



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SEDE SUR
DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**Evaluación de la unión a los receptores de adenosina A1 y A2A en la
corteza cerebral de pacientes con epilepsia del lóbulo frontal y la
influencia de la edad**

Presenta:

Monserrat Fuentes Mejia

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias en
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directora de la tesis

Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta

Ciudad de México.

Agosto de 2021

El presente estudio se realizó en las siguientes instituciones:

- Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Sede Sur. Departamento de Farmacobiología, laboratorio 8
- Centro Médico Nacional Siglo XXI. Hospital de Especialidades. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Luisa L. Rocha Arrieta

Este proyecto fue realizado gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca de maestría número 1009939

Agradecimientos personales

A mi directora **Dra. Rocha**, por su dirección, por su empatía, su ayuda a controlar mis frustraciones, por sus consejos siempre acertados, por su exigencia que incluyeron paciencia, apoyo y comprensión. Además, por las sabias decisiones en pandemia que nos permitieron avanzar y seguir trabajando. Sin duda tanto el aprendizaje profesional y personal formará parte de mi futuro.

A la **Dra. Orozco**, con quién aprendí mucho, me adoptó en *Centro Médico Nacional Siglo XXI*. Por sus enseñanzas, su guía y su ejemplo de trabajo, su apoyo infinito me ayudó a encontrar la solución a todo y siempre me recibía con una sonrisa.

A la **Dra. Lamas** por sus correcciones y sugerencias que mejoraron la versión desde el inicio al presente de la investigación y el escrito.

También agradezco al **Dr. Vadim**, que me apoyó en el aprendizaje con el microscopio y aunque siempre me recomendó tomar descansos, estuvo apoyándome durante los meses que estuve en el *Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada-IMSS, Centro Médico Nacional Siglo XXI*.

A mi tutor del laboratorio 8, **Daniel Fonseca**, quien me soportó, apoyó, regañó y nunca dejó que me tirara al drama, sinceramente no sé qué habría hecho sin ti.

A todos mis compañeros del laboratorio 8, que me han adoptado y apoyado en todos los sentidos, son los mejores **Chris, Ángeles, Christopher, Cindy, Dani Pérez, José Luis, Francia, Alma, y Martín** el encargado de mis achaques de salud.

A la **Dra. Angélica** de Centro Médico, jamás me dejó sola, sus risas y apoyo personal.

AGRADEZCO A MI FAMILIA, a mi papá por inculcarme el amor por las neuronas, a mi mamá por los valores y apoyo incondicional, a mi hermana por siempre bajarme de las nubes y regresarme a seguir volando.

A mi prima **Yayi** por la confianza como una hermana y a mi tía **Mari** por siempre estar presentes.

A mis mejores amigos (**Quique y Gabi**), aunque no pudimos estar todo el tiempo juntos, estuvimos en contacto y apoyándonos en todo momento.

A mis amigos de la maestría (**Itzel, Saúl, Beto, Dani, Sofi**) que sin duda hemos pasado por buenos momentos y mucho estrés a lo largo de todo este proceso y aun así seguimos dando los mejores deseos. Y a **Manu** por su alegría y amistad.

Al **Dr. Vicente Sánchez y Teresita G. López** por ayudarme a creer en mí y en la toma de decisiones.

A mis amigos espeleólogos de la AMUNAM, que me han visto crecer desde antes de iniciar en el Cinvestav, escuchándome y relajándome con esas pláticas interminables, principalmente **Eli, Magali y Demos**.

A **Fabio**, por estar en casi todo el proceso, espero que la vida te lo devuelva.

“To be pragmatically idealistic, one must be persistent and work hard for long periods of time in pursuit of a goal even without guaranteed success”

A. E., Moshin Raza

Índice

I. Índice de figuras	6
II. Índice de tablas	7
III. Abreviaturas	8
IV. Resumen	9
V. Summary	10
1 Introducción	11
1.1 Generalidades de la adenosina	11
1.1.1 Síntesis y Metabolismo	12
1.1.2 Receptores de la adenosina	13
1.1.2.1 Receptores A1 y A2A	14
1.1.2.1.1 Estructuras cerebrales en las que se localizan los receptores A1 y A2A	16
1.1.2.1.2 Efectos de la neurotransmisión mediada por el receptor A1 y A2A	17
1.1.2.1.3 Cambios en la unión a los receptores A1 y A2A en relación con la edad	18
1.1.3 Receptores A1 y A2A, corteza frontal y edad	19
1.1.3.1 Lóbulo frontal	19
1.1.3.2 Lóbulo frontal y edad	22
1.1.3.3 Lóbulo frontal y su relación con los receptores A1 y A2A	22
1.1.4 Los receptores A1 y A2A en patologías neurológicas	23
1.1.5 Epilepsia del lóbulo frontal (ELF)	24
1.1.5.1 Epilepsia y su asociación con los receptores A1 y A2A	25
2 Justificación	26
3 Hipótesis	26
4 Objetivos	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivos específicos	26
5 Metodología General	27
5.1 Obtención y manipulación de tejido cortical	27
5.1.1 Selección de pacientes con ELF	27
5.1.2 Tejido de autopsias	28
5.1.3 Manipulación de tejido	29
5.2 Experimento 1. Evaluación de la densidad neuronal en corteza frontal de pacientes con ELF mediante histología	30
5.2.1 Histología	30
5.2.2 Método de conteo fraccionario	30
5.3 Experimento 2. Evaluación de la unión al receptor A2A y A1 en corteza frontal de pacientes con ELF mediante autorradiografía <i>in vitro</i>	31
5.3.1 Ensayo para evaluar la unión a los receptores A2A y A1	31
5.3.1.1 Ensayo para evaluar la unión total (unión a A1 y A2A)	31
5.3.1.2 Ensayo para evaluar la unión a A2A	31

