 473-478.
- [49] Azzam, E.I.; de Toledo, S.M.; Little, J.B. Expression of Connexin43 is highly sensitive to ionizing radiation and other environmental stresses. *Cancer Res.*, **2003**, *63*(21), 7128-7135.
- [50] Tolliver, J.M.; Pellmar, T.C. Ionizing radiation alters neuronal excitability in hippocampal slices of the guinea pig. *Radiat. Res.*, **1987**, *112*(3), 555-563.
- [51] Siegel, J.M. Sleep viewed as a state of adaptive inactivity. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2009**, *10*(10), 747-753.
- [52] Mignot, E. Why we sleep: the temporal organization of recovery. *PLoS Biol.*, **2008**, *6*(4), e106.
- [53] Saper, C.B.; Scammell, T.E.; Lu, J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, **2005**, *437*(7063), 1257-1263.
- [54] Jones, B.E. From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2005**, *26*(11), 578-586.
- [55] Morganti-Kossmann, M.C.; Lenzlinger, P.M.; Hans, V.; Stahel, P.; Csuka, E.; Ammann, E.; Stocker, R.; Trentz, O.; Kossmann, T. Production of cytokines following brain injury: beneficial and deleterious for the damaged tissue. *Mol. Psychiatry*, **1997**, *2*(2), 133-136.
- [56] Krueger, J.M.; Fang, J.; Hansen, M.K.; Zhang, J.; Obál, F. Humoral regulation of sleep. *News Physiol. Sci.*, **1998**, *13*, 189-194.
- [57] Krueger, J.M. The role of cytokines in sleep regulation. *Curr. Pharm. Des.*, **2008**, *14*(32), 3408-3416.
- [58] Shoham, S.; Davenne, D.; Cady, A.B.; Dinarello, C.A.; Krueger, J.M. Recombinant tumor necrosis factor and interleukin 1 enhance slow-wave sleep. *Am. J. Physiol.*, **1987**, *253*(1), R142-R149.
- [59] Krueger, J.M.; Obál, F.J.; Fang, J.; Kubota, T.; Taishi, P. The role of cytokines in physiological sleep regulation. *Ann. NY Acad. Sci.*, **2001**, *933*, 211-221.
- [60] Fang, J.; Wang, Y.; Krueger, J.M. Effects of interleukin-1beta on sleep are mediated by the type I receptor. *Am. J. Physiol.*, **1998**, *274*(3), R655-R660.
- [61] Krueger, J.M.; Majde, J.A. Humoral links between sleep and the immune system. *Ann. NY Acad. Sci.*, **2003**, *99*, 9-20.
- [62] Marshall, L.; Born, J. Brain-immune interactions in sleep. *Int. Rev. Neurobiol.*, **2002**, *52*, 93-131.
- [63] Fang, B.J.; Tonelli, L.H.; Soriano, J.J.; Postolache, T.T. Disturbed sleep: linking allergic rhinitis, mood and suicidal behavior. *Front. Biosci.*, **2010**, *2*, 30-46.
- [64] Spiegel, K.; Sheridan, J.F.; Van Cauter, E. Effect of sleep deprivation on response to immunization. *JAMA*, **2002**, *288*(12), 1471-1472.
- [65] Moldofsky, H. Central nervous system and peripheral immune functions and the sleep wake system. *J. Psychiatry Neurosci.*, **1994**, *19*(5), 368-374.
- [66] Krueger, J.M. Somnogenic activity of immune response modifiers. *Trends Pharmacol. Sci.*, **1990**, *11*(3), 122-126.
- [67] Dinarello, C.A. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv. Immunol.*, **1989**, *44*, 153-205.
- [68] Imeri, L.; Opp, M.R. How (and why) the immune system makes us sleep. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2009**, *10*(3), 199-210.
- [69] Churchill, L.; Rector, D.M.; Yasuda, K.; Fix, C.; Rojas, M.J.; Yasuda, T.; Krueger, J.M. Tumor necrosis factor alpha: activity dependent expression and promotion of cortical column sleep in rats. *Neuroscience*, **2008**, *156*(1), 71-80.
- [70] Hight, K.; Hallett, H.; Churchill, L.; De, A.; Boucher, A.; Krueger, J.M. Time of day differences in the number of cytokine, neurotrophin and NeuN-immunoreactive cells in the rat somatosensory or visual cortex. *Brain Res.*, **2010**, *1337*, 32-40.
- [71] Beynon, A.L.; Coogan, A.N. Diurnal, age, and immune regulation of interleukin-1b and interleukin-1 type 1 receptor in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Chronobiol. Int.*, **2010**, *27*(8), 1546-1563.
- [72] Obál, F.; Krueger, J.M. Biochemical regulation of non-rapid-eye-movement sleep. *Front. Biosci.*, **2003**, *8*, d520-550.
- [73] Chen, L.; Majde, J.A.; Krueger, J.M. Spontaneous sleep in mice with targeted disruptions of neuronal or inducible nitric oxide synthase genes. *Brain Res.*, **2003**, *973*(2), 214-222.
- [74] McCann, S.M.; Kimura, M.; Karanth, S.; Yu, W.H.; Mastronardi, C.A.; Rettori, V. The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection. *Ann. NY Acad. Sci.*, **2000**, *917*, 4-18.
- [75] Soria-Gómez, E.; Guzmán, K.; Pech-Rueda, O.; Montes-Rodríguez, C.J.; Cisneros, M.; Prospéro-García, O. Oleoylethanolamide affects food intake and sleep-waking cycle through a hypothalamic modulation. *Pharmacol. Res.*, **2010**, *61*(5), 379-384.
- [76] Chikahisa, S.; Tominaga, K.; Kawai, T.; Kitaoka, K.; Oishi, K.; Ishida, N.; Rokutan, K.; Sei, H. Bezafibrate, a peroxisome proliferator-activated receptors agonist, decreases body temperature and enhances electroencephalogram delta-oscillation during sleep in mice. *Endocrinology*, **2008**, *149*(10), 5262-5271.
- [77] Terao, A.; Matsumura, H.; Yoneda, H.; Saito, M. Enhancement of slow-wave sleep by tumor necrosis factor-alpha is mediated by cyclooxygenase-2 in rats. *Neuroreport*, **1998**, *9*(17), 3791-3796.
- [78] Jiráček, D.; Náměstková, K.; Herynek, V.; Liscák, R.; Vymazal, J.; Mares, V.; Sykova, E.; Hajek, M. Lesion evolution after gamma knife irradiation observed by magnetic resonance imaging. *Int. J. Radiat. Biol.*, **2007**, *83*(4), 237-244.
- [79] Scheckenbach, K.E.; Crespín, S.; Kwak, B.R.; Chanson, M. Connexin channel-dependent signaling pathways in inflammation. *J. Vasc. Res.*, **2011**, *48*(2), 91-103.
- [80] Froger, N.; Orellana, J.A.; Calvo, C.F.; Amigou, E.; Kozoriz, M.G.; Naus, C.C.; Saez, J.C.; Giaume, C. Inhibition of cytokine-induced

- connexin43 hemichannel activity in astrocytes is neuroprotective. *Mol. Cell Neurosci.*, **2010**, *45*(1), 37-46.
- [81] Franco-Perez, J.; Paz, C. Quinine, a selective gap junction blocker, decreases REM sleep in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **2009**, *94*(2), 250-254.
- [82] Junek, A.; Rusak, B.; Semba, K. Short-term sleep deprivation may alter the dynamics of hippocampal cell proliferation in adult rats. *Neuroscience*, **2010**, *170*(4), 1140-1152.
- [83] Merrill, J.E.; Ignarro, L.J.; Sherman, M.P.; Melinek, J.; Lane, T.E. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J. Immunol.*, **1993**, *151*(4), 2132-2141.
- [84] Goldberg, S.L.; Tefferi, A.; Rummans, T.A.; Chen, M.G.; Solberg, L.A.; Noël, P. Post-irradiation somnolence syndrome in an adult patient following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, **1992**, *9*(6), 499-501.

Received: February 1, 2012

Revised: June 9, 2012

Accepted: June 12, 2012



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Principales neurotransmisores involucrados en la regulación del ciclo sueño-vigilia

Javier Franco-Pérez,^{*,**} Paola Ballesteros-Zebadúa,^{*} Verónica Custodio,^{*} Carlos Paz^{*}

* Departamento de Neurofisiología, Unidad de Radioneurocirugía, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

** Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Major neurotransmitters involved in the regulation of sleep-wake cycle

ABSTRACT

Neuronal activity in the central nervous system undergoes a variety of electrophysiological changes along the sleep-wake cycle. These changes are modulated by a complex interaction between different neurochemical systems located throughout the brain. Within brainstem and hypothalamus there are a number of neuronal populations that promote wakefulness through the action of different neurotransmitters like noradrenaline, serotonin, histamine and orexin. These systems act together in the generation and maintenance of wakefulness, however although each one contributes in a unique way no neurotransmitter seems to be absolutely necessary because wakefulness is not completely inhibited in the absence of any of them. On the other hand, neurons located in the hypothalamus and brainstem are involved in initiating and maintaining sleep. These neurons contain neurotransmitters such as acetylcholine and GABA and have projections to nuclei involved in wakefulness regulation. Recently, models have been proposed suggesting that sleep is modulated by flip-flop switches which are characterized by neuronal circuits with different neurotransmitters and that interacting to regulate the initiation and maintenance of the different stages of sleep wake cycle. This review is based on pharmacological, electrophysiological and neurochemical studies with the aim of analyze the major neurotransmitters and the cerebral regions involved in the regulation of wakefulness and different states of sleep.

Key words. Acetylcholine. Adenosine. GABA. Histamine. Noradrenaline. Orexins. Serotonin. Sleep. Wakefulness.

INTRODUCCIÓN

El sueño es un estado funcional natural caracterizado por una reducción de la actividad motora voluntaria, incremento del umbral de respuesta a

RESUMEN

La actividad neuronal en el sistema nervioso central experimenta una gran variedad de cambios electrofisiológicos a lo largo del ciclo sueño-vigilia. Estos cambios son modulados por una compleja interacción entre múltiples sistemas neuroquímicamente distintos localizados a lo largo del cerebro. Dentro del tallo cerebral e hipotálamo existen varias poblaciones neuronales que promueven la vigilia mediante la acción de diferentes neurotransmisores como noradrenalina, serotonina, histamina y orexina. Estos sistemas actúan de manera conjunta en la generación y mantenimiento de la vigilia; sin embargo, aunque cada uno contribuye de manera única, ninguno de éstos parece ser absolutamente necesario, ya que la vigilia no se inhibe completamente en la ausencia de alguno de ellos. En contraste, neuronas localizadas en núcleos específicos del hipotálamo y el tallo cerebral están involucradas en la iniciación y mantenimiento del sueño. Estas neuronas contienen neurotransmisores como acetilcolina y GABA, las cuales proyectan y modulan la actividad de los núcleos involucrados en la regulación de la vigilia. Recientemente, se han propuesto modelos que establecen que el sueño es modulado por interruptores *flip-flop*, los cuales constituyen circuitos neuronales con características neuroquímicas diferentes y que interactúan regulando la iniciación y el mantenimiento de los diferentes estados del ciclo sueño-vigilia. Esta revisión se basa en estudios farmacológicos, electrofisiológicos y neuroquímicos con el objetivo de señalar y analizar los principales neurotransmisores y las estructuras cerebrales hasta ahora involucradas en la regulación de la vigilia y las diferentes etapas del sueño.

Palabras clave. Acetilcolina. Adenosina. GABA. Histamina. Noradrenalina. Orexina. Serotonina. Sueño. Vigilia.

estímulos externos y postura estereotípica. Las diferentes etapas del sueño y la vigilia presentan patrones conductuales, bioquímicos y electrofisiológicos específicos. Incluso, a partir de los registros del EEG se pueden diferenciar las diversas etapas

del sueño gracias a la presencia o ausencia de los llamados ritmos cerebrales:

- Ritmo delta (0.5-3.9 Hz).
- Ritmo theta (4-7.9 Hz).
- Ritmo alfa (8-12.9 Hz).
- Ritmo beta (13-19.9 Hz).
- Ritmo gamma (20-100 Hz).

El sueño normal en el humano comprende dos estados: el sMOR (también llamado sueño REM) y el sueño no MOR, convencionalmente subdividido en tres etapas. En la etapa 1 del sueño no MOR el EEG presenta actividad de bajo voltaje y una frecuencia que combina ritmos alfa y theta. En la etapa 2 la actividad cerebral es predominantemente theta; son característicos de esta fase los husos de sueño (brotes de 0.5 a 2 seg de actividad beta) y los complejos K (ondas bifásicas de gran amplitud). Finalmente, la etapa 3 se caracteriza por presentar actividad delta de gran voltaje, los investigadores a menudo se refieren a esta etapa como SOL, sueño delta o sueño profundo.

Por otra parte, el sueño en modelos experimentales (como la rata) se ha dividido solamente en SOL y sMOR. En los registros corticales se ha notado que el SOL está caracterizado por actividad delta de gran amplitud mientras que en el sMOR se observan ondas rápidas y de bajo voltaje paradójicamente similares a las presentes durante la vigilia (Figura 1).

Y como lo describieron por primera vez Aserinsky y Kleitman,¹ el sMOR también se distingue por la presencia de movimientos oculares rápidos y la ausencia de tono muscular.

A lo largo de la historia se han realizado una gran cantidad de trabajos para determinar las estructuras cerebrales y los sistemas de neurotransmisores involucrados en la regulación de la vigilia y el sueño. Incluso, se conocen varias moléculas como péptidos, citocinas y algunas de naturaleza lipídica, las cuales modifican el sueño y se les ha denominado factores inductores de sueño.² Esta revisión tiene el objetivo de señalar y analizar los principales neurotransmisores y las estructuras cerebrales involucradas en la regulación del ciclo sueño-vigilia. Asimismo, se hace una integración de los diferentes neurotransmisores en modelos previamente descritos, los cuales consisten en circuitos neuronales con características neuroquímicas diferentes y que interactúan modulando la generación o la inhibición de los diferentes estados del ciclo sueño-vigilia.

NA

En los años 60 la demostración histoquímica de la presencia de neuronas noradrenérgicas, específicamente en un núcleo pontino denominado LC, permitió a Jouvet, *et al.*, realizar trabajos pioneros en la regulación del sueño y la vigilia. Dichos estudios demostraron que las lesiones electrolíticas del LC po-

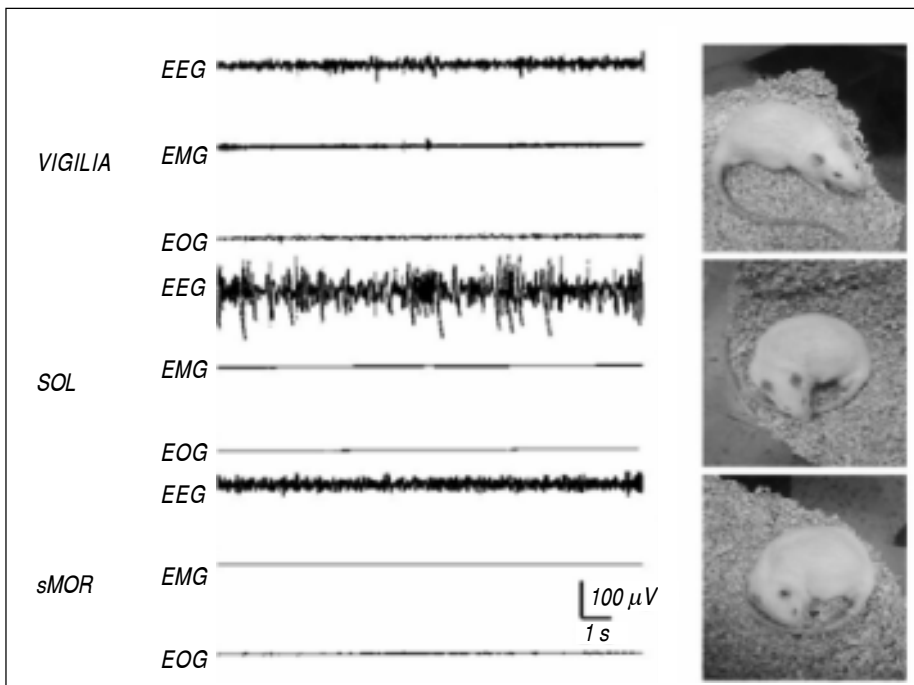


Figura 1. Registro poligráfico de rata adulta. Se muestra la actividad cortical (EEG) del músculo del cuello (EMG) y movimientos oculares (EOG), así como la postura típica de la rata en cada etapa. Durante la vigilia el EEG muestra predominantemente actividad de bajo voltaje (40-60 μV) y alta frecuencia (30-50 Hz). Durante el SOL se presentan ondas de baja frecuencia (0.1-10 Hz) y gran amplitud (200-400 μV). En el sMOR el EEG consiste de ondas de alta frecuencia (20-40 Hz) y baja amplitud (50-80 μV). Tomada de los registros del laboratorio.

dían interrumpir el sMOR e incluso, dependiendo de la extensión de la lesión, se podía eliminar completamente dicho estado. Estos resultados se han revisado, ya que no ha sido posible reproducir tales resultados mediante métodos más finos de lesión del LC. Posteriormente, se determinó que el LC es el sitio principal de proyecciones eferentes a la mayoría de las estructuras del cerebro anterior que son inervadas por neuronas noradrenérgicas.^{3,4} Las neuronas de este núcleo exhiben actividad dependiente del estado, es decir, las tasas de disparo más altas se observan durante la vigilia, tasas casi nulas durante el SOL y el cese completo de la tasa de disparo durante el sMOR.^{5,6} Se ha propuesto que las neuronas noradrenérgicas del LC son un elemento principal en la regulación de la vigilia y los despertares. Los estudios farmacológicos que utilizan diversos agentes para manipular la neurotransmisión noradrenérgica han mostrado que la infusión directa de NA, así como la de los agonistas fenilefrina, isoproterenol y clenbuterol en regiones inervadas por neuronas noradrenérgicas (como el área septal medial y el NPOM), produce incrementos del tiempo total de vigilia.^{7,8} También se ha determinado que las drogas que antagonizan a los receptores noradrenérgicos (como el prazosin, yohimbina y propranolol) incrementan la actividad de ondas lentas en el EEG⁹ y el tiempo total de sMOR en ratas.¹⁰

Las drogas que estimulan la liberación o bloquean la recaptura de NA incrementan o prolongan la vigilia y son usadas para tratar la hipersomnolencia. De éstas, el modafinil es la más usada recientemente, ya que es un agente promotor de la vigilia y está autorizado su uso en pacientes con somnolencia excesiva asociada con narcolepsia, síndrome de apnea obstructiva de sueño y desorden de sueño por turnos de trabajo.¹¹ Todos estos estudios han sugerido que la NA juega un papel importante en la regulación de la vigilia.