5.3.1.3	Ensayo para evaluar la unión a A1	31
5.3.2	Ensayo para evaluar la unión inespecífica	32
5.3.3	Análisis de autorradiogramas	32
5.4	Análisis estadístico	32
6	Resultados	33
6.1	Densidad neuronal, unión a A1 y A2A en corteza frontal de autopsias y su correlación con variables clínicas	33
6.1.1	Conclusiones de la evaluación del tejido de autopsias:	38
6.2	Densidad neuronal, unión a A1 y A2A en corteza frontal de pacientes con ELF y su correlación con variables clínicas	38
6.2.1	Densidad neuronal en corteza frontal de pacientes con ELF y su correlación con variables clínicas	38
6.2.2	Unión al receptor A2A en corteza frontal de pacientes con ELF y su correlación con variables clínicas	41
6.2.3	Unión al receptor A1 en corteza frontal de pacientes con ELF y su correlación con variables clínicas	43
6.2.3.1	Conclusiones de la evaluación de la densidad neuronal en corteza frontal de pacientes con ELF y su correlación con variables clínicas.....	47
6.2.3.2	Conclusiones de la evaluación de la unión al receptor A2A en corteza frontal de pacientes con ELF y su correlación con variables clínicas	47
6.2.3.3	Conclusiones de la evaluación de la unión al receptor A1 en corteza frontal de pacientes con ELF y su correlación con variables clínicas	48
6.3	Discusión general	48
6.4	Perspectivas	53
VI.	Referencias.....	54

I. Índice de figuras

Figura 1.	Estructura Adenosina (Wilson, 2009).....	11
Figura 2.	Síntesis y metabolismo extracelular de la adenosina. Modificado de (Cunha 2016; Ribeiro, Sebastião, and De Mendonça 2002; Schulte and Fredholm 2003)	12
Figura 3.	Vía de señalización de los receptores A1. La activación del receptor disminuye la actividad de adenilato ciclasa (AC) y la producción de AMPc mediante la por la subunidad α , inhibiendo la proteína quinasa A (PKA) por las subunidades β - γ , se puede activar la fosfolipasa C- β (PLC). Los canales K ⁺ se abren y los de Ca ²⁺ se cierran por acción de las subunidades β - γ . La fosforilación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) como p38, ERK1/2 y JNK1/2 son inducidas por la activación del receptor A1. Modificado de (Borea <i>et al.</i> , . 2018; Romagnoli <i>et al.</i> , . 2015)	15
Figura 4.	Vía de señalización de los receptores A2A. La activación del receptor promueve la actividad de adenilato ciclasa (AC) y la producción de AMPc mediante la por la subunidad α , promoviendo la proteína quinasa A (PKA). Modificado de (Borea <i>et al.</i> , . 2018; Romagnoli <i>et al.</i> , . 2015).....	15
Figura 5.	Cambios en la unión a receptores A1 en relación con la edad en roedores. Estudios realizados por autorradiografía in vitro, en ratas. En eje de las abscisas se describe la edad de ratas (E18-E20 días en etapa embrionarios, P0-P30 días de etapa infantil), mientras que el eje de las ordenadas representa la unión a receptores A1 (fmol/mg de proteína). Modificado de (Marangos <i>et al.</i> , . 1982; Meerlo <i>et al.</i> , . 2004; Rivkees 1995).....	18
Figura 6.	Vista lateral del hemisferio cerebral izquierdo. Modificado de (Waxman, 2011)	20
Figura 7.	Organización en capas de tejido cortical en tinción de Nissl. (Nieuwenhuys, 2008)	21

Figura 8. A) Microfotografía representativa de una sección cortical de una autopsia teñida con la tinción de Nissl. B) Representación de la densidad neuronal en las diferentes capas de la corteza frontal de autopsias. Los valores se representan como la media + error estándar.	34
Figura 9. Representación de la correlación entre la edad y el conteo neuronal en las capas I-II (A) y III-IV (B) de tejido cortical de autopsias.	35
Figura 10. A) Autorradiograma representativo de tejido cortical obtenido de autopsia. La unión total corresponde a la unión del agonista [3H]CGS21680, mientras que la unión de A2A corresponde al agonista [3H]CGS21680 ante la presencia de un antagonista de A1. Nótese la menor densidad óptica en este último. En la parte inferior se muestra la imagen del estándar utilizado en el ensayo. B) Representación de la unión al receptor A2A en la corteza frontal de autopsias. Los valores representan la media + error estándar.	35
Figura 11. Representación de la correlación entre la unión al receptor A1 y la edad en la capa III-IV de tejido cortical de autopsias.	37
Figura 12. Microfotografía representativa de la tinción de Nissl de tejido cortical de pacientes con ELF.	39
Figura 13. Representación de la densidad neuronal en las capas superficiales (I-II), intermedias (III-IV) y profundas (V-VI) en tejido cortical de autopsias y pacientes con ELF. Los valores representan la media + error estándar. U-Mann Whitney. ****p<0.0001 con respecto a los valores obtenidos en el tejido cortical de autopsia.	39
Figura 14. Representación de la densidad neuronal en las capas superficiales (I-II), intermedias (III-IV) y profundas (V-VI) en tejido cortical de autopsias y pacientes con ELF con diferentes etiologías. EPT: Epilepsia postraumática, DFC: Displasia focal cortical. Los valores representan la media + error estándar de la media. Anova-1 vía. **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 con respecto a los valores obtenidos en el tejido cortical de autopsia.	40
Figura 15. Autorradiograma representativo de la unión al receptor A2A de tejido cortical obtenido de autopsia y paciente con ELF.....	41
Figura 16. Representación de la unión al receptor A2A en las capas superficiales (I-II), intermedias (III-IV) y profundas (V-VI) en tejido cortical de autopsias y pacientes con ELF. U-Mann Whitney. Los valores representan la media + error estándar.	41
Figura 17. Representación de la unión al receptor A2A en las capas superficiales (I-II), intermedias (III-IV) y profundas (V-VI) en tejido cortical de autopsias y pacientes con ELF con diferentes etiologías. DFC: Displasia focal cortical, EPT: epilepsia postraumática. U-Mann Whitney. Los valores representan la media + error estándar de la media.....	42
Figura 18. Representación de la correlación entre la unión al receptor A2A y la densidad neuronal en la capa I-II de tejido cortical de pacientes con ELF que presentan DFC.	43
Figura 19. Representación de la unión al receptor A1 en las capas superficiales (I-II), intermedias (III-IV) y profundas (V-VI) en tejido cortical de autopsias y pacientes con ELF. Los valores representan la media + error estándar de la media. U-Mann Whitney. ****p<0.0001 con respecto a los valores obtenidos en el tejido cortical de autopsia.	44
Figura 20. Representación de la unión al receptor A1 en las capas superficiales (I-II), intermedias (III-IV) y profundas (V-VI) en tejido cortical de autopsias y pacientes con ELF con diferentes etiologías. U-Mann Whitney. Los valores representan la media + error estándar de la media.	45
Figura 21. Representación de las correlaciones significativas entre la unión al receptor A1 y la edad en las capas I-II y III-IV (lado izquierdo). Correlación significativa entre la unión al receptor A1 y edad de inicio, así como tiempo de evolución de la patología (años) en capas profundas V-VI (lado derecho) de tejido cortical de pacientes con ELF.	46
Figura 22. Representación de la correlación significativa entre la unión al receptor A1 y la densidad neuronal en las capas I-II de pacientes con ELF.....	47

II. Índice de tablas

Tabla 1. Receptores purinérgicos P1 de adenosina	13
Tabla 2. Cambios en la unión a receptores A1 en relación con la edad en humanos.....	19
Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión para la selección de pacientes con ELF	27
Tabla 4. Variables clínicas de pacientes con ELF.....	28
Tabla 5. Variables clínicas de autopsias	29
Tabla 6. Características clínicas del tejido utilizado	33

Tabla 7. Correlación entre las variables clínicas y la densidad neuronal del tejido de autopsia	34
Tabla 8. Correlación entre las variables clínicas y la unión al receptor A2A del tejido de autopsia	36
Tabla 9. Correlación entre el conteo neuronal y la unión al receptor A2A del tejido de autopsia	36
Tabla 10. Correlación entre las variables clínicas y la unión al receptor A1 del tejido de autopsia	37
Tabla 11. Correlación entre el conteo neuronal y la unión al receptor A1 del tejido de autopsia	37
Tabla 12. Correlación entre las variables clínicas y la densidad neuronal del tejido cortical de pacientes con ELF	40
Tabla 13. Correlación entre las variables clínicas y la unión al receptor A2A del tejido cortical de pacientes con ELF	42
Tabla 14. Correlaciones entre conteo neuronal y la unión al receptor A2A del tejido cortical de pacientes con ELF...	43
Tabla 15. Correlación entre las variables clínicas y la unión al receptor A1 del tejido cortical de pacientes con ELF ...	45
Tabla 16. Correlaciones entre conteo neuronal y la unión al receptor A1 del tejido cortical de pacientes con ELF	46

III. Abreviaturas

AC	Adenilato ciclasa
ADP	Adenosín difosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMP	Adenosín monofosfato
ATP	Adenosín trifosfato
asf	Fracción de área de muestreo
ATP	Adenosín trifosfato
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CD73	Ecto-5'-nucleotidasa
CHO	Células de ovario de hámster chino
DAG	Diacilglicerol
ELF	Epilepsia del lóbulo frontal
ELT	Epilepsia del lóbulo temporal
FAE	Fármacos antiepilépticos
IPM	Intervalo post-mortem
IP3	Inositol Trifosfato
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
PBS	Amortiguador de fosfatos
PKA	Proteína quinasa A
PLC	Fosfolipasa C
Q-	Número de células en fracción de muestreo
ssf	Fracción de muestreo
SUDEP	Muerte súbita en epilepsia (<i>Sudden unexpected death in epilepsy</i>)
t/h	Fracción de espesor de muestreo

IV. Resumen

Los receptores de adenosina A1 y A2A inducen efectos inhibidores y excitadores, respectivamente. Estos efectos se modifican con la edad. Se han reportado cambios en los receptores A1 y A2A en tejido cerebral obtenido de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, el tipo más común de epilepsia. Por otro lado, la epilepsia del lóbulo frontal representa el tipo de epilepsia extratemporal más frecuente. Sin embargo, falta la caracterización de la unión de los receptores A1 y A2A en la epilepsia del lóbulo frontal. El objetivo del presente estudio fue caracterizar la unión de los receptores A1 y A2A en tejido quirúrgico de pacientes con epilepsia del lóbulo frontal y su correlación con la edad y factores clínicos.

Se diseñaron experimentos para determinar la unión de los receptores A1 y A2A en muestras de neocorteza obtenidas de pacientes tratados quirúrgicamente por epilepsia del lóbulo frontal (ELF, n = 21) Seis pacientes presentaban crisis asociadas a lesión tumoral, tres por epilepsia postraumática y doce por displasia cortical focal. Se llevaron a cabo experimentos de autorradiografía *in vitro* usando secciones paralelas de neocortex expuestas a diferentes condiciones experimentales: a) unión total: [³H] CGS 21680 5 nM (30 Ci / mmol, agonista de los receptores A1 y A2A); b) Unión al receptor A2A: [³H] CGS 21680 5 nM más DPCPX 100 nM (antagonista de los receptores A1); c) unión no específica: 5 nM [³H] CGS 21680 más 100 nM de DPCPX más 100 nM de SCH 58261 (antagonista de A2A). La unión al receptor A1 se estimó con la diferencia entre la unión total y la unión al receptor A2A. La población celular se evaluó en secciones paralelas procesadas con tinción Nissl y estereología imparcial. Los resultados obtenidos de pacientes con FLE se compararon con los encontrados en experimentos realizados en tejido cortical obtenido mediante autopsia (n = 19). Adicionalmente se realizaron correlaciones entre los datos obtenidos y variables clínicas (edad de los sujetos, edad de inicio de la enfermedad, duración de la misma y frecuencia de las crisis).