5-HT

Las neuronas serotoninérgicas están distribuidas principalmente en los NR, los cuales son grupos de neuronas que se extienden a lo largo del tallo cerebral y proyectan a diferentes regiones del cerebro. A finales de los años 60 este neurotransmisor se involucró en la generación de sueño a partir de los trabajos pioneros de Jouvet.¹² Inicialmente se consideró que participaba únicamente en la regulación del SOL, debido a que la inhibición de la síntesis de 5-HT y la destrucción de neuronas del NR originaba un estado de insomnio total. Esta apreciación ha cambiado por estudios realizados desde entonces en modelos experi-

mentales con gatos y ratas. En ambas especies, la tasa de disparo de las neuronas serotoninérgicas y la concentración de 5-HT extracelular en el rafé dorsal es consistentemente más alta durante la vigilia, disminuye progresivamente a lo largo del SOL y alcanza su mínimo nivel durante el sMOR.^{13,14} Se ha propuesto que este sistema participa en el mantenimiento de la vigilia, dicha afirmación ha sido apoyada por estudios farmacológicos en los cuales se observó que la administración sistémica de agonistas del receptor 5-HT (1A) como 8-OH-DPAT y RU-24969, incrementan la vigilia y reducen el SOL y sMOR.^{15,16} Asimismo, la activación de diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos en el rafé dorsal por medio de diferentes agentes como CP-94253, LP-44 y m-CPBG origina predominantemente supresión del sMOR.¹⁷⁻¹⁹ Por otra parte, se ha determinado que la reducción en la neurotransmisión serotoninérgica mediante la administración de antagonistas como ritanserina, MDL-100907, RO-4368554 y S-32006 incrementa el SOL y disminuye la vigilia.²⁰⁻²² El origen de los cambios en la actividad serotoninérgica en los NR a lo largo del ciclo sueño-vigilia aún no está claramente definido. Sin embargo, se ha propuesto que dicha actividad es regulada por mecanismos GABAérgicos que involucran a los receptores 5-HT(2C)²³ y por la acción de neuropéptidos como las orexinas mediante mecanismos excitatorios directos e inhibitorios indirectos.²⁴

ACh

La importancia del sistema colinérgico en la generación del sMOR fue documentada desde la década de los 60. Hernández-Peón fue el primero en proponer que el sistema colinérgico estaba implicado en la generación del sueño, ya que demostró que la estimulación de diferentes áreas del cerebro con cristales de ACh originaba secuencias completas de sueño, es decir, episodios de SOL seguidos de sMOR.

Estudios más recientes han demostrado que existen importantes grupos de neuronas colinérgicas en el CAB y también en el tallo cerebral, estas últimas agrupadas en los núcleos PPT y LDT. Estudios electrofisiológicos en el CAB, PPT y LDT mostraron que las neuronas colinérgicas descargan a tasas significativamente más altas durante la vigilia y el sMOR en comparación con el SOL.^{25,26} Algunos reportes han encontrado mediante microdiálisis que la liberación de ACh en el CAB y en otras regiones como la corteza y el tálamo es más elevada durante la vigilia y el sMOR, esto es, durante los estados con mayor activación cortical.^{27,28} También se ha demostrado que la administración oral de donepezil, el

cual inhibe el metabolismo de la ACh, aumenta los niveles de ACh y, por consiguiente, el tiempo total de vigilia.²⁹

Los estudios farmacológicos han permitido determinar que la microinyección de agonistas colinérgicos del tipo muscarínicos (M) como oxotremorina y carbacol o neostigmina, un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa, en la formación reticular pontina incrementa el tiempo total de sMOR.³⁰⁻³² Asimismo, este efecto puede ser bloqueado por el efecto antagónico de la metocetramina sobre los receptores M2 y M4.³⁰ El papel de los receptores nicotínicos sobre la generación del sMOR es controversial, ya que se ha descrito que la microinyección de nicotina en la formación reticular pontina incrementa el sMOR;³³ sin embargo, recientemente se determinó que la administración sistémica crónica lleva a la disminución de SOL y sMOR, así como al incremento de vigilia.³⁴ Durante muchos años se planteó la hipótesis de que las neuronas colinérgicas del tallo cerebral tenían un papel primordial sobre la atonía muscular presente en el sMOR;³⁵ no obstante, estudios recientes han demostrado que la médula supraolivar, la cual contiene neuronas glutamatérgicas (que proyectan hacia el asta ventral de la médula espinal), es un elemento primordial del circuito regulador de la atonía muscular del sMOR.³⁶

GABA

Desde los trabajos de Krnjevic, *et al.*, es bien conocido que el GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio que se localiza ampliamente a lo largo del SNC. Los primeros trabajos que intentaron relacionar al GABA con el sueño fueron realizados a finales de los años 60 y principios de los 70, en los cuales mostraron que el incremento central de GABA por medio de su infusión ICV principalmente aumentaba el SOL e inducía una caída de sMOR.

En la actualidad, es bien sabido que en el hipotálamo, específicamente en el NPOM y en el APVL, existen neuronas GABAérgicas, las cuales exhiben un patrón específico de descarga elevada durante el SOL y sMOR.^{37,38} Estas zonas inervan múltiples regiones promotoras de la vigilia, incluyendo el LC, rafé dorsal, NTM, PPT/LDT y el área perifornical del HL. Se ha planteado que estas neuronas GABAérgicas pueden promover el sueño por medio de la inhibición de los sistemas involucrados en la vigilia y los despertares.^{39,40} Las benzodiazepinas son utilizadas para tratar el insomnio, ya que incrementan la señalización GABAérgica y de esta forma promueven un efecto hipnótico caracterizado por disminu-

ción de la vigilia, incremento del tiempo total de SOL y disminución de la latencia de aparición del SOL.^{41,42} Aunque estos fármacos han sido ampliamente usados, provocan varios efectos secundarios que incluyen alteraciones en la arquitectura del sueño por la reducción de sMOR, problemas en la memoria y síndrome de abstinencia. Existe un grupo de hipnóticos no-benzodiazepínicos que se unen al receptor GABA_A como el zolpidem y la zopiclona, los cuales han demostrado una eficacia hipnótica⁴³ similar a las benzodiazepinas, además de un excelente perfil de seguridad; es decir, estos fármacos generalmente causan menos alteraciones secundarias en la arquitectura normal del sueño y en la memoria.⁴⁴

Estudios experimentales han demostrado la acción promotora del GABA sobre el sueño mediante el uso de algunas sustancias agonistas y antagonistas de este neurotransmisor. Lancel, *et al.*⁴⁵ encontraron un incremento de SOL y sMOR después de la aplicación de muscimol. Recientemente se describió que la administración intraperitoneal en ratones de un nuevo agonista GABAérgico, el E-6199, promueve un incremento del SOL;⁴⁶ este mismo efecto se ha observado después de la infusión directa en el hipotálamo de otro agonista GABAérgico denominado gaboxadol.⁴⁷ Por el contrario, el CGP-36742, cuya acción principal es antagonizar a los receptores GABA_B y GABA_C, incrementa el tiempo total de vigilia y disminuye el SOL.⁴⁸ Todos estos datos sugieren que la inhibición GABAérgica efectuada principalmente sobre los núcleos promotores de vigilia es un mecanismo determinante que contribuye a la generación de episodios de sueño, principalmente SOL.

HIS

Las neuronas histaminérgicas en el cerebro de mamíferos están localizadas en el área hipotalámica posterior, concentradas particularmente en el NTM y desde esta región mandan sus axones hacia prácticamente todo el sistema nervioso central.^{49,50} De manera similar a las neuronas del LC y del rafé dorsal, las neuronas histaminérgicas del NTM están activas solamente durante la vigilia, cesan el disparo antes de la aparición de ondas lentas en el EEG y permanecen silentes durante el SOL y sMOR.^{51,52}

Existen tres tipos de receptores histaminérgicos expresados en el cerebro y farmacológicamente se ha demostrado que la estimulación de los tipos H1 y H2 favorece la aparición de vigilia a expensas del SOL y sMOR.^{53,54} En contraste, los tratamientos que actúan como antagonistas de los receptores H1 o que inhiben específicamente la acción de la HIS-d Descar-

boxilasa originan una disminución significativa de la vigilia y de la latencia al SOL, así como un incremento del tiempo total de SOL y sMOR.^{55,56} Se ha determinado que los receptores H3 controlan la actividad de las neuronas histaminérgicas por medio de la autoinhibición presináptica.⁵⁰ A causa de que los H3 controlan la síntesis, liberación y recaptura de HIS, se ha propuesto que el mantenimiento de la vigilia podría estar modulado por dichos receptores y sus ligandos.⁵⁷

De esta forma, se ha descrito que los antagonistas de los H3, tioperamida y ciproxifano incrementan la vigilia y los ritmos rápidos corticales del EEG. Por el contrario, la administración de un agonista de los receptores H3 (como el imetit) aumenta el SOL y atenúa en forma dosis-dependiente el incremento de vigilia originado por el ciproxifano.⁵⁸ Estos datos sustentan la hipótesis de que los antagonistas de los H3 incrementan la concentración de HIS sináptica, lo que a su vez activa a los receptores postsinápticos H1 promoviendo la vigilia. Todos estos resultados indican que las neuronas histaminérgicas tienen un papel determinante en los mecanismos de mantenimiento de la vigilia.

ORX

Las ORX A y B son moléculas peptídicas recientemente descubiertas y relacionadas con la promoción y mantenimiento de la vigilia. Dichos péptidos fueron descubiertos simultáneamente en 1998 por dos grupos de investigadores;^{59,60} posteriormente se describieron como neuropéptidos sintetizados por un grupo de neuronas principalmente localizadas en el HL y en menor proporción en el posterior y dorso-medial, además del núcleo perifornical.⁶¹ Estas neuronas orexinérgicas proyectan y activan núcleos histaminérgicos, noradrenérgicos, serotoninérgicos y colinérgicos del hipotálamo y tallo cerebral, de esta forma mantienen y consolidan los episodios de vigilia.⁶² Recientemente se ha observado en registros electrofisiológicos *in vivo* que las neuronas orexinérgicas exhiben una descarga tónica altamente específica de la vigilia, virtualmente cesan la tasa de disparo en el SOL, durante el sMOR permanecen relativamente silentes e incrementan su disparo antes del final del episodio de sMOR.^{63,64}

La primera relación entre las ORX y la narcolepsia (trastorno del sueño caracterizado por somnolencia excesiva e intrusiones de sMOR durante la vigilia) se originó a partir de un estudio realizado en caninos narcolépticos que reveló una mutación en el gen que codifica para el receptor 2 de la ORX.⁶⁵ Posteriormente,

se describió que en humanos afectados existe una disminución significativa de la expresión del receptor 1 para ORX,⁶⁶ así como una reducción en el número de neuronas orexinérgicas.^{67,68} Se ha demostrado que las neuronas noradrenérgicas del LC reciben una densa innervación orexinérgica y además responden a la aplicación de ORX A incrementando su tasa de disparo,⁶⁹ asimismo la administración de ORX A, B o el [Ala11]orexin-B, un agonista selectivo del receptor tipo 2, incrementa significativamente la duración de la vigilia hasta en 150% y también disminuye la duración del SOL y sMOR.^{69,70} Por el contrario, el almorexanto (antagonista orexinérgico que se une a ambos receptores) tiene la capacidad de promover el sueño, ya que incrementa el SOL y el sMOR a expensas de la vigilia.⁷¹

Adenosina

Aunque no es considerado propiamente un neurotransmisor, la adenosina funciona como un neuromodulador en el sistema nervioso central, ya que tiene la capacidad de inhibir la actividad neuronal y la liberación del neurotransmisor. Se ha descrito que las concentraciones de adenosina en el cerebro incrementan significativamente durante la privación y fragmentación del sueño, dichas concentraciones disminuyen lentamente durante el periodo de recuperación de sueño.^{72,73} Estos datos sugieren que la adenosina es un factor endógeno involucrado en la homeostasis del sueño, ya que probablemente promueve la hipersomnolencia presentada después de la vigilia prolongada.

Algunos estimulantes como la cafeína, teofilina y paraxantina actúan como antagonistas de los receptores para adenosina y de esta forma promueven significativamente la vigilia y proporcionalmente reducen el SOL y sMOR.^{74,75} Recientemente, se propuso que la adenosina tiene un papel funcional en el control de la activación orexinérgica, ya que la microinyección en el HL del antagonista de los receptores A1 (el DPX) produce un incremento significativo de la vigilia con una reducción concomitante del SOL y sMOR.⁷⁶ Por otra parte, ha sido descrito que la administración de adenosina o de fármacos agonistas de los receptores para adenosina, originan un aumento de SOL y retraso de sMOR tanto en ratas como en humanos. La perfusión de adenosina en núcleos colinérgicos e histaminérgicos (como el LDT y el NTM, respectivamente) produce una disminución de la vigilia además de un incremento significativo del SOL y sMOR.^{77,78} Así, estos estudios sugieren que el efecto inductor de sueño de la adenosina podría depender en

parte de la inhibición de los sistemas promotores de vigilia en el cerebro.

En general, existen muchas moléculas que tienen la capacidad de modificar el sueño e incluso se ha propuesto que no sólo está regulado por sinapsis químicas, sino también por sinapsis eléctricas;⁷⁹ sin embargo, los sustratos químicos y neuronales hasta ahora mencionados, y resumidos en el cuadro 1, son los principales blancos de fármacos estimulantes e hipnóticos.

Integración de los sistemas neuroquímicos en modelos *flip-flop* para la regulación del SOL y el sMOR

Para entender cómo se regula el sueño es necesario considerar las interacciones recíprocas entre los

distintos sistemas de vigilia y los núcleos promotores del sueño. Una serie de grupos neuronales monoaminérgicos (sistemas de vigilia) están localizados en el LC (NA), los NR (5-HT) y el NTM (HIS). Las neuronas de dichos núcleos comparten la característica de que su tasa de disparo es mayor durante la vigilia, disminuye durante el SOL y prácticamente dejan de descargar durante el sMOR. La alta actividad de los núcleos monoaminérgicos durante la vigilia modula la actividad del NPOM y el APVL, los cuales son regiones GABAérgicas que promueven principalmente el SOL. Por el contrario, durante el SOL estos núcleos descargan rápidamente y, dado que su naturaleza es GABAérgica, inhiben a los grupos monoaminérgicos. Saper⁸⁰ denominó a esta interacción recíproca como interruptor *flip-flop*, ya que es un circuito de retroalimentación que genera dos

Cuadro 1. Principales neurotransmisores que participan en la regulación del ciclo sueño-vigilia y el efecto de algunos agonistas y antagonistas.