A diferencia del grupo de autopsia, la neocorteza de los pacientes con ELF demostró un menor recuento de neuronas en las diferentes capas corticales (capas I-II, 40.5%, p <0.0001, capas III-IV, 36.7%, p <0.0001; capas V- VI, 33.2%, p <0.0001). Los pacientes con ELF mostraron valores de unión al receptor A2A similares a los obtenidos en el grupo de autopsia en los tres pares de capas corticales. La falta de diferencia en la unión a receptores A2A, a pesar de la disminución en el conteo neuronal, sugiere un aumento en la unión a dicho receptor. En cuanto a los receptores A1, el análisis reveló una unión reducida en la neocorteza de pacientes con FLE (capas I-II, 49.6%, p <0.001 capas III-IV, 55%, p <0.0001, capas V-VI, 60.9%, p < 0.0001). El análisis de los datos por etiología en los pacientes con ELF no modificó estos resultados. Adicionalmente, en el grupo de autopsia se encontró una correlación negativa entre la edad y el recuento de células, así como con la unión de A1. Esta correlación no fue evidente en los pacientes con ELF. Un resultado interesante fue que los pacientes con una mayor duración de la epilepsia mostraron más unión de A1 en las capas V-VI.

El presente estudio demuestra que existe una disminución en la unión al receptor A1 e incremento en la unión al receptor A2A en la neocorteza de pacientes con ELF. La edad de los pacientes con ELF no influyo en los resultados obtenidos. Estos cambios pueden estar implicados en la fisiopatología del FLE.

V. Summary

A1 and A2A adenosine receptors induce inhibitory and excitatory effects. These effects are modified through the age. Changes in A1 and A2A receptors have been found in brain tissue obtained from patients with temporal lobe epilepsy, the most common type of epilepsy. Although, frontal lobe epilepsy (FLE) represents the most important extratemporal type epilepsy, characterization of A1 and A2A receptor binding is lacking. The aim of the present study was to characterize the A1 and A2A receptor binding in surgical tissue from patients with frontal lobe epilepsy. The values obtained were correlated with age and clinical factors.

Experiments were designed to determine A1 and A2A receptor binding in neocortex of surgically treated frontal lobe epilepsy patients (FLE, n=21) Six patients had brain tumor-related epilepsy, three had posttraumatic epilepsy and twelve had focal cortical dysplasia. *In vitro* autoradiography experiments were carried out using parallel brain section exposed to different experimental conditions: a) total binding: 5 nM [³H] CGS 21680 (30 Ci/mmol, A1 and A2A receptors agonist); b) A2A receptor binding: 5 nM [³H] CGS 21680 plus 100 nM of DPCPX (A1 receptor antagonist); c) non-specific binding: 5 nM [³H] CGS 21680 plus 100 nM of DPCPX plus 100 nM of SCH 58261 (A2A antagonist). A1 receptor binding was estimated with the difference between total binding and A2A receptor binding. Cell count was evaluated in parallel sections processed with Nissl staining and unbiased stereology. Results obtained from patients with FLE were compared with those obtained from frontal cortex of nineteen subjects who died of different causes and had no history of neurologic disease. In addition, the results obtained were correlated with clinical factors (age, age of first seizure, illness duration and frequency of seizures).

In contrast to the autopsy group, the neocortex of patients with FLE demonstrated lower cell count in the different cortical layers (layers I-II, 40.5%, $p < 0.0001$, layers III-IV, 36.7%, $p < 0.0001$; layers V-VI, 33.2%, $p < 0.0001$). Patients with FLE showed A2A binding values like those obtained from the autopsy group. This result was despite the cell loss found in all neocortical layers, suggesting an increased A2A receptor binding. Concerning A1 receptors, the analysis revealed a decreased binding in the neocortex of patients with FLE (layers I-II, 49.6%, $p < 0.001$ layers III-IV, 55 %, $p < 0.0001$, layers V-VI, 60.9%, $p < 0.0001$) compared to those obtained from autopsies. Similar results were obtained when FLE patients were compared by etiology of the disease. In addition, autopsy group showed a negative correlation between the age and cell count and A1 binding. This correlation was not detected in Patients with FLE. An interesting result was that patients with a longer illness duration showed more A1 binding in the layers V-VI.

The results obtained from the present study revealed low A1 receptor binding and high A2A receptor binding in the neocortex of patients with FLE. The age of the subjects did not influence these changes. These alterations can be involved in the pathophysiology of FLE.

1 Introducción

1.1 Generalidades de la adenosina

La adenosina es un nucleósido de purina endógeno, formado por una adenina unida por un enlace β -N glucosídico a una ribosa (**Figura 1**). Es importante en el metabolismo energético de todas las células y su formación está estrechamente relacionada con el consumo de energía de la célula. La adenosina forma parte de las vías metabólicas asociadas al ATP y AMPc (Fox y Kelley, 1978).

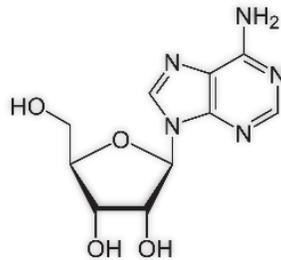


Figura 1. Estructura Adenosina (Wilson, 2009)

La adenosina participa en la regulación de diversas funciones fisiológicas como el ritmo cardíaco, el flujo coronario, la contractilidad cardíaca, cardioprotección (Deussen *et al.*, 2006; Duncker *et al.*, 1995; Zhang, Hein, y Kuo, 2000), la inmunidad adaptativa (Zarek *et al.*, 2008), la inhibición de la lipólisis (Zannikos, Rohatagi, y Jensen, 2001), angiogénesis (Feoktistov *et al.*, 2004), los productos finales de reacciones de transmetilación (Kutzbach y Stokstad, 1967) y la filtración tubuloglomerular (Vallon *et al.*, 2004). La adenosina extracelular contribuye en la protección celular en condiciones fisiológicas y patológicas (Fredholm *et al.*, 2005; Haskó *et al.*, 2008). Asimismo, está involucrada en los cambios inducidos como consecuencia de isquemia miocárdica ya que promueve la vasodilatación, la integridad vascular y contrarresta los efectos letales en los miocitos cardíacos (Ryzhov *et al.*, 2008; Wilson, 2009).

En el sistema nervioso central se ha considerado a la adenosina como neuromodulador y neuroprotector. Las funciones de las células neuronales y gliales están reguladas por la adenosina (Fredholm *et al.*, 2005; Nabbi-Schroeter *et al.*, 2018). La adenosina actúa como un modulador local de la acción de varios neurotransmisores, incluidas las aminas biogénicas y los aminoácidos excitadores. Además, atenúa la liberación de muchos

neurotransmisores y puede contrarrestar la excitotoxicidad asociada con la liberación excesiva de glutamato en el cerebro (Dunwiddie y Fredholm, 1989). También, puede bloquear la interacción de neurotransmisores, como la dopamina, con sus propios receptores (Fredholm *et al.*, 2005; Schulte y Fredholm, 2003; Wilson, 2009). En modelos de isquemia cerebral, la adenosina suprime el desarrollo de procesos inflamatorios como la activación e infiltración de células inflamatorias y, la producción de citocinas proinflamatorias y de radicales libres (Chen *et al.*, 2006; Haskó *et al.*, 2008). Además, está involucrada en patologías neurológicas como esquizofrenia (O'Donovan *et al.*, 2018a; Ross y Venton, 2015), adicciones (Ferré y O'Brien, 2011) y epilepsia (Rebola *et al.*, 2003; Weltha, Reemmer, y Boison, 2019).

1.1.1 Síntesis y Metabolismo

La síntesis de la adenosina puede ocurrir en el medio extracelular o intracelular. De manera extracelular se sintetiza a partir de los nucleótidos de adenina (ATP, ADP o AMP) por la familia de enzimas ecto-ATP/ADPasas que incluyen CD39 (como NTPDasa 1) y ecto-5'nucleotidasas que incluyen CD73 (**Figura 2**) (Schulte y Fredholm, 2003).

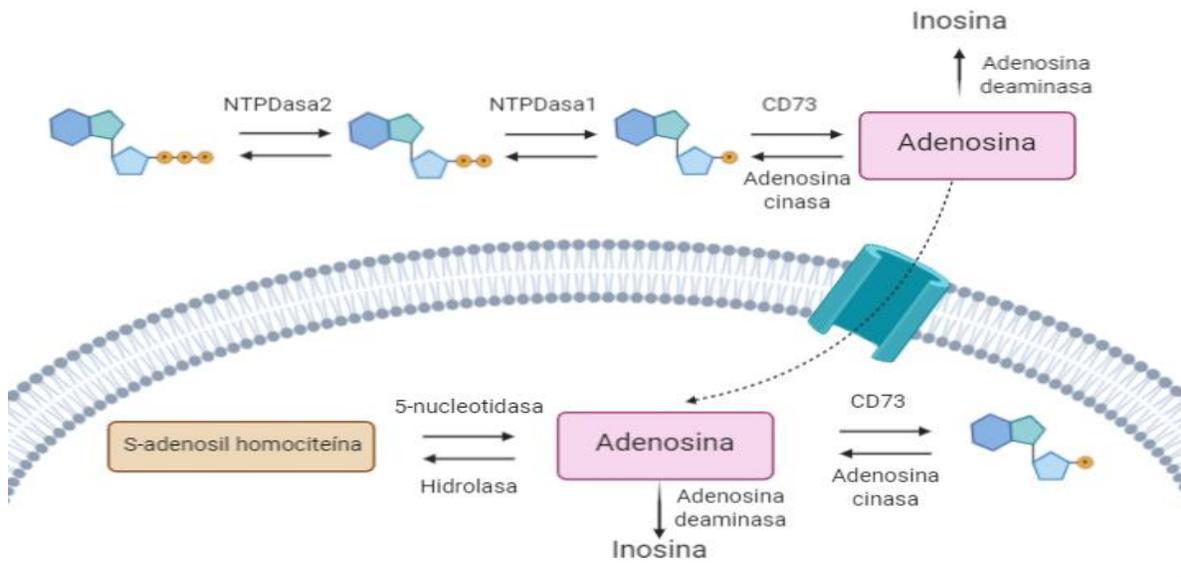


Figura 2. Síntesis y metabolismo extracelular de la adenosina. Modificado de (Cunha, 2016; Ribeiro, Sebastião y De Mendonça, 2002; Schulte y Fredholm, 2003)

En el medio intracelular se sintetiza a partir de S-adenosil homocisteína por la enzima 5-nucleotidasa, o a partir de AMP por la enzima CD73. La adenosina se metaboliza por la enzima S-adenosil homocisteína hidrolasa al aminoácido S-adenosil homocisteína, y a su vez esta es degradada a inosina por la enzima adenosina cinasa o a AMP por la enzima adenosina cinasa (Fredholm *et al.*, 2005). Los niveles de adenosina están regulados por las enzimas: adenosina quinasa (fosforila la adenosina formando el AMP) y la adenosina deaminasa (convierte la adenosina en inosina). Además, se libera del citoplasma al espacio extracelular a través de un transportador de nucleósidos bidireccional, cuya dirección depende del gradiente de concentración que exista en ambos lados de la membrana. (Fredholm *et al.*, 2005; Linden, 2001; Ribeiro, Sebastião, y De Mendonça, 2002).

1.1.2 Receptores de la adenosina

La adenosina es ligando de la familia de receptores purinérgicos tipo 1 (P1). Dentro de esta familia se han descrito 4 subtipos de receptores, los receptores A1 y A3 se encuentran acoplados a proteínas Gi, mientras que, los receptores A2A y A2B, se encuentran acoplados a proteínas Gs (**Tabla 1**) (Schulte y Fredholm, 2003).