Neurotransmisor	Tasa de disparo	Agonistas	Antagonistas	Referencias
NA Ubicación: LC Receptores: adrenérgicos α , β	↑↑↑ Vigilia ↓↓↓ SOL Ø sMOR	fenilefrina, ↑ Vigilia isoproterenol, ↓ SOL clenbuterol, modafinil ↓ sMOR	prazosin, ↓ Vigilia yohimbina, ↑ SOL propranolol ↑ sMOR	7-11
5-HT Ubicación: NR Receptores: 5-HT ₁₋₇	↑↑↑ Vigilia ↓↓↓ SOL ↓↓↓ sMOR	8-OHDPAT, ↑ Vigilia RU24969, ↓ SOL CP-94253, ↓ sMOR CP-44, m-CPBG	ritanserina, ↓ Vigilia MDL-100907, ↑ SOL RO-4368554, ↑ sMOR S-32006	15-22
HIS Ubicación: NTM Receptores: H ₁ , H ₂ , H ₃	↑↑↑ Vigilia ↓↓↓ SOL Ø sMOR	2-TEA, ↑ Vigilia histamina ↓ SOL ↓ sMOR	pirilamina, ↓ Vigilia difenhidramina ↑ SOL ciproheptadina ↑ sMOR	53-58
ORX Ubicación: HL Receptores: HCRTR1, HCRTR2	↑↑↑ Vigilia ↓↓↓ SOL Ø sMOR	[Ala11] orexin-B ↑ Vigilia ↓ SOL ↓ sMOR	almorexanto ↓ Vigilia ↑ SOL ↑ sMOR	69-71
ACh Ubicación: PPT/LTD/CAB Receptores: Nicotínicos-nAChR Muscarínicos-mAChR	↑↑↑ Vigilia ↓↓↓ SOL ↑↑↑ sMOR	nicotina, ↑ Vigilia oxotremorina, ↓ SOL carbacol, ↑ sMOR neostigmina	metoctramina ↑ Vigilia ↓ SOL ↓ sMOR	30-32
GABA Ubicación: APVL/NPOM Receptores: GABA _a , GABA _b , GABA _c	↓↓↓ Vigilia ↑↑↑ SOL ↑↑↑ sMOR	benzodiazepinas, ↓ Vigilia zolpidem, zopiclona, ↑ SOL muscimol, gaboxadol, ↓ sMOR E-6199	bicuculina, ↑ Vigilia CGP 36742 ↓ SOL ↓ sMOR	41-48
Adenosina Ubicación: en todo el cerebro Receptores: A1, A2a, A2b, A3		CPA, ↓ Vigilia adenosina ↑ SOL ↑ sMOR	cafeína, ↑ Vigilia paraxantina, ↓ SOL DPX, teofilina ↓ sMOR	74-78

↑↑↑ aumento, ↓↓↓ disminución y Ø mínima o casi nula tasa de disparo en dichas neuronas en cada etapa de sueño. ↑ Simboliza un aumento y ↓, un decremento del tiempo transcurrido en dicha etapa de sueño como respuesta a la aplicación de la sustancia mencionada. LC: locus coeruleus. NR: núcleos del rafé. NTM: núcleo tuberomamilar. HL: hipotálamo lateral. PPT: núcleo pedunculopontino tegmental. LTD: núcleo laterodorsal tegmental. CAB: cerebro anterior basal. APVL: área preóptica ventrolateral. NPOM: núcleo preóptico medio.

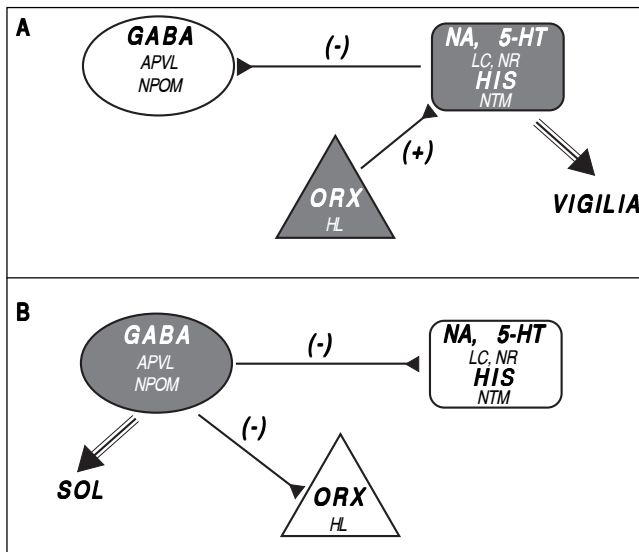


Figura 2. Regulación de la vigilia y el SOL mediante un modelo propuesto previamente por Saper.⁸⁰ **A.** La vigilia es generada por el incremento en la actividad de los núcleos monoaminérgicos (NA, 5-HT, HIS) que a su vez modulan la actividad GABAérgica del APVL y NPOM. En esta fase las neuronas orexinérgicas del HL (ORX) sirven para estimular la actividad monoaminérgica y asegurar la prevalencia de la vigilia. **B.** Por el contrario, durante el sueño las neuronas GABAérgicas del APVL y NPOM inhiben a los núcleos monoaminérgicos y a las neuronas orexinérgicas promoviendo la aparición del SOL. Rellenos en gris: núcleos activos. Rellenos en blanco: núcleos inactivos. (-) inhibición, (+) estimulación. APVL: área preóptica ventrolateral. NPOM: núcleo preóptico medio. HL: hipotálamo lateral. LC: locus coeruleus. NR: núcleos del rafé. NTM: núcleo tuberomamilar.

posibles patrones de descarga. Este interruptor puede ayudar a producir transiciones entre la vigilia y el SOL e incluso se ha propuesto que es estabilizado por las neuronas del HL (ORX), las cuales pueden excitar a los sistemas promotores de vigilia y así asegurar la prevalencia de la vigilia (Figura 2).

Por otra parte, uno de los principales temas a elucidar es la neuromodulación del sMOR. El primer modelo acerca de la regulación del sMOR enfatizó las interacciones entre neuronas colinérgicas de la formación reticular, específicamente del campo tegmental gigantocelular y neuronas monoaminérgicas del LC (NA) y del NR (5-HT). De esta forma, Hobson, *et al.*,⁸¹ en 1975, propusieron un modelo de interacción recíproca basado en la existencia de un circuito generador de sMOR. Este modelo estaba sustentado en el hecho de que durante el sMOR las neuronas colinérgicas (denominadas REM-on por su capacidad de promover el sMOR) incrementan su tasa de disparo, mientras que las neuronas monoaminérgicas (denominadas REM-off por inhibir la aparición del sMOR) prácticamente cesan su actividad. Se propuso que el

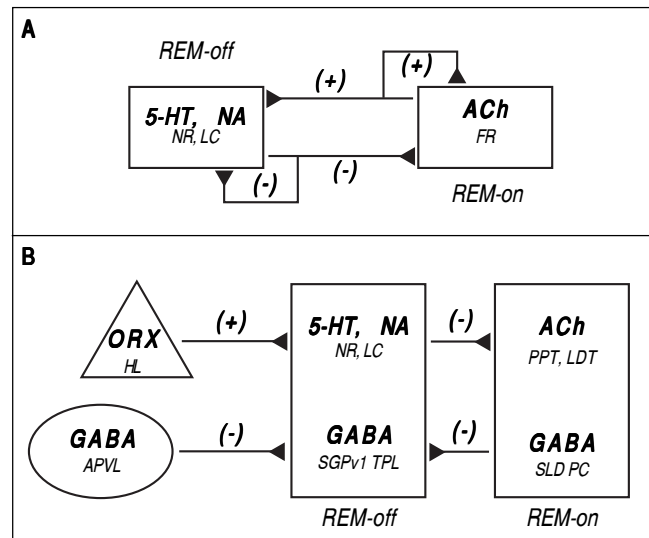


Figura 3. Principales modelos para la regulación del sMOR. **A.** Primer modelo propuesto por Hobson, *et al.*,⁸¹ en 1975, en el cual la generación del sMOR se basa únicamente en la interacción recíproca autorregulatoria entre grupos neuronales colinérgicos (REM-on) y monoaminérgicos (REM-off). **B.** Modelo propuesto en 2006 por Lu, *et al.*⁸² Las regiones REM-off fueron identificadas por la convergencia de entradas desde las neuronas orexinérgicas del HL y GABAérgicas del APVL. Las neuronas REM-off tienen una interacción inhibitoria mutua con neuronas REM-on, es decir, que cuando se inactivan las regiones REM-off se libera la inhibición de los grupos REM-on y de esta forma se genera un episodio de sMOR. NR: núcleos del rafé. LC: locus coeruleus. FR: formación reticular. HL: hipotálamo lateral. APVL: área preóptica ventrolateral. SGPv1: porción ventrolateral de la sustancia gris periacueductal. TPL: tegmento pontino lateral. PPT: núcleo pedúnculo pontino tegmental. LDT: núcleo laterodorsal tegmental. SLD: núcleo sublaterodorsal. PC: núcleo precoeruleus.

sistema monoaminérgico estaba tónicamente activo durante la vigilia, de esta forma tenía la capacidad de inhibir la actividad del sistema colinérgico y, finalmente, impedir la aparición de sMOR. Por el contrario, durante el SOL la inhibición monoaminérgica disminuía permitiendo cierta excitación colinérgica, la cual alcanzaba sus picos máximos al comienzo del sMOR. Así, se promovía la generación de sMOR mediante la inactivación del LC y NR y la activación de los núcleos colinérgicos del tallo cerebral (Figura 3A).

En contraste a este primer modelo, el cual enfatizaba principalmente interacciones de neuronas monoaminérgicas y colinérgicas, en 2006 se propuso un nuevo modelo en donde el principal mecanismo para la generación de sMOR añadía interacciones recíprocas entre poblaciones de neuronas GABAérgicas REM-on y REM-off localizadas en el tegmento mesopontino. Gracias al uso de trazadores anterógrados se identificaron regiones REM-off (inhibidoras de

sMOR) localizadas en la parte ventrolateral de la sustancia gris periacueductal y en el tegmento pontino lateral, así como regiones REM-on (promotoras de sMOR) situadas en el núcleo sublaterodorsal y en la región precoeruleus. Aunque en este modelo las neuronas colinérgicas del PPT y LDT y las monoaminérgicas del LC y el NR no son los elementos centrales, aún conservan un importante papel modulador, tanto en la generación como inhibición del sMOR, respectivamente.⁸² En general, este modelo plantea que durante la vigilia las neuronas orexinérgicas del HL están activas y pueden excitar regiones REM-off (GABA, NA, 5-HT) impidiendo la aparición de sMOR. Durante el SOL, al estar activas regiones GABAérgicas como el APVL, se permite la inhibición de las regiones REM-off; al estar inactivas se libera la inhibición de las regiones REM-on (GABA, ACh) y de esta forma se permitiría la generación de un episodio de sMOR (Figura 3B).

CONCLUSIONES

Gracias al descubrimiento del EEG, el cual marcó el comienzo de la era científica en la investigación del sueño, se establecieron las bases para la identificación de las diferentes etapas del sueño. A partir de ese hecho se han conducido una gran cantidad de estudios que han generado un progreso significativo en el conocimiento de los mecanismos neuronales que regulan principalmente la vigilia, SOL y sMOR. Es ahora aceptado que la modulación de dichos estados involucra a una serie de grupos neuronales neuroquímicamente distintos y localizados a lo largo del cerebro. Básicamente, en el hipotálamo y tallo cerebral existen múltiples sistemas neuronales (NA, 5-HT, HIS, ORX) que se activan para promover y mantener la vigilia. La actividad de estos sistemas promotores de vigilia es regulada por poblaciones de neuronas promotoras de sueño (GABA) localizadas en el hipotálamo y que activamente participan en la iniciación del SOL. A su vez, existe evidencia que indica que ciertos núcleos pontinos (GABA, ACh) interactúan recíprocamente promoviendo el sMOR. Así, las inhibiciones mutuas entre los diferentes sistemas promotores de vigilia y de sueño SOL y sMOR son necesarias para regular el ciclo sueño-vigilia.

Finalmente, el sueño parece ser un fenómeno altamente regulado, ya que se han propuesto diferentes niveles de control (desde genéticos hasta los procesos mencionados en esta revisión) que son llevados a cabo por redes neuronales centrales. Es indudable el papel del sueño en procesos como conservación de energía, función inmune, metabolismo

cerebral, aprendizaje, memoria y sinaptogénesis, entre otros. Es de suma importancia conocer los mecanismos cerebrales que subyacen a que un individuo se mantenga despierto, dormido o que pase de una etapa de sueño a otra.

ABREVIATURAS

- **5-HT.** Serotonina.
- **ACh.** Acetilcolina.
- **APVL.** Área preóptica ventrolateral.
- **CAB.** Cerebro anterior basal.
- **EEG.** Electroencefalograma.
- **GABA.** Ácido gama amino butírico.
- **HIS.** Histamina.
- **HL.** Hipotálamo lateral.
- **ICV.** Intracerebroventricular.
- **LC.** Locus coeruleus.
- **LDT.** Núcleo laterodorsal tegmental.
- **NA.** Noradrenalina.
- **No MOR.** Sueño de no movimientos oculares rápidos.
- **NPOM.** Núcleo preóptico medio.
- **NR.** Núcleos del rafé.
- **NTM.** Núcleo tuberomamilar.
- **ORX.** Orexina.
- **PPT.** Núcleo pedunculopontino tegmental.
- **REM.** Rapid eye movements.
- **REM-on.** Neuronas promotoras de sMOR.
- **REM-off.** Neuronas inhibitoras de sMOR.
- **sMOR.** Sueño de movimientos oculares rápidos.
- **SNC.** Sistema nervioso central.
- **SOL.** Sueño de ondas lentas.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM y al CONACyT por el apoyo otorgado a Javier Franco-Pérez.

REFERENCIAS

1. Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science* 1953; 118: 273-4.
2. García-García F, Acosta-Peña E, Venebra-Muñoz A, Murillo-Rodríguez E. Sleep-inducing factors. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2009; 8: 235-44.
3. Lee SB, Beak SK, Park SH, Waterhouse BD, Lee HS. Collateral projection from the locus coeruleus to whisker-related sensory and motor brain regions of the rat. *J Comp Neurol* 2009; 514: 387-402.
4. Sharma Y, Xu T, Graf WM, Fobbs A, Sherwood CC, Hof PR, et al. Comparative anatomy of the locus coeruleus in humans and nonhuman primates. *J Comp Neurol* 2010; 518: 963-71.
5. Aston-Jones G, Bloom F. Activity of norepinephrine-containing

- locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 1981; 1: 876-86.
6. Takahashi K, Kayama Y, Lin JS, Sakai K. Locus coeruleus neuronal activity during the sleep-waking cycle in mice. *Neuroscience* 2010; 169: 1115-26.
 7. Berridge CW, Stellick R, Schmeichel B. Wake-promoting actions of medial basal forebrain beta2 receptor stimulation. *Behav Neurosci* 2005; 119: 743-51.
 8. Berridge CW. Noradrenergic modulation of arousal. *Brain Res Rev* 2008; 58: 1-17.
 9. Berridge CW, España R. Synergistic sedative effects of noradrenergic alpha (1) and beta-receptor blockade on forebrain electroencephalographic and behavioral indices. *Neuroscience* 2000; 99: 495-505.
 10. Pal D, Mallick BN. Role of noradrenergic and GABA-ergic inputs in pedunculopontine tegmentum for regulation of rapid eye movement sleep in rats. *Neuropharmacology* 2006; 51: 1-11.
 11. Kumar R. Approved and investigational uses of modafinil: an evidence-based review. *Drugs* 2008; 68: 1803-39.
 12. Jouvet M. Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 1969; 163: 32-41.
 13. Urbain N, Creamer K, Debonnel G. Electrophysiological diversity of the dorsal raphe cells across the sleep-wake cycle of the rat. *J Physiol* 2006; 573: 679-95.
 14. Monti JM. The role of dorsal raphe nucleus serotonergic and non-serotonergic neurons, and of their receptors, in regulating waking and rapid eye movement (REM) sleep. *Sleep Med Rev* 2010; 14: 319-27.
 15. Dzoljic M, Ukponmwan O, Saxena P. 5-HT1-like receptor agonists enhance wakefulness. *Neuropharmacology* 1992; 31: 623-33.
 16. Tejada S, Rial RV, Gamundí A, Esteban S. Effects of serotonergic drugs on locomotor activity and vigilance states in ring doves. *Behav Brain Res* 2011; 216: 238-46.
 17. Monti JM, Jantos H, Lagos P. Activation of serotonin 5-HT(1B) receptor in the dorsal raphe nucleus affects REM sleep in the rat. *Behav Brain Res* 2010; 206: 8-16.
 18. Monti JM, Leopoldo M, Jantos H. The serotonin 5-HT7 receptor agonist LP-44 microinjected into the dorsal raphe nucleus suppresses REM sleep in the rat. *Behav Brain Res* 2008; 191: 184-9.
 19. Monti JM, Jantos H. Activation of the serotonin 5-HT3 receptor in the dorsal raphe nucleus suppresses REM sleep in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; 32: 940-7.
 20. Kantor S, Jakus S, Bodizs R, Halasz P, Bagdy G. Acute and long-term effects of the 5-HT2 receptor antagonist ritanserin on EEG power spectra, motor activity and sleep: changes at the light-dark phase shift. *Brain Res* 2002; 943: 105-11.
 21. Morairty SR, Hedley L, Flores J, Martin R, Kilduff TS. Selective 5HT2A and 5HT6 receptor antagonists promote sleep in rats. *Sleep* 2008; 31: 34-44.
 22. Descamps A, Rousset C, Millan MJ, Spedding M, Delagrangé P, Cespluglio R. Influence of the novel antidepressant and melatonin agonist/serotonin2C receptor antagonist, agomelatine, on the rat sleep-wake cycle architecture. *Psychopharmacology* 2009; 205: 93-106.
 23. Boothman L, Raley J, Denk F, Hirani E, Sharp T. In vivo evidence that 5-HT(2C) receptors inhibit 5-HT neuronal activity via a GABAergic mechanism. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 861-9.
 24. Liu R, van den Pol A, Aghajanian G. Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J Neurosci* 2002; 22: 9453-64.
 25. Steriade M, Datta S, Pare D, Oakson G, Curro R. Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci* 1990; 10: 2541-59.
 26. Hassani OK, Lee MG, Henny P, Jones BE. Discharge profiles of identified GABAergic in comparison to cholinergic and putative glutamatergic basal forebrain neurons across the sleep-wake cycle. *J Neurosci* 2009; 29: 11828-40.
 27. Marrosu F, Portas C, Mascia M, Casu M, Fa M, Giagheddu M, et al. Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. *Brain Res* 1995; 671: 329-32.
 28. Vazquez J, Baghdoyan HA. Basal forebrain acetylcholine release during REM sleep is significantly greater than during waking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: R598-R601.
 29. Ishida T, Kamei C. Characteristic effects of anti-dementia drugs on rat sleep patterns. *J Pharmacol Sci* 2009; 109: 449-55.
 30. Coleman C, Lydic R, Baghdoyan H. M2 muscarinic receptors in pontine reticular formation of C57BL/6J mouse contribute to rapid eye movement sleep generation. *Neuroscience* 2004; 126: 821-30.
 31. Marks G, Birabil C. Carbachol induction of REM sleep in the rat is more effective at lights-out than lights-on. *Brain Res* 2007; 1142: 127-34.
 32. Fenik VB, Kubin L. Differential localization of carbachol- and bicuculline-sensitive pontine sites for eliciting REM sleep-like effects in anesthetized rats. *J Sleep Res* 2008; 18: 99-112.
 33. Velazquez-Moctezuma J, Shalauta MD, Gillin JC, Shiromani PJ. Microinjections of nicotine in the medial pontine reticular formation elicits REM sleep. *Neurosci Lett* 1990; 115: 265-8.
 34. Vázquez-Palacios G, Hernández-González M, Guevara-Pérez MA, Bonilla-Jaime H. Nicotine and fluoxetine induce arousing effects on sleep-wake cycle in antidepressant doses: a possible mechanism of antidepressant-like effects of nicotine. *Pharmacol Biochem Behav* 2010; 94: 503-9.
 35. Fuller PM, Saper CB, Lu J. The pontine REM switch: past and present. *J Physiol* 2007; 584: 735-41.
 36. Vetrivelan R, Fuller PM, Tong Q, Lu J. Medullary circuitry regulating rapid eye movement sleep and motor atonia. *J Neurosci* 2009; 29: 9361-9.
 37. Szymusiak R, Alam N, Steininger TL, McGinty D. Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res* 1998; 803: 178-88.
 38. Suntsova N, Szymusiak R, Alam MN, Guzman-Marin R, McGinty D. Sleep-waking discharge patterns of median preoptic nucleus neurons in rats. *J Physiol* 2002; 543: 665-77.
 39. Suntsova N, Guzman-Marin R, Kumar S, Alam MN, Szymusiak R, McGinty D. The median preoptic nucleus reciprocally modulates activity of arousal-related and sleep-related neurons in the perifornical lateral hypothalamus. *J Neurosci* 2007; 27: 1616-30.
 40. Szymusiak R, McGinty D. Hypothalamic regulation of sleep and arousal. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1129: 275-86.
 41. Hirase M, Ishida T, Kamei C. Rebound insomnia induced by abrupt withdrawal of hypnotics in sleep-disturbed rats. *Eur J Pharmacol* 2008; 597: 46-50.
 42. Passarella S, Dzung MT. Diagnosis and treatment of insomnia. *Am J Health Syst Pharm* 2008; 65: 927-34.
 43. Xi M, Chase MH. Effects of eszopiclone and zolpidem on sleep and waking states in the adult guinea pig. *Sleep* 2008; 31: 1043-51.
 44. Nutt DJ, Stahl SM. Searching for perfect sleep: the continuing evolution of GABAA receptor modulators as hypnotics. *J Psychopharmacol* 2010; 24: 1601-12.
 45. Lancel M, Grönlein T, Faulhaber J. Role of GABAA receptors in sleep regulation. Differential effects of muscimol and midazolam on sleep in rats. *Neuropsychopharmacology* 1996; 15: 63-74.
 46. Alexandre C, Dordal A, Aixendri R, Guzman A, Hamon M, Adrien J. Sleep-stabilizing effects of E-6199, compared to zopiclone, zolpidem and THIP in mice. *Sleep* 2008; 31: 259-70.
 47. Thakkar MM, Winston S, McCarley RW. Effect of microdialysis