Tabla 1. Receptores purinérgicos P1 de adenosina

Receptor	Proteína G	Efecto en vías de señalización	Tipo celular	Referencia
A1	Gi1/2/3	↓ AMPc ↓ Canales de Ca ²⁺ tipo Q, P, N ↑ IP ₃ /DGA (PLC); por subunidad βγ	Neuronas	(Freissmuth, Selzer, y Schutz 1991; Jockers <i>et al.</i> , 1994)
	Go	↑ Canales de K ⁺	Células CHO Neuronas y células atriales	(Dolphin, Forda y Scott, 1872; Mogul, Adams y Fox 1993) (Freund, Ungerer y Lohse, 1994) (Belardinelli y Isenberg, 1983; Trussell y Jackson, 1985)
A2A	Gs	↑ AMPc	Células CHO	(Olah, 1997)
	Golf		Neuronas	

			(Kull, Svenningsson, y Fredholm, 2000)
A2B	G _s	↑ AMPc	Neuronal (Linden <i>et al.</i> , 1999; Pierce <i>et al.</i> , 1992)
	G _{q/11}	↑ IP ₃ /DAG(PLC)	Ovocitos de <i>Xenopus</i> (Yakel <i>et al.</i> , 1993)
A3	G _{q/11}	↑ IP ₃ /DAG (PLC); por subunidad βγ	Células CHO (Palmer, Gettys, y Stiles, 1995)
	G _{i1/2/3/o}	↓ AMPc	(Belardinelli y Isenberg, 1983; Dolphin <i>et al.</i> , 1872; Englert, Qwitterer y Klotz, 2002; Freund <i>et al.</i> , 1994; Mogul <i>et al.</i> , 1993; Olah, 1997; Pierce <i>et al.</i> , 1992; Trussell y Jackson, 1985)
		↑ IP ₃ /DAG (PLC); por subunidad βγ	Neuronas
		↑ Canales de K ⁺ -ATP	Neuronas Cardiacas (Tracey <i>et al.</i> , 1998)
	↑ Canales de Cl ⁻	Epiteliales (Carré <i>et al.</i> , 2000)	

AMPc: adenosín monofosfato cíclico, ATP: adenosín trifosfato, DAG: diacilglicerol, IP₃: inositol trifosfato, PLC: fosfolipasa C

1.1.2.1 Receptores A1 y A2A

El receptor A1 es una glicoproteína de 35–36-kDa. Está formado por 7 hélices α transmembranales conectadas por tres bucles extracelulares y tres intracelulares (**Figura 3**). El receptor se encuentra acoplado a una proteína G_{i/o} que, al ser activado, disminuye la síntesis de AMPc. Este receptor también se puede encontrar formando homodímeros y hetero-oligómeros con receptores como A2A, purinérgicos tipo P2Y1 y P2Y2, adrenérgicos β1 y β2, mGlu_{1α} y D1 de dopamina D1-like (Kashfi *et al.*, ., 2017; Latek, 2015).

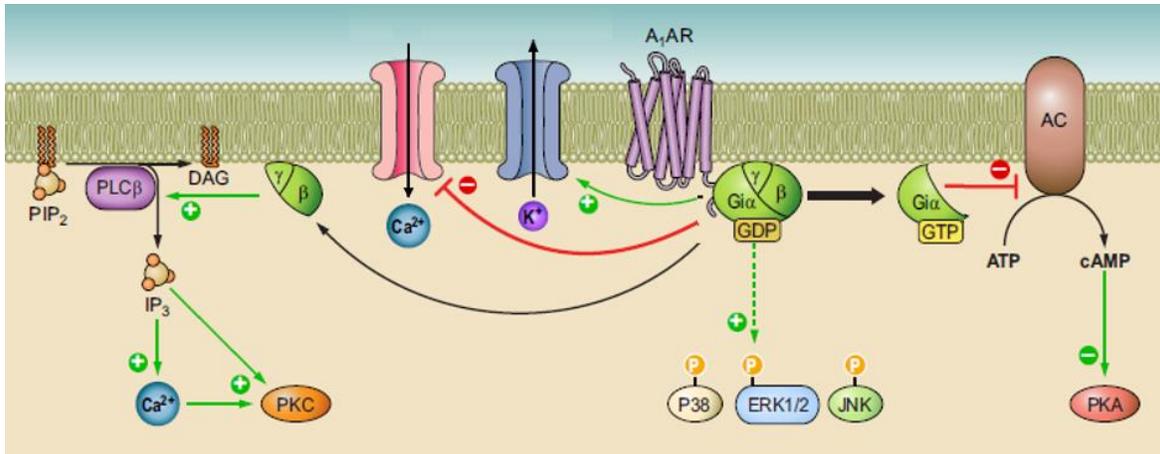


Figura 3. Vía de señalización de los receptores A1. La activación del receptor disminuye la actividad de adenilato ciclasa (AC) y la producción de AMPc mediante la por la subunidad α , inhibiendo la proteína quinasa A (PKA) por las subunidades β - γ , se puede activar la fosfolipasa C- β (PLC). Los canales K^+ se abren y los de Ca^{2+} se cierran por acción de las subunidades β - γ . La fosforilación de proteínas quinastas activadas por mitógenos (MAPK) como p38, ERK1/2 y JNK1/2 son inducidas por la activación del receptor A1. Modificado de (Borea et al., 2018; Romagnoli et al., 2015)

Por otro lado, el receptor A2A es una glicoproteína de 35–36-kDa. El receptor se encuentra acoplado a una proteína G_s , en neuronas específicamente al tipo G_{olf} , que también está relacionada con adenilato ciclasa (**Figura 4**). La activación del receptor promueve la vía de señalización de AC, dependiente de AMPc, activa PKA y numerosas proteínas como: receptores, fosfodiesterasas, proteína de unión a elementos que responde a AMPc (CREB), fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc (DARPP-32) (Borea et al., 2016; Kull et al., 2000; Preti et al., 2015).