- perfusion of 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo-[5,4-c]pyridine-3-ol in the perifornical hypothalamus on sleep-wakefulness: role of delta-subunit containing extrasynaptic GABAA receptors. *Neuroscience* 2008; 153: 551-5.
48. Deschaux O, Froestl W, Gottesmann C. Influence of a GABA(B) and GABA(C) receptor antagonist on sleep-waking cycle in the rat. *Eur J Pharmacol* 2006; 535: 177-81.
 49. Watanabe T, Taguchi Y, Shiosaka S, Tanaka J, Kubota H, Terano Y, et al. Distribution of histaminergic system in the central nervous system of rats: a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res* 1984; 295: 13-25.
 50. Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O. Histamine in the nervous system. *Physiol Rev* 2008; 88: 1183-241.
 51. Takahashi K, Lin JS, Sakai K. Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake-sleep states in the mouse. *J Neurosci* 2006; 26: 10292-8.
 52. Sakai K, Takahashi K, Anaclet C, Lin JS. Sleep-waking discharge of ventral tuberomammillary neurons in wild-type and histidine decarboxylase knock-out mice. *Front Behav Neurosci* 2010; 4: 53.
 53. Monti J, Pellejero T, Jantos H. Effects of H1- and H2-histamine receptor agonists and antagonists on sleep and wakefulness in the rat. *J Neural Transm* 1986; 66: 1-11.
 54. Ramesh V, Thakkar M, Strecker R, Basheer R, McCarley R. Wakefulness-inducing effects of histamine in the basal forebrain of freely moving rats. *Behav Brain Res* 2004; 152: 271-8.
 55. Tokunaga S, Takeda Y, Shinomiya K, Hirase M, Kamei C. Effects of Some H1-Antagonists on the Sleep-Wake Cycle in Sleep-Disturbed Rats. *J Pharmacol Sci* 2007; 103: 201-6.
 56. Tokunaga S, Tsutsui R, Obara Y, Ishida T, Kamei C. Effects of histamine H1-antagonists on sleep-awake state in rats placed on a grid suspended over water or on sawdust. *Biol Pharm Bull* 2009; 32: 51-4.
 57. Lin JS, Sergeeva OA, Haas HL. Histamine H3 receptors and sleep-wake regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 336: 17-23.
 58. Parmentier R, Anaclet C, Guhenec C, Brousseau E, Bricout D, Giboulot T, et al. The brain H3-receptor as a novel therapeutic target for vigilance and sleep-wake disorders. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1157-71.
 59. De Lecea L, Kilduff T, Peyron C, Gao X, Foye P, Danielson P. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *PNAS* 1998; 95: 322-7.
 60. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli R, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92: 573-85.
 61. Stoyanova I, Rutten WL, le Feber J. Orexin-A and orexin-B during the postnatal development of the rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30: 81-9.
 62. Ohno K, Sakurai T. Orexin neuronal circuitry: role in the regulation of sleep and wakefulness. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29: 70-87.
 63. Lee M, Hassani O, Jones B. Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 2005; 25: 6716-20.
 64. Takahashi K, Lin JS, Sakai K. Neuronal activity of orexin and non-orexin waking-active neurons during wake-sleep states in the mouse. *Neuroscience* 2008; 153: 860-70.
 65. Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 1999; 98: 365-76.
 66. Mishima K, Fujiki N, Yoshida Y, Sakurai T, Honda M, Mignot E, et al. Hypocretin receptor expression in canine and murine narcolepsy models and in hypocretin-ligand deficient human narcolepsy. *Sleep* 2008; 31: 1119-26.
 67. Thannickal T, Moore R, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, et al. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 2000; 27: 469-74.
 68. Thannickal T, Nienhuis R, Siegel J. Localized loss of hypocretin (orexin) cells in narcolepsy without cataplexy. *Sleep* 2009; 32: 993-8.
 69. Hagan J, Leslie R, Patel S, Evans M, Wattam T, Holmes S, et al. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *PNAS* 1999; 96: 10911-6.
 70. Akanmu M, Honda K. Selective stimulation of orexin receptor type 2 promotes wakefulness in freely behaving rats. *Brain Res* 2005; 1048: 135-45.
 71. Brisbare-Roch C, Dingemans J, Koberstein R, Hoeber P, Aissaoui H, Flores S, et al. Promotion of sleep by targeting the orexin system in rats, dogs, and humans. *Nat Med* 2007; 13: 150-5.
 72. Porkka-Heiskanen T, Strecker R, McCarley R. Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience* 2000; 99: 507-17.
 73. McKenna J, Tartar J, Ward C, Thakkar M, Cordeira J, McCarley R, et al. Sleep fragmentation elevates behavioral, electrographic and neurochemical measures of sleepiness. *Neuroscience* 2007; 146: 1462-73.
 74. Schwierin B, Borbély A, Tobler I. Effects of N-cyclopentyladenosine and caffeine on sleep regulation in the rat. *Eur J Pharmacol* 1996; 300: 163-71.
 75. Okuro M, Fujiki N, Kotorii N, Ishimaru Y, Sokoloff P, Nishino S. Effects of paraxanthine and caffeine on sleep, locomotor activity, and body temperature in orexin/ataxin-3 transgenic narcoleptic mice. *Sleep* 2010; 33: 930-42.
 76. Thakkar M, Engemann S, Walsh K, Sahota P. Adenosine and the homeostatic control of sleep: effects of A1 receptor blockade in the perifornical lateral hypothalamus on sleep-wakefulness. *Neuroscience* 2008; 153: 875-80.
 77. Portas C, Thakkar M, Rainnie D, Greene R, McCarley R. Role of adenosine in behavioral state modulation: a microdialysis study in the freely moving cat. *Neuroscience* 1997; 79: 225-35.
 78. Oishi Y, Huang Z, Fredholm B, Urade Y, Hayaishi O. Adenosine in the tuberomammillary nucleus inhibits the histaminergic system via A1 receptors and promotes non-rapid eye movement sleep. *PNAS* 2008; 105: 19992-7.
 79. Franco-Pérez J, Paz C. Quinine, a selective gap junction blocker, decreases REM sleep in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2009; 94: 250-4.
 80. Saper C, Fuller P, Pedersen N, Lu J, Scammell T. Sleep state switching. *Neuron* 2010; 68: 1023-42.
 81. Hobson J, McCarley R, Wyzinsky P. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 1975; 189: 55-8.
 82. Lu J, Sherman D, Devor M, Saper C. A putative flip-flop switch for control on REM sleep. *Nature* 2006; 441: 589-94.

Reimpresos:

Dr. Javier Franco-Pérez

Departamento de Neurofisiología
 Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
 M.V.S.
 Insurgentes Sur, Núm. 3877
 Col. La Fama
 14269, México, D.F.
 Tel.: (+52 55) 5606-3822 ext. 2021
 Fax: (+52 55) 5424-0808
 Correo electrónico: jfranco@innn.edu.mx

*Recibido el 28 de marzo 2011.
 Aceptado el 26 de julio 2011.*

Irradiation Design for an Experimental Murine Model

P. Ballesteros-Zebadúa^a, J.M. Lárraga-Gutierrez^b, O.A. García-Garduño^b,
M.C. Rubio-Osornio^c, V. Custodio-Ramírez^c, S. Moreno-Jimenez^a, J.E.
Suarez-Campos^a, C. Paz^c and M.A. Celis^a

^aUnidad de Radiocirugía, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Insurgentes Sur 3677. Col. La Fama, C.P. 14269, Tlalpan, México, D.F.

^bLaboratorio de Física Médica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Insurgentes Sur 3677. Col. La Fama, C.P. 14269, Tlalpan, México, D.F.

^cLaboratorio de Neurofisiología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Insurgentes Sur 3677. Col. La Fama, C.P. 14269, Tlalpan, México, D.F.

Abstract. In radiotherapy and stereotactic radiosurgery, small animal experimental models are frequently used, since there are still a lot of unsolved questions about the biological and biochemical effects of ionizing radiation. This work presents a method for small-animal brain radiotherapy compatible with a dedicated 6MV Linac. This rodent model is focused on the research of the inflammatory effects produced by ionizing radiation in the brain. In this work comparisons between Pencil Beam and Monte Carlo techniques, were used in order to evaluate accuracy of the calculated dose using a commercial planning system. Challenges in this murine model are discussed.

Keywords: small animal's dosimetry, sleep research, whole brain radiotherapy, stereotactic radiosurgery, Monte Carlo.

PACS: 87.19.L, 87.19.le, 87.53.-j, 87.53.Kn, 87.53.Ly, 87.55.-x, 87.55.D-, 87.55.dh, 87.55.K.

INTRODUCTION

In our institution we have proposed a protocol to evaluate the possible effect of whole brain radiotherapy in sleep patterns and inflammation markers in a rat model and the possible effect of anti-inflammatory pharmaceuticals in such behavior.

Rodent animal models may represent a challenge when using a clinical irradiator. Also is a challenge for dosimetry of the treatment planning since the small size of the target may imply dealing with small field's dosimetry, and the small surface to isocenter distance may imply high dose gradient regions. Measurements may require high spatial resolution detectors and be able to face lack of charged particle lateral equilibrium.

Our animal model is planned to evaluate sleep electrographic recordings before and after irradiation. Electrode implantation by surgery is needed in order to evaluate

changes in sleep phases according to electroencephalogram (EEG) and electromyography (EMG) patterns complemented with behavioral analysis. Electrodes represent a challenge for radiation treatment planning and dosimetry since they generate important artifacts in the computed tomography (CT) images; if this is the case then the Hounsfield Units (HU) calculations that our clinical planning software uses for dose determinations may be incorrect.

METHODS

Fixation

A stereotaxic frame for irradiation was designed according to a previously built model [1]. The irradiation frame should be tight enough to avoid sudden waking from anesthesia and also avoid imaging artifacts and interference with radiation fields. Tip rat ear prongs were avoided in order to diminish otitis risk; thermoplastic mask for fixation was used instead.

Treatment Planning

Treatment Planning was performed using CT images (Somatom Sensation Siemens 0.7 mm slice thickness) and Planning Software IPlan 4.2 (Brainlab, Germany). Irradiation was performed using a micro-multileaf collimator coupled to a dedicated 6MV linear accelerator for head and neck treatments (Novalis Varian linear accelerator and m3-mMLC BrainLAB collimator). Irradiation plans had to achieve brain conformation and protect oropharynx mucosa, as an organ at risk (OARs). Oropharynx mucositis may appear a few days after irradiation so it represents the most relevant OAR since radiation undesired secondary effects may interfere with sleep recording [2]. Applied doses to whole brain were chosen according to previous reports in animal models where inflammation markers were found [3,4]. Employed prescription was 15 Gy at isocenter using the following forward planning points: 95%-12Gy, 50%-14Gy and 0%-18Gy. Oropharynx was contoured in its nearest portion to the brain and OAR forward planning points were used: 100%-2Gy, 70%-4Gy, 30%-8Gy y 0%-15Gy. *Forward Planning* with *guardian* of 100% was chosen for high protection of OAR. Brain, electrode and mucosa were delineated with the support of the HU auto-delineation tool and corrected manually. Coordinates were calculated according to delineated volume center and a 4 conformal dynamic arc irradiation plan was chosen. In order to evaluate the effect of the surface distance in dose calculations, two options were proposed: A) superior 4 arc plan and B) inferior 4 arc plan, where the difference was the plane of incidence of the arcs. All collimators were optimized and no margin was employed. Three rats previously implanted with electrodes and three rats without electrodes were used for comparisons.

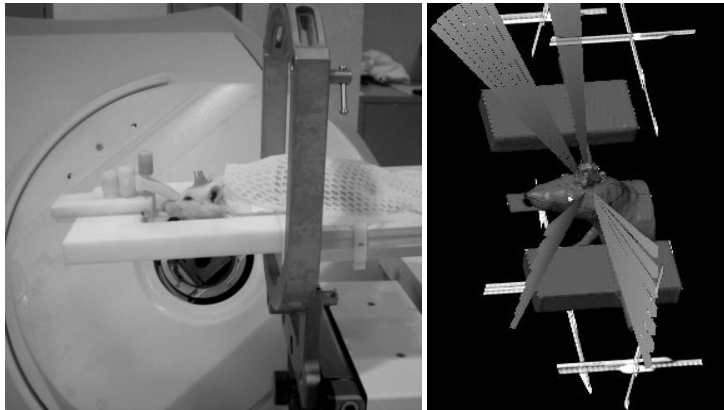


FIGURE 1. In a) whole brain irradiation with a thermoplastic fixation method for a previously implanted electrode rat.(b) Superior beam conformal arc irradiation plan.

Monte Carlo

Monte Carlo simulations were performed with the clinical software tool running the Monte Carlo Algorithm iPlan RT Dose (BrainLAB, Germany). This software was previously commissioned after 185 calibration measurements [5]. Comparisons can be easily done between Pencil Beam algorithm (PB) and Monte Carlo (MC) using this tool. Simulations were run with an average variance of 0.5% per voxel and a spatial resolution of 2.0 mm for 3D calculations.

Artifacts correction

Artifacts are generated in the animal model CT images because of the presence of the implanted electrode (Fig. 2). HUs variation may result in dose calculation errors, since linear attenuation coefficients and electronic densities are based on HU. Two possible corrections were proposed: A. Contouring artifacts area and replacing HUs according to a pre-calculated HU mean for electrodes and non implanted brains. B.Disable path length correction (that is, tissues are considered water equivalent). Both artifacts correction methods were evaluated comparing dose calculated differences before and after each correction method in non implanted rat images.

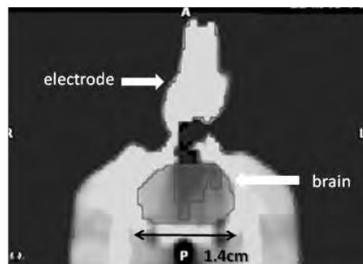


FIGURE 2. Brain artifacts generated in the CT image by the presence of the skull implanted electrodes

RESULTS

The proposed treatment plan with superior arc incidence had a smaller tissue equivalent distance to isocenter than our inferior plan; this is true for both cases of rats, with and without the implanted electrode. In spite of this, in both plans, no significant variations were found in dose calculations between MC and Pencil Beam; mean differences were smaller than 5% (Table 1). On the other hand, inferior planning resulted in higher dose to oropharynx mucosa (not shown) so superior plan was chosen as the best option for this protocol. Table 1 also shows that distance from isocenter to surface is greater when electrode is present for superior planning as expected. Differences between Pencil Beam and MC are higher for the cases without the electrode, where distances are smaller, without this being statistically significant.

TABLE 1. Percent differences in dose calculations between MC and PB for both groups with and without electrode and for two proposed treatment plans with superior and inferior beam arc incidence

Plan	Minimum Dose (%)	Mean Dose (%)	Maximum Dose (%)	Volume Coverage at 12Gy %	Surface to Skin Distance (mm)	Tissue equivalent Distance (mm)	
With Electrode	Superior	2.48 ±1.77	3.70±0.24	4.49±0.87	1.67±0.76	19.63±9.35	15.48±5.42
	Inferior	4.86±3.50	3.59±0.08	4.43±0.78	3.32±1.99	19.39±0.583	19.61±0.98
	Mean	3.43±2.51	3.65±0.19	4.47±0.73	2.33±1.45	19.54±6.62	17.13± 4.48
Without Electrode	Superior	2.93±0.14	4.35±0.44	5.64±0.64	2.68±0.02	10.53±8.5	10.9±-6.5
	Inferior	4.18±0.18	3.51±0.35	4.16±0.47	2.24±0.02	19.45±3.8	20.2±6.8
	Mean	3.56±0.90	3.93±0.59	4.89±1.05	2.46±0.30	14.99±6.15	15.55±6.65
Mean	3.48±1.7	3.79±0.39	4.68±0.88	2.39±0.88	17.26±6.46	16.34±5.53	

Dose distributions in non implanted rats were planned. Dose variations before and after both electrode artifacts correction method, were slightly smaller for the A method. Also after this correction method, differences in equivalent isocenter to skin distances were considerably smaller. In order to evaluate the dose inconsistencies when artifacts are not corrected, MC dose calculations were compared in electrode implanted rats before and after the correction method. Differences of up to 13% can be found between corrected and uncorrected plans.

CONCLUSIONS

The method described in this work was designed for whole brain irradiation of electrode implanted rats using a clinical dedicated LINAC. This method uses a thermoplastic fixation method, a superior incidence conformal beam arc plan, and an artifact correction method with manual contouring with substitution of the HU values. The chosen method exhibits good conformality while minimizing the dose to surrounding tissue especially to mucosa. In the chosen model, variations between MC and PB calculations were smaller than 5%. Uncorrected artifacts may generate large inconsistencies in dose calculations. Each protocol with small animals has its own particular needs and the protocol developed in this work is useful for future adaptations in different research applications.

ACKNOWLEDGMENTS

We want to thank Agustin Ortuño, David Serret, Jesús Linares y Jorge Valderrama for their technical support. This work was partially supported by project CONACYT-SALUD-2005-01-14012.

REFERENCES

1. C. Paz, Neurophysiology Laboratory INNN Mexico (private communication).
2. Constine L.S., et. al. "Late Effects of Cancer Treatment on Normal Tissues" in *Principles and Practice of Radiation Oncology* edited by C.A. Perez et al. Philadelphia USA Lippincott Williams and Wilkins, 2004, 320-350 pp.
3. Kyrkanides S., Olschowka J.A., Williams J.P., et. al. *Journal of Neuroimmunology* **95**, 95-106 (1999)
4. Hwang S.H., Jung J.S., Kim T.H, et. al. *Neurobiology of Disease* **21**,457-467 (2006)
5. Lárraga-Gutiérrez J.M., Garcia-Garduño O.A., Galván de la Cruz O.O., Hernández-Bojórquez M., Ballesteros-Zebadúa P., Commissioning and Validation of the First Monte Carlo Based Dose Calculation Algorithm Commercial Treatment Planning System in Mexico, *AIP Proceedings*, this issue.

Whole-brain irradiation increases NREM sleep and hypothalamic expression of IL-1 β in rats

Paola Ballesteros-Zebadua^{1,2}, Verónica Custodio³, Javier Franco⁴, Carmen Rubio³, Edith González³, Cristina Trejo⁵, Miguel A Celis⁶ & Carlos Paz³

¹Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, ²Laboratorio de Física Médica, ³Departamento de Neurofisiología, ⁴Laboratorio de Fisiología de la Formación Reticular, ⁵Laboratorio de Neuroinmunología, and ⁶Unidad de Radioneurocirugía, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico

Abstract

Purpose: Although it has mainly been described qualitatively, whole brain irradiation induces somnolence in patients with malignant diseases. Therefore, we used a rat model to quantify the effects of irradiation of healthy brain tissue on both sleep-wake patterns and the expression of the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β), which is known to induce sleep.

Materials and methods: Different groups were examined at three time points after irradiation (1 day, 30 days and 60 days). Polysomnographic recordings were performed on each rat before and after total cranial irradiation (12 Gy). IL-1 β protein levels in several brain regions were assessed by enzyme-linked immunosorbent assays, and site-specific immunoreactivity was observed by immunofluorescence.

Results: We found that both non-rapid eye movement sleep and IL-1 β protein expression in the hypothalamus increased 30 days after irradiation.

Conclusions: Whole brain irradiation increases sleep in our rat model, and this finding is similar to qualitative reports from patients. Because IL-1 β has been proposed as a sleep-promoting molecule, we propose that the polysomnographic results may be attributable, at least in part, to the delayed overexpression of IL-1 β in the hypothalamus.

Keywords: Whole brain irradiation, sleep, neuro-inflammation, IL-1 β , hypothalamus, median preoptic area

Introduction

Currently, radiotherapy is one of the main treatments for brain metastatic diseases and brain tumors. However, since the first use of ionizing radiation in brain treatments, several secondary effects in healthy tissue have been reported. Along with other undesired effects, sleep disturbances, such as severe diurnal somnolence, have been described after whole-brain exposure to ionizing radiation. Although its

etiology is controversial, the so-called radiation somnolence syndrome (RSS) is a recognized transient effect of whole-brain irradiation. Most studies of patients related to this syndrome are based on questionnaires and interviews, and the incidence for RSS varies from 13–84% (Mandell et al. 1989, Faithfull and Brada 1998, Ballesteros-Zebadua et al. 2012). RSS is also recognized as an early delayed effect because it may not appear immediately but only several days or months after radiotherapy in conjunction with other effects, such as demyelination, short-term memory loss and fatigue (Tofilon and Fike 2000). The appearance of this syndrome varies from 3–8 weeks after whole-brain irradiation (Freeman et al. 1973, Garwicz et al. 1975, Ballesteros-Zebadua et al. 2012).

Patients receiving whole brain radiotherapy represent a broad array of clinical conditions; thus, it is difficult to determine whether the observed sleep-wake alterations are attributable to the malignant disease itself, tumor location, adjuvant medication or a normal brain tissue reaction to ionizing radiation. To quantitatively measure changes in sleep-wake patterns after whole-brain irradiation in non-pathological conditions, we compared 24 h sleep electrographic recordings before and after whole-brain irradiation in a rat model.

The reduced incidence of RSS observed after anti-inflammatory treatment suggests that inflammation could be involved in the etiology of RSS (Mandell et al. 1989, Uzal et al. 1998). Because acutely enhanced expression of the pro-inflammatory cytokine interleukin 1 β (IL-1 β) has previously been demonstrated after whole-brain irradiation (Lee et al. 2010b), and IL-1 β is thought to be a promoter of non-rapid eye movement (NREM) sleep, we decided to measure IL-1 β expression by ELISA several weeks after irradiation. Thus, rats were sacrificed to measure the protein expression of IL-1 β in the irradiated brain 1 day after irradiation (as a reference) and 30 and 60 days after irradiation; these latter time points correspond to the time interval in which RSS has been

Correspondence: Dr Carlos Paz Tres, Neurophysiology Department, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS Insurgentes Sur 3677. Col. La Fama, C.P. 14269, Tlalpan, México, D.F. Tel: + 52 55 56063822 ext. 2021. E-mail: paztres@unam.mx

(Received 15 July 2013; revised 18 October 2013; accepted 22 October 2013)

1 reported in patients. As IL-1 β expression has been shown
2 by ELISA analysis to increase only in the hypothalamus,
3 and because IL-1 β has shown its sleep-promoting action
4 mainly in regions such as the median preoptic area (Baker
5 et al. 2005), we also decided to evaluate these regions with
6 immunofluorescence.

7 8 9 **Methods**

10 **Animals**

11 We used 40 male Wistar rats (7 weeks of age) weighing
12 170–210 g. All efforts were made to minimize both the
13 number of animals used and any potential pain or distress.
14 The handling of all rats conformed to institutional guidelines
15 that comply to national regulations (NOM-062-ZOO-1999)
16 and international guiding principles (CIOMS). Rats were
17 individually housed and allowed to move freely in transpar-
18 ent cages with corn-cob bedding at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ under a 12 h
19 light-dark cycle (lights on at 07:00 h). The rats were allowed
20 *ad libitum* access to food and water.

21 22 **Electrode implantation**

23 All rats were anesthetized with ketamine (Pisa, Mexico)
24 (100 mg/kg, i.p.) and xylazine (Pisa, Mexico) (10 mg/kg, i.p.)
25 and placed in a stereotactic frame (David Kopf, Tujunga,
26 CA, USA). Asepsis of the head and neck was achieved with
27 an iodine tincture, and small holes were made in the skull,
28 using a low-speed dental drill, to fix two electrodes (stainless
29 steel screws, Small Parts Inc., Logansport, IN, USA) over the
30 cerebral cortex for the electroencephalographic recordings
31 (EEG). Two additional electrodes (Teflon-coated steel wire,
32 AM Systems Inc., Carlsborg, WA, USA) were fixed to the neck
33 musculature to record the electromyograms (EMGs). A screw
34 fixed to the skull was used as a reference. We placed cortical
35 screws bilaterally in the skull near bregma, positioned as
36 recommended by Datta and Hobson (2000). The reference
37 electrode was positioned laterally near lambda. Electrodes
38 were fixed to a rectangular plug and secured to the skull
39 with dental acrylic, and the skin incisions were sutured.
40 Single intramuscular injections of gentamicin (Pisa, Mexico)
41 (40 mg/kg) and lysine clonixinate (Pisa, Mexico) (1 mg/kg)
42 were administered to prevent post-operative infection and
43 pain, respectively. After seven days of recovery, the rats were
44 habituated to the recording conditions.

45 46 **Whole-brain irradiation**

47 For whole-brain irradiation, we followed a previously
48 described procedure (Ballesteros-Zebadúa et al. 2010).
49 Briefly, we irradiated rats using high energy X-Rays from
50 a dedicated linear accelerator (Novalis, Brainlab-Varian,
51 6 MVolts with a 3 mMLC micro multi-leaf collimator) using
52 a custom fixation device that was mounted on a stereotactic
53 radiotherapy frame (Brainlab, Munich, Germany). Following
54 the habituation of the rats, we performed computer tomog-
55 raphy using the fixation device to create a tri-dimensional
56 reconstruction of each of the rats' skulls (thickness 0.7 mm,
57 Somatom Sensation tomography, Siemens, Munich,
58 Germany). This procedure allowed us to precisely locate

59 the radiation target using the same treatment planning
60 software that we use for stereotactic radiotherapy in patients
61 (Iplan 4.2, Brainlab, Munich, Germany). We designed a
62 treatment plan that included four conformal dynamic arcs
63 with beam entrances that avoided the electrode regions
64 (Ballesteros-Zebadúa et al. 2010). The brain was contoured
65 using a semi-automatic tool, and manual corrections were
66 made to include all tissue. The applied radiation doses have
67 previously been verified using Monte Carlo techniques
68 (Ballesteros-Zebadúa et al., 2010).
69

70 The rats were irradiated under deep anesthesia (ketamine
71 100 mg/kg, i.p.) over a time period of approximately 15 min
72 according to the irradiation plan. A prescription dose (12 Gy)
73 was chosen, as this dose is below the reported threshold
74 for vascular changes and radionecrosis (Calvo et al. 1988,
75 Hodges et al. 1998, Lawrence et al. 2010). This protocol not
76 only guaranteed full brain coverage but also protected the
77 peripheral tissue, especially the mucosal tract area. For sham
78 irradiation, animals were anesthetized and mounted in the
79 irradiation device but received no radiation dose.

80 81 **Polysomnographic studies**

82 For sleep evaluation, we performed 24 h (07:00–07:00 h)
83 polysomnographic recordings before and after cranial irra-
84 diation in each rat to analyze individual changes in sleep-
85 wake states.

86 Rat behavior was video-recorded over 24 h using a digital
87 camera (SmartDome, Samsung, Seoul, South Korea). Elec-
88 trographic recordings were obtained using a digital amplifier
89 (PSG32, Stellate Systems, Montreal, Canada) with a sampling
90 frequency of 256 Hz. The recordings were monitored and
91 saved on a hard drive for off-line analysis with Harmonie
92 v.5.2 software (Stellate Systems, Montreal, Canada).

93 Eighteen rats were first sham irradiated, and then
94 EEGs were recorded during sleep to acquire basal values.
95 Subsequently, the same rats were irradiated with 12 Gy and
96 divided into three post-irradiation time point groups: 1 day
97 ($n = 6$), 30 days ($n = 6$), and 60 days ($n = 6$). EEGs from the
98 rats recorded again at the appropriate post-irradiation times,
99 after which the rats were sacrificed for immunohistochemi-
100 cal analysis. Notably, no changes in total sleep time related
101 to age across the interval of ages we evaluated have been
102 reported in normal rats (Mendelson and Bergmann 1999).

103 Sleep data were scored in epochs of 30 s by one evaluator
104 who was blinded to the treatment. This evaluator reviewed
105 the recordings and used both behavioral and electrographic
106 criteria to delineate wakefulness (W), rapid eye movement
107 sleep (REM) and non-rapid eye movement sleep (NREM)
108 (Datta and Hobson 2000). Afterwards, we quantified the
109 total time spent in each condition and analyzed differences
110 between the pre- and post-irradiation measurements using
111 Friedman's pairwise tests (SPSS v. 20, Chicago, IL, USA). All
112 differences were considered statistically significant when
113 $p < 0.05$.

114 The rats received anesthesia (ketamine) when irradiated,
115 and, although the half-life of ketamine in plasma is approxi-
116 mately 3 h, we were still concerned that ketamine may have
117 interfered with the post-irradiation electrographic record-
118 ings, particularly in the group recorded 24 h after irradiation.

1 However, no differences were observed when ketamine was
 2 administered before the recordings; therefore, we dismissed
 3 any effect of this drug when administered 24 h before our
 4 recordings (data not shown). Additionally, control record-
 5 ings were compared with previously published reports, and
 6 the results were similar (Franco-Perez and Paz 2009).

8 ELISA

9 To determine the induction of IL-1 β that is independent of
 10 radiation-induced changes in sleep, we included a second
 11 group of 16 rats that were implanted with electrodes and
 12 sacrificed immediately after sham irradiation ($n=4$) or
 13 1 day ($n=4$), 30 days ($n=4$) or 60 days ($n=4$) after 12 Gy
 14 irradiation. For each experimental time point after sham or
 15 brain irradiation, rats were sacrificed at the same time of day
 16 (09:00 h). Rats were decapitated, and brain tissue from the
 17 hypothalamus, brainstem (bulb and pons) and frontal cortex
 18 was frozen at -70°C for further processing. The tissues were
 19 homogenized with lysis buffer (5 M HCl-guanidine, 50 mM
 20 Tris-HCl/pH 8.0, $1\times$ PBS) and protease inhibition cocktail
 21 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The protein concentra-
 22 tion of each homogenate was determined by BCA (Pierce
 23 bicinchoninic acid protein assay kit, Rockford, Thermo
 24 Scientific, IL, USA). ELISA testing for IL-1 β (KCRC0011,
 25 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was run according to the
 26 manufacturer's instructions. Briefly, 50 μl of sample or stan-
 27 dard was added to each well that was coated with primary
 28 antibodies against IL-1 β , rinsed with buffer, incubated with
 29 the corresponding biotinylated secondary antibodies, and
 30 rinsed again before adding the streptavidin-horseradish
 31 peroxidase solution and developing the reaction using the
 32 TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine) substrate solution
 33 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). After the enzyme was
 34 converted into a color, the signal absorbency was measured
 35 in a spectrophotometer (Microplate reader, Sunrise, Tecan,
 36 Switzerland) at 450 nm within 30 min of developing the
 37 reaction. Using light absorbencies and previously measured
 38 protein concentrations, the antigen quantity of each sample
 39 was determined (pg/mg of total protein). The data were ana-
 40 lyzed using a Kruskal-Wallis non-parametric test followed by
 41 a post-hoc Mann-Whitney U-test after applying the Bonfer-
 42 roni correction for differences between the groups (SPSS v.
 43 20, IL, USA).