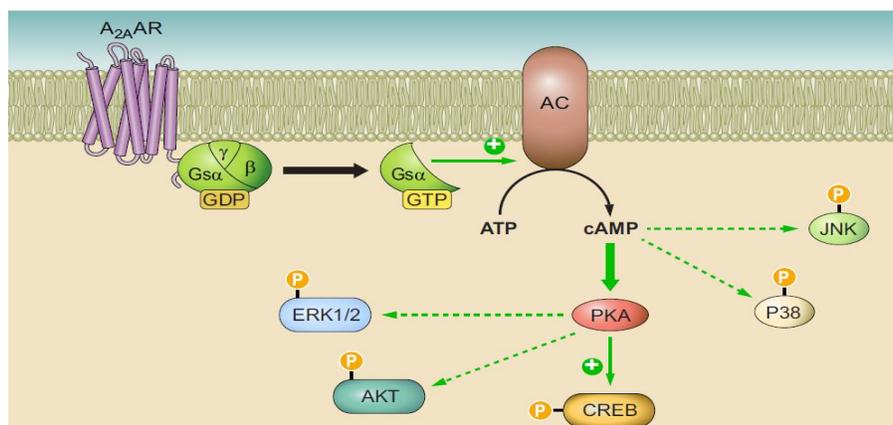


Figura 4. Vía de señalización de los receptores A2A. La activación del receptor promueve la actividad de adenilato ciclasa (AC) y la producción de AMPc mediante la por la subunidad α , promoviendo la proteína quinasa A (PKA). Modificado de (Borea et al., 2018; Romagnoli et al., 2015)

La activación del receptor A1 inhibe la transmisión sináptica ya que reduce la liberación presináptica de neurotransmisores (como glutamato, GABA, serotonina, histamina o dopamina) y reduce la excitabilidad neuronal postsináptica (Chen, Stockwell, y Cayabyab, 2016). Se ha visto que la activación del receptor A1 disminuye la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC) e incrementa la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno p38, la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) (Chen *et al.*, 2014) y las proteínas fosfatasa PP1, PP2A, PP2B (Stockwell *et al.*, 2016). Además, a nivel pre- y postsináptico, promueve la apertura de canales K⁺ (Heurteaux *et al.*, 1995) y cierre de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje por acción del dímero formado por las subunidades β-γ de la proteína G, disminuyendo la excitabilidad neuronal (Rebola *et al.*, 2003). También se ha demostrado que la activación del receptor A1 induce la internalización de receptores como AMPA que contienen la subunidad GluA1 y GluA2 (Chen *et al.*, 2014; Stockwell *et al.*, 2016; Stockwell, Jakova y Cayabyab, 2017).

Por el contrario, la activación del receptor A2A posee efectos excitadores, facilitando la liberación de glutamato y potenciando los efectos del receptor NMDA. En los heterómeros presinápticos A2A/A1A, A2A regula la inhibición de la neurotransmisión de glutamato inducida por el receptor A1, incrementando los niveles de glutamato cortico-estriatales (Krügel 2016). Además, los receptores A2A inhiben el transportador de captación de glutamato (GLT₁) y estimulan la liberación de glutamato en los astrocitos (Yamada, Kobayashi y Kanda, 2014). Los receptores A2A, promueven el daño celular en neuronas y glía, son importantes en la patogenia de enfermedades neuropsiquiátricas como el trastorno depresivo mayor, esquizofrenia y epilepsia (Cunha, 2016; Krügel, 2016; Yamada, Kobayashi y Kanda, 2014).

1.1.2.1.1 Estructuras cerebrales en las que se localizan los receptores A1 y A2A

La distribución del receptor A1 ha sido ampliamente estudiada en cerebro con el uso de radioligandos. En roedores se ha encontrado este receptor en alta densidad en hipocampo (estrato radiante de CA1, *subiculum*), núcleo geniculado lateral, núcleo medio-dorsal y anteromedial del tálamo y en la capa molecular de la corteza cerebelosa (Fredholm y Lindström, 1999). En humanos se ha caracterizado la ubicación de éste receptor en alta densidad en corteza (frontal, temporal, parietal, visual primaria, occipital), núcleo caudado

y putamen, hipocampo (CA1), amígdala cerebral y tálamo, en densidad intermedia en la corteza cingulada, insular, núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio, hipocampo (CA3), giro dentado, y en densidad baja en corteza entorrinal, globo pálido, núcleo basal, hipotálamo, mesencéfalo, puente troncoencefálico, cerebelo y médula espinal (Fastbom *et al.*, 1987; Svenningsson *et al.*, 1997).

Los receptores A2A se encuentran localizados en sistema nervioso central en alta densidad principalmente en núcleo caudado-putamen (estriado), tubérculo olfatorio descrito por estudios *in vivo* (tomografía por emisión de positrones-PET) y ensayos de unión *in vitro* (Latini *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2020). Mientras que en baja densidad se han descrito a estos receptores en corteza (lóbulo frontal, temporal, parietal), hipocampo, amígdala y cerebelo por ensayos de unión *in vitro* (Hettinger *et al.*, 2001; Jarvis y Williams, 1989).

1.1.2.1.2 Efectos de la neurotransmisión mediada por el receptor A1 y A2A

Se ha demostrado, en modelos murinos de daño neuronal, que la activación de los receptores A1 ejerce un efecto neuroprotector (Von Lubitz *et al.*, 1999). El mecanismo mediante el cual se produce dicha neuroprotección no se conoce con certeza, sin embargo, es probable que disminuya la liberación de neurotransmisores como glutamato, acetilcolina y dopamina (Cunha, 2005; Dunwiddie y Fredholm, 1989). Asimismo, se piensa que la reducción del flujo de calcio, posiblemente secundario a la modulación de las conductancias de potasio (incluyendo los canales de potasio sensibles al ATP en neuronas) sea otro mecanismo que explique el efecto neuroprotector inducido por el receptor A1 (Ambrósio *et al.*, 1997). Por el contrario, los efectos mediados por la activación de los receptores A2A implican la liberación de glutamato (Ciruela *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2005), la inflamación y apoyan el papel en la generación de daño neuronal en modelos de isquemia cerebral (Gomes *et al.*, 2011). Los receptores A2A también están presentes en células no neuronales, como las células endoteliales y gliales (Coney y Marshall, 1998), que permiten un control de la vasodilatación y las respuestas gliales e inflamatorias al daño (Ngai *et al.*, 2001).