45 Immunohistochemistry

46 As previously mentioned, rats used for sleep recordings
 47 were sacrificed after recording at 1, 30 or 60 days post-
 48 irradiation. An extra group of sham-irradiated rats was used
 49 for comparison ($n=6$). Rats were deeply anesthetized with
 50 sodium pentobarbital (Pisa, Mexico) and then transcardi-
 51 ally perfused with 200 ml of PBS (Sigma-Aldrich, St Louis,
 52 MO, USA), followed by paraformaldehyde (4%) (Sigma-
 53 Aldrich, St Louis, MO, USA). The brains were extracted
 54 and dehydrated gradually with alcohol (Sigma-Aldrich, St
 55 Louis, MO, USA) and xylene (Sigma-Aldrich, St Louis, MO,
 56 USA). The brains were paraffin-embedded and serial sagit-
 57 tal slices of 5 μm were sectioned around the hypothalamic
 58 preoptic area (lateral 0.4 mm; antero-posterior -0.3 mm;
 59 and dorso-ventral 9 mm relative to bregma) according to a

stereotaxic atlas (Paxinos and Watson 1997). Next, sections 60
 were mounted on silane-coated slides. The brain slices 61
 were gradually rehydrated in decreasing alcohol concen- 62
 trations. The sections were washed in PBS and incubated 63
 for 48 h at 4°C with primary goat polyclonal antibody to 64
 rat IL-1 β (1:100, sc-1252, Santa Cruz Biotechnology, CA, 65
 USA). The use of this antibody in immunohistochemistry 66
 in rats and its specificity determinations were previously 67
 reported by Acarin et al. (2000). After incubation, the sec- 68
 tions were washed twice with PBS, 1% BSA and 0.3% Triton 69
 X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Afterwards, 70
 IL-1 β was tagged by incubation with anti-goat IgG directly 71
 conjugated to fluorescein (FITC 1:100, 115-095-146, Jack- 72
 son Immune Research, PA, USA) for 24 h at 4°C . Finally, 73
 the sections were mounted with DAPI (Fluoroshield F6057, 74
 Sigma, MO, USA). The sections were observed using an 75
 Olympus IX81-F3 microscope equipped with an Olym- 76
 pus evolution Q-imaging digital camera kit. Photographs 77
 were taken along the line between the chiasm and anterior 78
 commissure, just above the chiasm at the median pre- 79
 optic region, according to the atlas (Paxinos and Watson 80
 1997). All images were taken with a $40\times$ objective under 81
 the same light and processing conditions and filtered with 82
 Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) software to clear the 83
 background using a minimum filter (2.0 pixels). For each 84
 $40\times$ field, the percentage of IL-1 β immunopositive signal- 85
 ing was calculated. Total cells were counted according to 86
 DAPI stained nuclei. IL- β signaling was counted as posi- 87
 tive when FITC stains were overlapping or surrounding 88
 nuclei. Counting was performed by an operator blinded to 89
 the treatment. Differences were analyzed using a Kruskal- 90
 Wallis non-parametric test followed by a post-hoc Mann- 91
 Whitney U-test after applying the Bonferroni correction 92
 for differences between the groups (SPSS v. 20, IL, USA). 93
 Because IL-1 β immunopositive signaling and sleep-wake 94
 times were both acquired from the same samples, correla- 95
 tions between measures were analyzed using Spearman's 96
 rank correlation tests (SPSS v. 20, IL, USA). 97

99 Results

101 Sleep-wake analysis

102 During the dark phase, rats spent significantly more time in 102
 NREM sleep and less time in wakefulness after whole-brain 103
 irradiation regardless of the post-irradiation time (NREM 104
 median change: 20.5 min, $p=0.0001$; wakefulness median 105
 change: 31.50 min, $p=0.002$). This increment in NREM sleep 106
 was statistically significant 1 day after irradiation (median 107
 change: 11.0 min $p=0.014$) and 30 days after irradiation 108
 (median change: 42.33 min, $p=0.014$). Notably, the change 109
 in NREM sleep was greater for the 30-day group (Figure 1A). 110
 Increases in NREM sleep were also noticeable for the 60-day 111
 group, but the difference did not reach statistical significance 112
 (median change 58.5 min, $p=0.414$). 113

114 In contrast, during the light phase (Figure 1B), irradiated 114
 and sham rats spent equivalent times in NREM sleep. The 115
 data spread (interquartile range) was also noticeably wider 116
 after 60 days, at which point differences after irradiation 117
 became indistinguishable (Figure 1B). 118

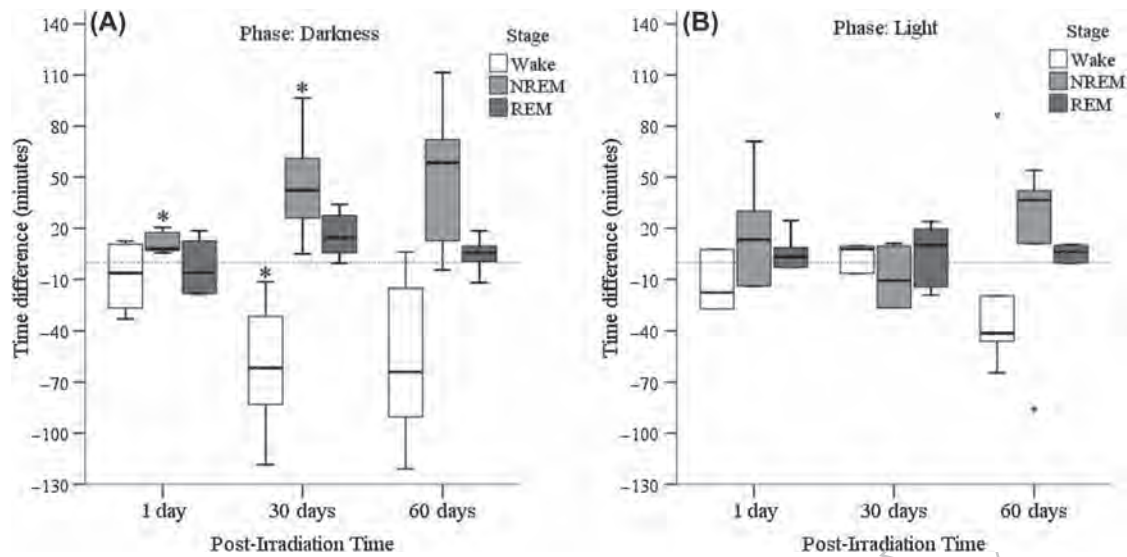


Figure 1. Boxplot showing the differences in time spent in each stage of the sleep-wake cycle before and after whole-brain irradiation (12 Gy); (A) darkness and (B) light. Values above the zero line (dotted) represent increases in overall time, and values below the zero line represent decrements ($*p < 0.05$). Boxes represent the 25th-75th percentiles (interquartile range, or IQR); medians are indicated by the middle black lines. Whiskers represent the top and bottom 25% of scores. Outliers (scores more than 1.5 times the IQR) are indicated by triangles.

Cytokine expression

Protein expression of IL-1 β was significantly higher only in the hypothalamus, 30 days (51.1% higher, $p = 0.017$) and 60 days (64.75% higher, $p = 0.017$) after irradiation (Figure 2). In contrast, the expressions of IL-1 β in irradiated and sham brainstems (bulb and pons) and frontal cortices were similar (Figure 2).

Immunoreactivity for IL-1 β in the median preoptic area was consistently increased at the three time points after whole-brain irradiation (Figure 3C, 3D, 3E), but the difference was greater and statistically significant only at 30 days

after irradiation (24.7% greater, $p = 0.027$) (Figure 3D, 3F). The observed IL-1 β expression was mainly cytoplasmic surrounding nuclei but some apparent signal overlapping with the nuclei was also found. The numbers of nuclei per field were similar for all time points after irradiation. Although outside the scope of this work, we should mention that we also observed positive signal in the hippocampus at the three time intervals after irradiation (data not shown) as has been previously reported (Monje et al. 2002, Lee et al. 2010b, Jenrow et al. 2013).

The data may suggest a trend since we found a positive correlation coefficient between the measured percentage of IL-1 β positive immunostaining and NREM sleep time in the dark phase, although the effect was not statistically significant (Spearman's rank correlation coefficient = 0.467, $p = 0.103$). Correspondingly, a negative correlation coefficient between IL-1 β positive immunostaining and wake time was observed (Spearman's rank correlation coefficient = -0.450, $p = 0.112$), although the effect was not statistically significant either.

Discussion

In our rat model, the total time spent sleeping was slightly increased after whole-brain irradiation during the dark (active) phase. Our quantitative model of the observed effects in normal brain tissue yielded results that seem consistent with reports of patients in which increased day somnolence was observed (Ryan 2000); although patients have reported wider ranges of changes in sleep times after whole-brain radiotherapy that vary from light somnolence to highly prolonged periods of sleep (up to 20 h/day) (Freeman et al. 1973). We observed more noticeable changes in sleep duration 30 days after irradiation. This finding is also consistent with the symptoms observed in patients that may only appear approximately 4 weeks after irradiation (Ballesteros-Zebadua et al. 2012).

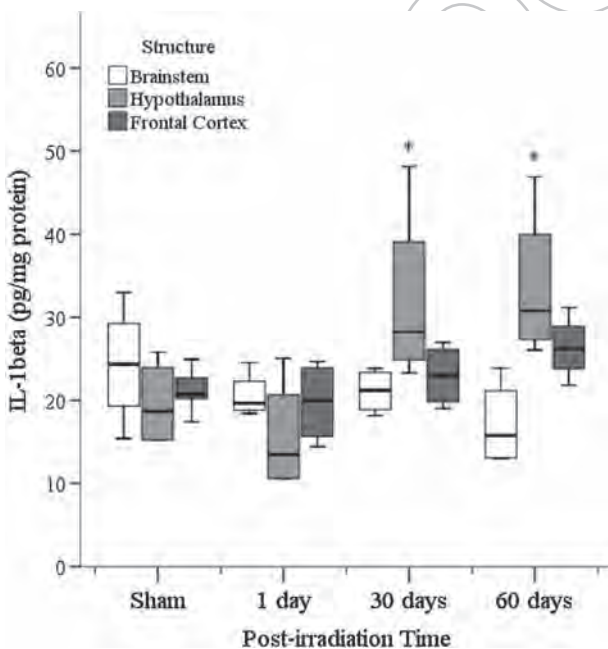


Figure 2. Concentrations of IL-1 β protein following sham or 12 Gy whole-brain irradiation assessed by ELISA in three brain regions: the brainstem, hypothalamus and cortex. In the hypothalamus, the IL-1 β levels in the irradiated brains were significantly elevated ($*p < 0.05$) compared to the shams at 30 and 60 days after irradiation.

60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118

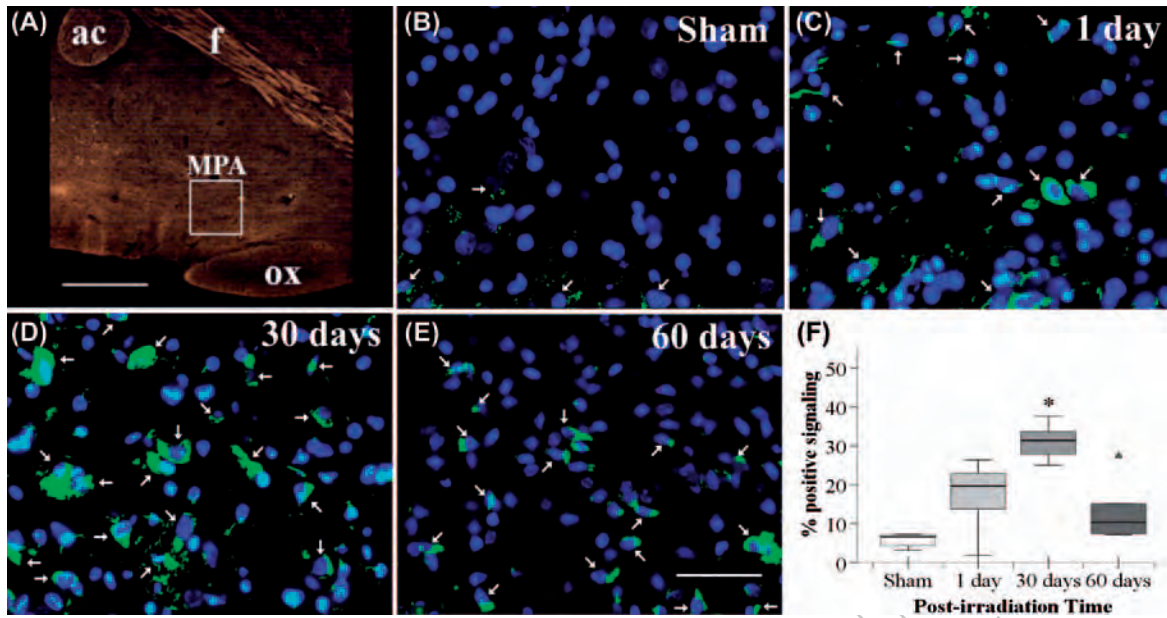


Figure 3. (A) Photomicrograph (4 \times) of the hypothalamus showing the location of the median preoptic area (MPA) according to an atlas (Paxinos and Watson 1997) displaying the anterior commissure (ac), optic chiasm (ox) and fornix (f). Scale bar represents 1000 μ m. Photomicrographs (40 \times) of IL-1 β (green) immunoreactivity and DAPI (blue) staining in the median preoptic area after sham irradiation (B) and at three time points after 12 Gy whole-brain irradiation (C, D, E). Scale bar represents 100 μ m. Arrows indicate positive IL-1 β signaling surrounding nuclei. (F) Graph showing the percentages of IL-1 β positive immunostaining following sham or at three time points after 12 Gy whole-brain irradiation (* $p < 0.05$).

In the normal brain, the basal expression of IL-1 β protein is low, but the induction of IL-1 β after several types of brain injury has been repeatedly reported (Acarin et al. 2000). According to our findings, the protein expression of IL-1 β was altered in specific brain regions after brain irradiation. Similarly, in the rotenone Parkinson disease model, increases in IL-1 β expression are only observed in the hypothalamus and not in the cortex or brainstem, which indicates that the hypothalamus may be relevant to the inflammatory response to brain injury (Yi et al. 2007). Correspondingly, Lee et al. (2010b) reported that the expression of IL-1 β protein is altered in specific brain regions after brain irradiation. These authors found higher levels of IL-1 β in the hippocampus than in the cortex after 1 day of exposure to whole-brain irradiation in rats (Lee et al. 2010b). In our work, however, no differences in the cortical expression of IL-1 β protein were detected at 1 day, 30 days or 60 days after irradiation. These apparently contradictory results regarding the first day after irradiation may be explained by differences in the experimental setup, as our comparisons were made against sham rats that had been implanted with skull electrodes for electrographic recordings. The implantation of the electrodes may have led to differences in the expression of IL-1 β at baseline and at the other comparison time points.

Most of the existing studies of inflammatory profiles after brain irradiation have a maximum follow-up time of one day (Ballesteros-Zebadua et al. 2012). There is only one study that has investigated the delayed inflammatory profile after irradiation over several months using whole hemisphere tissue, but no changes in IL-1 β mRNA expression were observed even after 6 months of follow-up (Chiang et al. 1997). In contrast, our findings showed that the protein expression of IL-1 β was increased only in the hypothalamus

after 30 and 60 days post-irradiation, indicating that this particular sleep-wake cycle-regulating brain region displays a delayed inflammatory response after irradiation. Because an age-dependent attenuation of the IL-1 β response immediately after brain irradiation has been reported (Lee et al. 2010a), the increase we observed in IL-1 β after the chosen post-irradiation intervals was likely due to ionizing radiation and not to age. Although it is not the purpose of this work, we must mention that the observed delay in the inflammation response may be related to the sustained activation of microglia, which is thought to be the main contributor to chronic inflammatory states in the brain (Joo et al. 2012). Persistent microglial activation has also been reported in the rodent brain after irradiation (Monje et al. 2002, Conner et al. 2010). Accordingly, glial cells have been proposed to be modulators of sleep and immune interactions (Ingiosi et al. 2013).

Pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β are also responsible for the so-called 'sickness behavior' that has been described to occur during the acute phase of infection. Patients exhibiting this sickness behavior may display behavioral alterations similar to those reported after whole-brain radiotherapy, including lethargy, anorexia, weakness, altered sleep/wake patterns, etc. (Dantzer and Kelley 2007). Other brain injury models have also shown significant increases in IL-1 β expression that are associated with sleep disturbances (Yi et al. 2007). Moreover, after brain radiotherapy, patients receiving anti-inflammatory steroids show milder symptoms of RSS, which supports the theory that inflammation may be closely related to the etiology of RSS (Uzal et al. 1998). IL-1 β has been described as a sleep-wake cycle regulator, as it can promote NREM sleep generation (Clinton et al. 2011). Increases in NREM sleep have been observed after diverse inflammatory injuries and after IL-1 β intraventricular injection in animal models

60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118

(Krueger et al. 2001). It is well known that GABAergic neurons from the hypothalamic preoptic area can mediate the induction and maintenance of NREM sleep (McGinty and Szymusiak 2001, Szymusiak and McGinty 2008). Additionally, it has been suggested that these GABAergic neurons may promote sleep by inhibiting systems in the wakefulness-promoting nuclei (Szymusiak and McGinty 2008). IL-1 β has also been shown to increase NREM sleep through the activation of the hypothalamic median preoptic nucleus (Alam et al. 2004, Baker et al. 2005), and this activation is apparently mediated by the induction of hyperpolarization and the enhancement of presynaptic GABA release (Tabarean et al. 2006, Brambilla et al. 2007). These findings indicate that, although no statistically significant correlations were found, the observed increases in NREM sleep may be directly correlated with the elevated levels of IL-1 β we found in the median preoptic area of the hypothalamus. However, larger samples are needed to determine whether there is an association between these variables or whether a more complex behavior is involved.

Notably, the differences in sleep duration were clearly distinguishable only during the dark phase. Rats are most active during the dark phase; thus, increased sleep may be more noticeable during this time. However, our findings may also be related to the circadian influence of immune function. For example, IL-1 β levels have been reported to display diurnal variation in normal brains; higher hypothalamic levels of IL-1 β are expressed during the light period, which parallels the increase in the amount of physiological NREM sleep during this time (Taishi et al. 1997). Additionally, there is a diurnal variation in the IL-1 β receptor in the brain; this receptor is expressed at higher levels at the end of the dark phase (Beynon and Coogan 2010, Hight et al. 2010). The known effects of IL-1 β in sleep have been described to be mediated by the type I receptor (IL-1RI), and correspondingly, one report found slight decreases in sleep only during the dark phase in IL-1RI KO mice (Fang et al. 1998). Thus, this circadian regulation may account for the fact that the effects of increased IL-1 β occurred primarily during the dark phase.

Although *in vivo* results from rats cannot be fully extrapolated to humans, and despite the fact that single doses of whole-brain irradiation are rarely given to humans, based on the biologically effective dose (BED), the radiation dosage we used (12 Gy) is nearly equivalent to the 30 Gy that patients usually receive over the course of 10 treatments (Murray et al. 1997). Moreover, other authors have suggested similar approaches (Monje et al. 2002, Lee et al. 2010b). Nevertheless, other paradigms that involve fractionated radiation schemes for use in rats *in vivo* should also be explored.

One limitation of our model is that all rats had to be anesthetized throughout the irradiation or sham procedure. Most general anesthetics, including ketamine, have been shown to attenuate lipopolysaccharide-induced cytokines levels in several animal models, which suggests a common pathway of attenuation of the inflammatory response (Fuentes et al. 2006). Specifically, ketamine has been shown to reduce lipopolysaccharide-induced cytokine expression

in the rat prefrontal cortex (Yang et al. 2013). Although there are no reports of the protective effects of anesthesia during brain irradiation, similar anti-inflammatory effects could be present. However, we were able to detect an inflammatory response after irradiation, but this response was most likely reduced compared to the response that would be observed without anesthesia. In patients, general anesthesia is not common during whole-brain radiotherapy; therefore, the inflammatory response in patients may be greater because the protective effects of anesthesia are absent, but these responses have not been measured in patients.

Although the symptoms of RSS are considered to be benign, RSS in patients may be a clinical indicator of other radiation-induced sequelae. It has been proposed that RSS could be a predictor of radiation-induced cognitive deficits in patients treated with whole-brain radiotherapy, although this has not been demonstrated (Uzal et al. 1998). Additionally, because somnolence may be associated with IL-1 β production, RSS could be an indicator of several pro-inflammatory processes that can occur after irradiation and lead to brain injury (Tofilon and Fike 2000). Conversely, it is also known that inflammatory cytokines such as IL-1 β have neuroprotective effects that promote neuron survival and differentiation and may be crucial for brain healing after radiation (Morganti-Kossmann et al. 1997). Therefore, a better understanding of how RSS and other radiation-induced effects may be related is still needed.

The present study quantitatively demonstrated that ionizing radiation can induce significant increases in the amount of sleep during the dark phase when applied to normal brain tissue. This finding may suggest that our whole-brain irradiation rat model mimics sleep-wake disruptions observed in patients and may be a suitable model for further studies of RSS and its etiology. Our results also revealed a delayed increase in IL-1 β expression in the hypothalamus after whole-brain irradiation. Because IL-1 β has been shown to induce sleep, these results may suggest that the observed increase in NREM sleep is a symptom that is closely related to the observed inflammatory response of normal brain tissue to ionizing radiation. Nevertheless, it is still necessary to further evaluate all the mechanisms involved. Future work in this area may include the evaluation of anti-inflammatory drugs and cytokine antagonists.

Acknowledgements

This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biomedical Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). We would like to thank S. Moreno Jiménez and J. M. Lárraga Gutiérrez for their support and facilitation of the Radiosurgery Unit resources. We also would like to thank J. Guevara Fonseca for the use of the microscope and J. Hernández Falcón for his valuable comments on this work.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117[AQ4]
118

References

- 1 **References**
- 2 Acarin L, Gonzalez B, Castellano B. 2000. Neuronal, astroglial and
- 3 microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the
- 4 immature rat brain. *Eur J Neurosci* 12:3505-3520.
- 5 Alam MN, McGinty D, Bashir T, Kumar S, Imeri L, Opp MR,
- 6 Szymusiak R. 2004. Interleukin-1beta modulates state-dependent
- 7 discharge activity of preoptic area and basal forebrain neurons: Role
- 8 in sleep regulation. *Eur J Neurosci* 20:207-216.
- 9 Baker FC, Shah S, Stewart D, Angara C, Gong H, Szymusiak R, Opp MR,
- 10 McGinty D. 2005. Interleukin 1beta enhances non-rapid eye
- 11 movement sleep and increases c-Fos protein expression in the
- 12 median preoptic nucleus of the hypothalamus. *Am J Physiol Regulat*
- 13 *Integrat Comparat Physiol* 288:R998-1005.
- 14 Ballesteros-Zebadua P, Chavarria A, Celis MA, Paz C, Franco-Perez J.
- 15 2012. Radiation-induced neuroinflammation and radiation somno-
- 16 lence syndrome. *CNS Neurolog Diss Drug Targets* 11:937-949.
- 17 Ballesteros-Zebadua P, Lárraga-Gutierrez JM, García-Garduño OA,
- 18 Rubio-Osornio MC, Custodio-Ramírez V, Moreno-Jimenez S,
- 19 Suarez-Campos JE, Paz C, Celis MA. 2010. Irradiation design for an
- 20 experimental murine model. *AIP Conf Proc* 1310:4.
- 21 Beynon AL, Coogan AN. 2010. Diurnal, age, and immune regulation
- 22 of interleukin-1beta and interleukin-1 type 1 receptor in the mouse
- 23 suprachiasmatic nucleus. *Chronobiol Int* 27:1546-1563.
- 24 Brambilla D, Franciosi S, Opp MR, Imeri L. 2007. Interleukin-1
- 25 inhibits firing of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus
- 26 and enhances GABAergic inhibitory post-synaptic potentials.
- 27 *Eur J Neurosci* 26:1862-1869.
- 28 Calvo W, Hopewell JW, Reinhold HS, Yeung TK. 1988. Time- and dose-
- 29 related changes in the white matter of the rat brain after single doses
- 30 of X-rays. *Br J Radiol* 61:1043-1052.
- 31 Clinton JM, Davis CJ, Zielinski MR, Jewett KA, Krueger JM. 2011.
- 32 Biochemical regulation of sleep and sleep biomarkers. *J Clin Sleep*
- 33 *Med* 7:S38-42.
- 34 Conner KR, Payne VS, Forbes ME, Robbins ME, Riddle DR. 2010.
- 35 Effects of the AT1 receptor antagonist L-158,809 on microglia and
- 36 neurogenesis after fractionated whole-brain irradiation. *Radiat Res*
- 37 173:49-61.
- 38 Chiang CS, Hong JH, Stalder A, Sun JR, Withers HR, McBride WH.
- 39 1997. Delayed molecular responses to brain irradiation. *Int J Radiat*
- 40 *Biol* 72:45-53.
- 41 Dantzer R, Kelley KW. 2007. Twenty years of research on cytokine-
- 42 induced sickness behavior. *Brain Behav Immunity* 21:153-160.
- 43 Datta S, Hobson JA. 2000. The rat as an experimental model for sleep
- 44 neurophysiology. *Behav Neurosci* 114:1239-1244.
- 45 Faithfull S, Brada M. 1998. Somnolence syndrome in adults following
- 46 cranial irradiation for primary brain tumours. *Clin Oncol (Royal*
- 47 *College of Radiologist)* 10:250-254.
- 48 Fang J, Wang Y, Krueger JM. 1998. Effects of interleukin-1 beta on sleep
- 49 are mediated by the type I receptor. *Am J Physiol* 274:R655-660.
- 50 Franco-Perez J, Paz C. 2009. Quinine, a selective gap junction blocker,
- 51 decreases REM sleep in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 94:250-254.
- 52 Freeman JE, Johnston PG, Voke JM. 1973. Somnolence after
- 53 prophylactic cranial irradiation in children with acute lymphoblastic
- 54 leukaemia. *Br Med J* 4:523-525.
- 55 Fuentes JM, Talamini MA, Fulton WB, Hanly EJ, Aurora AR, De Maio A.
- 56 2006. General anesthesia delays the inflammatory response and
- 57 increases survival for mice with endotoxic shock. *Clin Vaccine*
- 58 *Immunol* 13:281-288.
- 59 Garwicz S, Aronson S, Elmqvist D, Landberg T. 1975. Postirradiation
- syndrome and EEG findings in children with acute lymphoblastic
- leukaemia. *Acta Paedia Scand* 64:399-403.
- Hight K, Hallett H, Churchill L, De A, Boucher A, Krueger JM. 2010.
- Time of day differences in the number of cytokine-, neurotrophin-
- and NeuN-immunoreactive cells in the rat somatosensory or visual
- cortex. *Brain Res* 1337:32-40.
- Hodges H, Katzung N, Sowinski P, Hopewell JW, Wilkinson JH,
- Bywaters T, Rezvani M. 1998. Late behavioural and neuropathological
- effects of local brain irradiation in the rat. *Behav Brain Res*
- 91:99-114.
- Ingiosi AM, Opp MR, Krueger JM. 2013. Sleep and immune function: 60
- Glial contributions and consequences of aging. *Curr Op Neurobiol.* 61
- Advance online publication. doi: 10.1016/j.conb.2013.02.003. [AQ6]
- Jenrow KA, Brown SL, Lapanowski K, Naei H, Kolozsvary A, Kim JH. 62
2013. Selective inhibition of microglia-mediated neuroinflammation 63
- mitigates radiation-induced cognitive impairment. *Radiat Res* 64
- 179:549-556.
- Joo KM, Jin J, Kang BG, Lee SJ, Kim KH, Yang H, Lee YA, Cho YJ, 65
- Im YS, Lee DS, Lim DH, Kim DH, Um HD, Lee SH, Lee JJ, 66
- Nam DH. 2012. Trans-differentiation of neural stem cells: A 67
- therapeutic mechanism against the radiation induced brain 68
- damage. *PLoS One* 7:e25936.
- Krueger JM, Obal FJ, Fang J, Kubota T, Taishi P. 2001. The role of 69
- cytokines in physiological sleep regulation. *Ann NY Acad Sci* 70
- 933:211-221.
- Lawrence YR, Li XA, el Naqa I, Hahn CA, Marks LB, Merchant TE, 71
- Dicker AP. 2010. Radiation dose-volume effects in the brain. *Int J* 72
- Radiat Oncol Biol Phys* 76:S20-27.
- Lee WH, Sonntag WE, Lee YW. 2010a. Aging attenuates radiation- 73
- induced expression of pro-inflammatory mediators in rat brain. 74
- Neurosci Lett* 476:89-93.
- Lee WH, Sonntag WE, Mitschelen M, Yan H, Lee YW. 2010b. Irradiation 75
- induces regionally specific alterations in pro-inflammatory environ- 76
- ments in rat brain. *Int J Radiat Biol* 86:132-144.
- Mandell LR, Walker RW, Steinherz P, Fuks Z. 1989. Reduced incidence 77
- of the somnolence syndrome in leukemic children with steroid coverage 78
- during prophylactic cranial radiation therapy. Results of a pilot 79
- study. *Cancer* 63:1975-1978.
- McGinty D, Szymusiak R. 2001. Brain structures and mechanisms 80
- involved in the generation of NREM sleep: Focus on the preoptic 81
- hypothalamus. *Sleep Med Rev* 5(4):323-342.
- Mendelsohn WB, Bergmann BM. 1999. Age-related changes in sleep in 82
- the rat. *Sleep* 22:145-150.
- Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD. 2002. Irradiation induces 83
- neural precursor-cell dysfunction. *Nature Med* 8:955-962.
- Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, Hans V, Stahel P, Csuka E, 84
- Ammann E, Stocker R, Trentz O, Kossmann T. 1997. Production of 85
- cytokines following brain injury: Beneficial and deleterious for the 86
- damaged tissue. *Molec Psychiat* 2:133-136.
- Murray KJ, Scott C, Greenberg HM, Emami B, Seider M, Vora NL, 87
- Olson C, Whitton A, Movsas B, Curran W. 1997. A randomized 88
- phase III study of accelerated hyperfractionation versus standard in 89
- patients with unresected brain metastases: A report of the Radiation 90
- Therapy Oncology Group (RTOG) 9104. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 91
- 39:571-574.
- Paxinos G, Watson C. 1997. The rat brain in stereotaxic coordinates. 92
- 3d ed. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Ryan J. 2000. Radiation somnolence syndrome. *J Pediat Oncol Nurs* 93
- 17:50-53.
- Szymusiak R, McGinty D. 2008. Hypothalamic regulation of sleep and 94
- arousal. *Ann NY Acad Sci* 1129:275-286.
- Tabarean IV, Korn H, Bartfai T. 2006. Interleukin-1beta induces 95
- hyperpolarization and modulates synaptic inhibition in preoptic 96
- and anterior hypothalamic neurons. *Neuroscience* 141:1685-1695.
- Taishi P, Bredow S, Guha-Thakurta N, Obal F Jr, Krueger JM. 1997. 97
- Diurnal variations of interleukin-1 beta mRNA and beta-actin mRNA 98
- in rat brain. *J Neuroimmunol* 75:69-74.
- Tofilon PJ, Fike JR. 2000. The radioresponse of the central nervous 99
- system: A dynamic process. *Radiat Res* 153:357-370.
- Uzal D, Ozyar E, Hayran M, Zorlu F, Atahan L, Yetkin S. 1998. 100
- Reduced incidence of the somnolence syndrome after prophylactic 101
- cranial irradiation in children with acute lymphoblastic leukemia. 102
- Radiother Oncol* 48:29-32.
- Yang C, Hong T, Shen J, Ding J, Dai XW, Zhou ZQ, Yang JJ. 2013. 103
- Ketamine exerts antidepressant effects and reduces IL-1beta and 104
- IL-6 levels in rat prefrontal cortex and hippocampus. *Experim* 105
- Therap Med* 5:1093-1096.
- Yi PL, Tsai CH, Lu MK, Liu HJ, Chen YC, Chang FC. 2007. 106
- Interleukin-1beta mediates sleep alteration in rats with 107
- rotenone-induced Parkinsonism. *Sleep* 30:413-425. 108
- 109
- 110
- 111
- 112
- 113
- 114
- 115
- 116
- 117
- 118

14.2 OTROS TRABAJOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

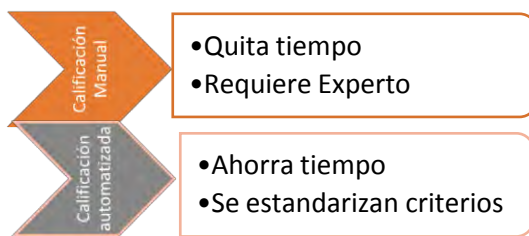
14.2.1 Método de calificación automática para la evaluación de etapas de sueño en registros electrográficos de corteza en animales

INTRODUCCIÓN

Para el estudio del sueño en modelos animales se emplean sistemas de registro electrográfico de 24 hrs; sin embargo, la calificación de las etapas de sueño a lo largo de dicho registro puede ser un procedimiento largo y manual que realiza el investigador apoyado con el análisis conductual mediante el registro de video. Existen diversos trabajos que confirman la presencia de componentes no lineales en la dinámica del electroencefalograma [1] sin embargo se ha visto que no se trata de un sistema caótico de bajas dimensiones[2] y se cuestiona la aplicación de medidas de caos en sistemas reales con componentes estocásticas ya que no han aportado nueva información significativa al análisis espectral[2]. La implantación de electrodos mediante cirugía puede generar ruido variable en cada registro y el análisis espectral de la transformada de Fourier permite distinguir bandas de frecuencia más no permite hacer la clasificación clara de las tres etapas de sueño (sueño de movimientos oculares rápidos MOR o paradójico, sueño NMOR o de ondas lentas y vigilia). En este trabajo se propone el análisis basado en amplitudes con respecto al promedio basal individual de cada registro. De esta manera si el promedio de las amplitudes en este periodo de tiempo es mayor o menor a umbrales establecidos por el usuario entonces ocurre un cambio de estado. De acuerdo con esto se probaron diferentes umbrales encontrando valores críticos para una mejor correspondencia con el análisis de estados mediante la calificación visual.

OBJETIVO

Desarrollar un programa capaz de clasificar las etapas de sueño y que obtenga resultados similares al método visual de calificación del electroencefalograma.



MÉTODOS

Para obtener la señal electrográfica se emplean ratas previamente implantadas con electrodos corticales. Trascurridos 7 días de recuperación se lleva a cabo la habituación a las condiciones de registro electrográfico durante 7 días.

Para el registro electroencefalográfico se emplea una conexión con un amplificador para polisomnografía (BioScience Vector PSG32), permitiendo a las ratas libre movimiento y empleando monitoreo continuo mediante video

El registro electroencefalográfico se realiza durante 24 hrs. (inicio 7:00 am concluye 7:00pm. Posteriormente se lleva a cabo la calificación visual de las etapas de sueño junto con el video por experto. La señal electrográfica se almacena de manera digital y es transformada a una señal de texto (SIG->EDF -> ASCII -> txt) Esto permite correr la secuencia de rutinas programadas en MatLab y variar los parámetros de las mismas para así obtener los tiempos totales y finalmente llevar a cabo la comparación entre la evaluación obtenida y calificación visual para los diferentes parámetros de corte.

Programación en Matlab

1. Detección de los cruces de la señal en cero
2. Detección de los máximos de amplitud
3. conteo y almacenado del tiempo transcurrido con la información de la amplitud y frecuencia de cada onda
4. Promedio de amplitud en épocas de 30 segundos
5. Selección de los parámetros de corte mediante el promedio varios segmentos detectados como NMOR y Vigilia
6. Se califica el estado de cada epoca de acuerdo con el parámetro dado asignando 0 a vigilia y 1 al sueño NMOR.
7. Se obtiene el tiempo total transcurrido para cada estado

RESULTADOS PRELIMINARES

Para poder iniciar el diseño del programa se creó una señal de prueba secuencial con variaciones claras en la amplitud en diferentes intervalos de tiempo.

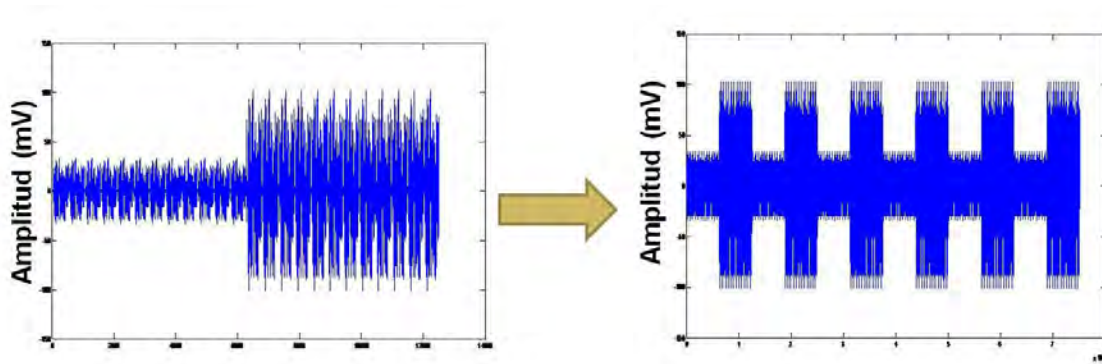


Figura 1. Generación de un segmento de señal con amplitud modificada para la simulación de pruebas del algoritmo.

Posteriormente el programa detecta los máximos de amplitud en cada intervalo para así posteriormente poder determinar la amplitud promedio del intervalo en cuestión.

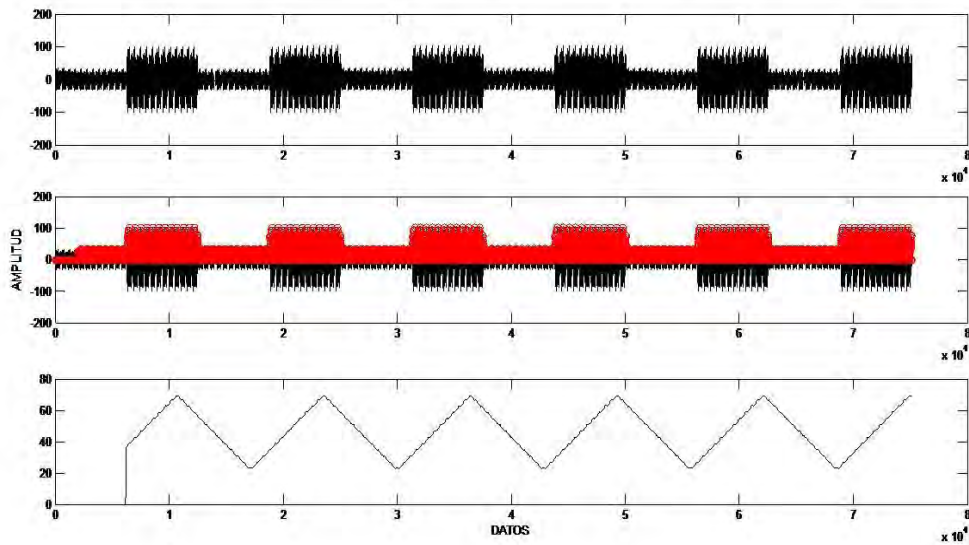


Fig. 2. Detección de los máximos de amplitud en la señal de prueba.

Posteriormente se hace un conteo y se almacena el tiempo trascendido así como la información de amplitud y frecuencia de cada segmento. Se promedia la amplitud en épocas de 30 segundos. El programa requiere de la selección de los parámetros de corte tomando como base el promedio varios segmentos detectados como NMOR y Vigilia.

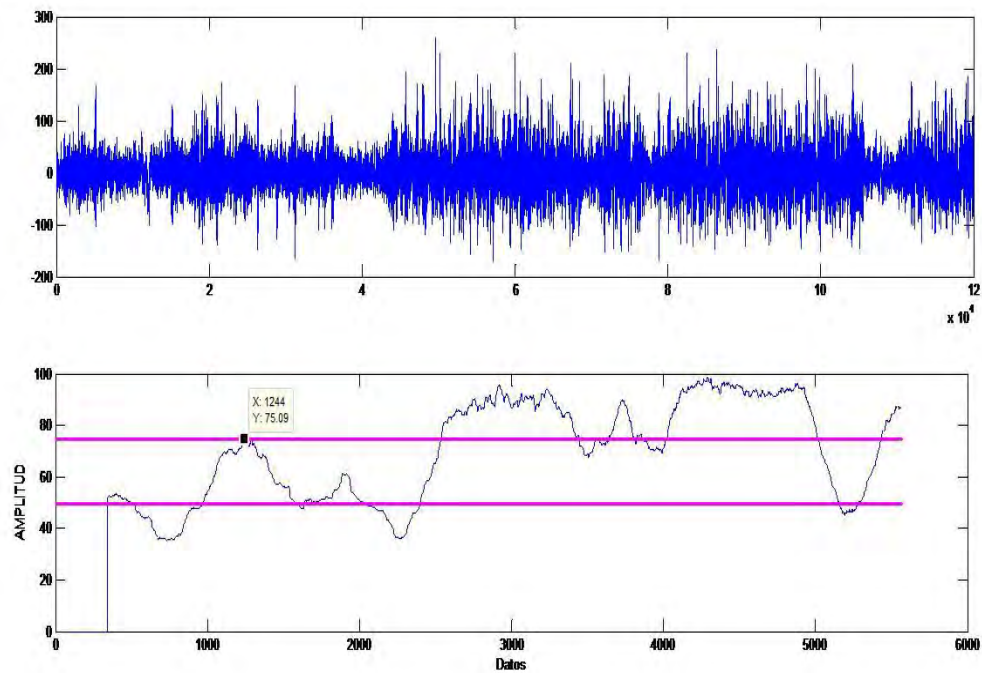


Fig. 3 En la parte superior se muestra el segmento de señal de 10 minutos. En la inferior se muestra como los cambios de estado son detectados en un fragmento de 30 segundos (6000 datos) antes de que el umbral elegido sea rebasado.

Finalmente el programa califica el estado de cada época de acuerdo con el parámetro dado asignando 0 a vigilia y 1 al sueño NMOR y se obtiene el tiempo total transcurrido para cada estado

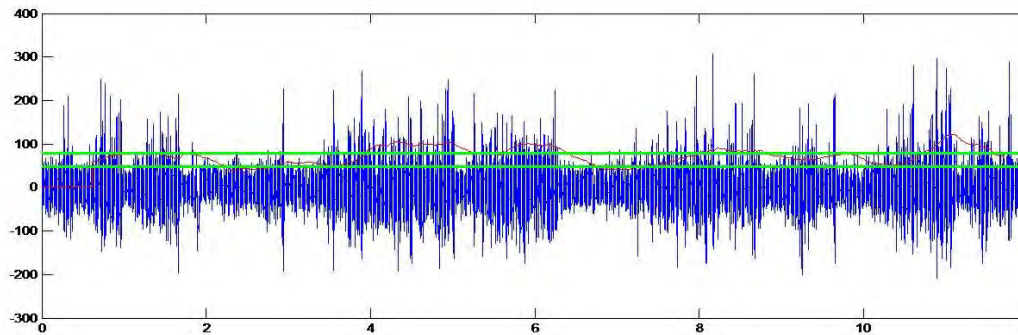


Fig. 4 Calificación gráfica. Se observa como el programa detecta un cambio de estado cuando supera apenas uno de los umbrales. Esto indica que la señal ha tenido amplitudes mayores (o menores según sea el caso) durante los últimos 30 segundos.

En la tabla 1. Se observa un ejemplo de calificación para un segmento de 10 minutos de señal electrográfica. En la Tabla 2. se observa la calificación manual del mismo fragmento. Finalmente en la Tabla 3. se observan la comparación entre ambos métodos. Aún es necesario tanto optimizar los parámetros como aplicar el programa a fragmentos más largos de la señal para hacer comparaciones.

Estado	0	1	0	1	0	1	0	1
Tiempo (Datos)	2423	13062	17198	28932	11808	20717	6025	19664
Tiempo (Segundos)	12.12	65.31	85.99	144.66	59.04	103.59	30.13	98.32
Tiempo (Minutos)	0.20	1.09	1.43	2.41	0.98	1.73	0.50	1.64

Tabla 1. Calificación del programa en un segmento de 10 minutos

Hora	VIGILIA	NMOR
22:50:00	00:00:30	
22:50:30		00:02:30
22:53:00	00:01:30	
22:54:30		00:02:30
22:57:00	00:00:30	
22:57:30		00:02:00
22:59:30	00:00:30	
23:00:00		

Tabla 2. Calificación visual del fragmento de señal por el experto

	Tiempo NMOR (minutos)	Tiempo Vigilia (minutos)	Cambios de estado
Calificación Visual	7	3	7
Calificación Automática	6.87	3.11	8
Diferencia Porcentual	1.86	3.67	

Tabla 3. Comparación entre los dos métodos de calificación durante el periodo de 10 minutos. Los parámetros fueron 80 para NMOR y 50 para vigilia

CONCLUSIONES

La señal electroencefalográfica es un fenómeno complejo que ha confirmado tener una naturaleza no lineal[2]. Se han encontrado variaciones en las dimensiones de correlación a lo largo del ciclo sueño vigilia que podrían facilitar la calificación automática de las etapas de sueño[1]. Sin embargo en este trabajo se encontró un algoritmo lineal capaz de detectar cambios notables en la amplitud de la señal electrográfica durante épocas de 30 segundos o más, empleando el promedio individualizado de las amplitudes y umbrales establecidos por el usuario determinando un cambio de estado. De acuerdo con esto se probaron diferentes umbrales encontrando valores de corte óptimos (50 para vigilia y 80 para sueño NMOR) para una mejor correspondencia con el análisis de estados mediante la calificación visual. Se espera extender este trabajo aumentando el análisis con un mayor número de registros e incluyendo la determinación del sueño MOR mediante análisis de varianza.

Referencias

- 1.Kobayashi T. et. al.** *Non-linear analysis of sleep EEG* Psychiatry and Clinical Neurosciences 1999;53:159-161
- 2.Palus M.** *Non linear dynamics in the EEG analysis: disappointments and perspectives*, 1998, Academy of Sciences of the Czech Republic, Sep 21.

14.2.2 Evaluación de la somnolencia en pacientes de la Unidad de Radioneurocirugía del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Objetivo

Se realizó un sondeo inicial con la finalidad de determinar si se presenta o no somnolencia en los pacientes que reciben tratamiento con radiación en la Unidad de Radioneurocirugía del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez.

Método:

Para estos fines se empleó la escala de Epworth, previamente validada, que es utilizada para medir somnolencia en los pacientes [1]. Se aplicó la prueba a un total de 93 pacientes que se presentaron en la Unidad de Radioneurocirugía, 61 de ellos eran pacientes de inicio, es decir que aún no recibían su tratamiento con radiación y los 32 restantes fueron pacientes que se presentaron a su cita de seguimiento y que ya habían recibido su tratamiento con radiación.

El cuestionario aplicado en cada caso fue el siguiente:

¿Con que probabilidad le entra sueño o se queda dormido en las siguientes actividades, a diferencia de sentirse solamente cansado? Se hace referencia a su vida habitual en los últimos meses. Incluso en el caso de que Ud., no realice o no haya realizado estas actividades recientemente, intente imaginar cómo le habrían afectado. Use la siguiente escala y elija el número más apropiado para cada situación.

0 = Nunca me adormecería.

2 = Moderada probabilidad de adormecerse.

1 = Ligera probabilidad de adormecerme.

3 = Elevada probabilidad de adormecerme.

Situación	Probabilidad de adormecimiento
Sentado Leyendo	
Viendo la Televisión	
Sentado sin hacer nada en un lugar público (en el teatro, en una reunión, etc.)	
Como pasajero en un coche, en un viaje de más de una hora	
Acostado por la tarde para descansar cuando las circunstancias lo permiten	
Sentado hablando con alguien	
Sentado tranquilamente después de una comida sin alcohol	
En el coche, detenido unos minutos por el tráfico (en un semáforo...)	

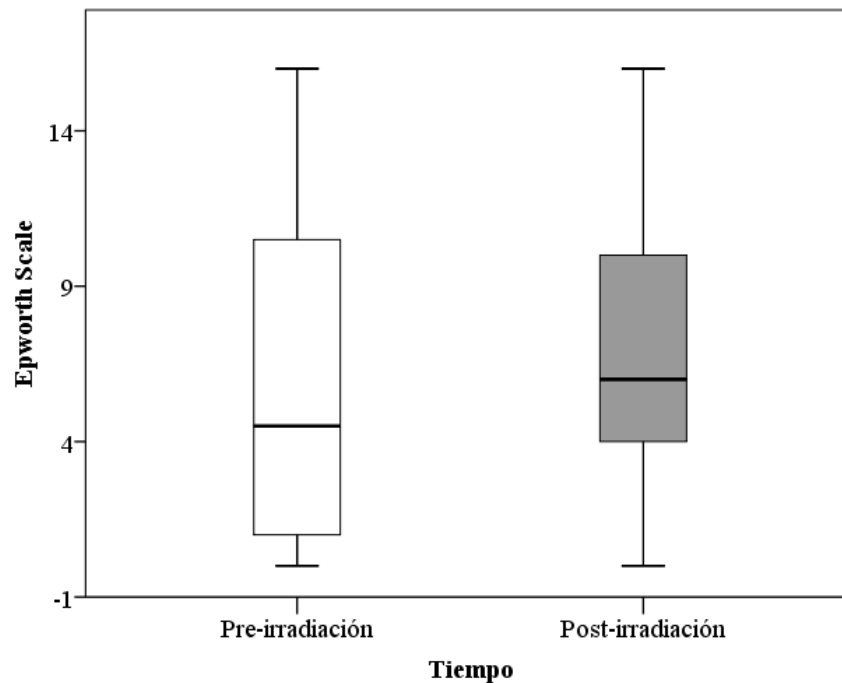
La escala se califica sumando el total de la puntuación y en general se considera

- 0 - 9 – puntuación promedio, población normal
- 10 - 24 – se recomienda consejo de un especialista en sueño

Se evaluaron las diferencias entre ambos grupos de pacientes con la prueba de Mann-Whitney tomando $p > 0.05$.

Resultados Preliminares.

Observando las gráfica podemos mencionar que en este primer sondeo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo la mediana de la puntuación para los pacientes que ya han sido irradiados es ligeramente mayor que los pacientes que aún no son irradiados. También se puede observar que existen síntomas de somnolencia en gran parte ambas poblaciones de pacientes.



Perspectivas

Estos resultados son muy preliminares. La muestra de pacientes es muy heterogénea y los pacientes se presentan con muy diversas patologías cerebrales. En el caso de los pacientes evaluados tras la irradiación también existe gran variabilidad, ya que los volúmenes del cerebro irradiado así como las dosis de radiación aplicadas son muy variables. Cabe mencionar que la muestra de seguimiento es menor a la de pacientes de inicio (n=32 vs. n=61). También el rango de edad de los pacientes es amplio y sería conveniente estratificar el análisis por edades. También falta evaluar la variación de la somnolencia a diferentes tiempos tras la irradiación ya que esta variable no se consideró en este primer sondeo. Se espera ampliar este cuestionario así como las variables a considerar para evaluar mejor la somnolencia de estos pacientes y los factores asociados a la misma.

REFERENCIAS

1. Johns MW (1991). "A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale". *Sleep* 14 (6): 540–5.
2. Hardinge FM, Pitson DJ, Stradling JR (1995). "Use of the Epworth Sleepiness Scale to demonstrate response to treatment with nasal continuous positive airways pressure in patients with obstructive sleep apnoea". *Respir Med* 89 (9): 617–20. PMID 7494915.