1.1.2.1.3 Cambios en la unión a los receptores A1 y A2A en relación con la edad

En sistema nervioso central se han asociado numerosos cambios neuronales tanto morfológicos como bioquímicos y funcionales en relación a la edad (Seidler *et al.*, 2010). En el caso de los receptores A1 se han realizado ensayos de unión (Meerlo *et al.*, 2004) y de autorradiografía *in vitro* en tejido cerebral de rata (Marangos, Patel y Stivers, 1982). Estos estudios han demostrado que la unión a receptores A1 en edades tempranas es mayor que en la etapa adulta (**Figura 5**) (Marangos *et al.*, 1982; Rivkees, 1995). Una situación similar también se ha descrito para los receptores colinérgicos, muscarínicos (Coyle y Yamamura, 1976), sistema dopaminérgico (Pardo *et al.*, 1977), opiáceos (Coyle y Pert, 1976), y GABA (Coyle y Yamamura, 1976). De igual manera, ensayos de unión *in vitro*, en corteza, hipocampo y núcleo estriado de rata, han demostrado que los receptores A2A disminuyen conforme aumenta la edad (Cunha *et al.*, 1995)

En humanos sanos, estudios de tomografía por emisión de positrones, indican una correlación negativa entre la unión a receptores A1 y la edad (Meyer *et al.*, 2007; Mishina *et al.*, 2012, 2017). Por otra parte, estudios de autorradiografía *in vitro* realizados en tejido cerebral obtenido mediante autopsia, han demostrado una disminución del potencial de unión para el receptor A1 que se correlaciona con la edad (**Tabla 2**) (Fastbom *et al.*, 1987). En relación al receptor A2A, se sabe que a mayor edad su expresión aumentada, en hipocampo de rata (Temido-Ferreira *et al.*, 2020). Sin embargo, al presente no existen estudios que correlacionen su unión con la edad de los sujetos.

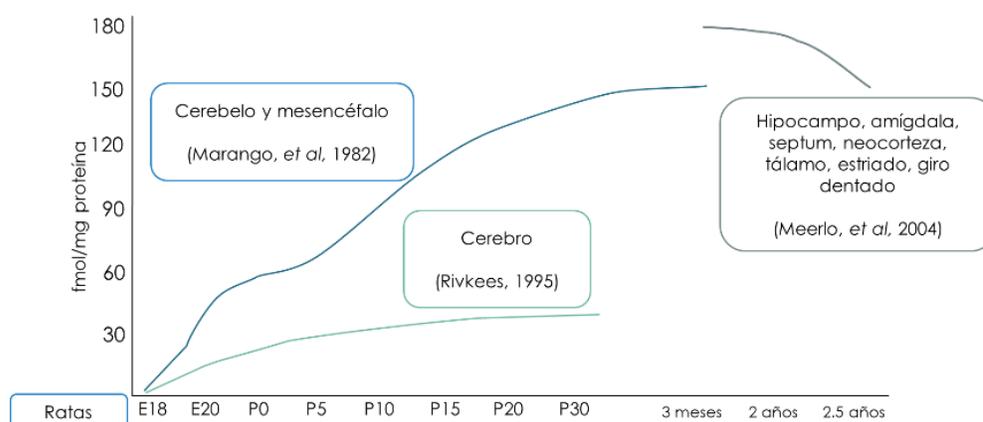


Figura 5. Cambios en la unión a receptores A1 en relación con la edad en roedores. Estudios realizados por autorradiografía *in vitro*, en ratas. En eje de las abscisas se describe la edad de ratas (E18-E20 días en etapa embrionaria, P0-P30 días de etapa infantil), mientras que el eje de las ordenadas representa la unión a receptores A1 (fmol/mg de proteína). Modificado de (Marangos *et al.*, 1982; Meerlo *et al.*, 2004; Rivkees, 1995)

Tabla 2. Cambios en la unión a receptores A1 en relación con la edad en humanos

	Edad (años)	Metodología	Área	Relación con edad	Referencia
A1	71.6±12.3 (48-92)	Autorradiografía <i>in vitro</i>	Putamen	Correlación negativa**	(Fastbom <i>et al.</i> , 1987)
	49.5±15.6 (21.9–73.5)	PET	Estriado, lóbulo mesiotemporal y corteza frontal	Correlación negativa	(Meyer <i>et al.</i> , 2007)
	22±1.7 (20-25) 65.4±7.6 (51-77)	PET	Caudado-putamen, Corteza, tálamo, estriado	Decremento significativo	(Mishina <i>et al.</i> , 2012, 2017)
A2A	20-40 y 60-75	Inmunohistoquímica	Hipocampo	Incremento significativo	(Temido-Ferreira <i>et al.</i> , 2020)

** Tendencia a correlación negativa pero no significativa. PET: tomografía por emisión de positrones

Los cambios fisiológicos asociados a la edad se relacionan con los déficits de funciones cognitivas (Calso, Besnard, y Allain, 2019; Harada, Natelson Love, y Triebel, 2013), del estado de ánimo (Calso *et al.*, 2019; Zanto y Gazzaley, 2019) y motoras (Von Lubitz *et al.*, 1999). Los cambios en los receptores A1 y A2A, podrían estar relacionados con cambios en las funciones cerebrales.

1.1.3 Receptores A1 y A2A, corteza frontal y edad

1.1.3.1 Lóbulo frontal

El lóbulo frontal es una estructura de tejido cortical que se extiende desde el polo frontal hasta la cisura de Rolando y la cisura de Silvio (**Figura 6**). Este incluye la corteza motora primaria, la corteza premotora, el área de Broca y la corteza prefrontal. El área motora primaria está ubicada en el giro prefrontal, contiene neuronas piramidales de gran tamaño (células de Betz) y neuronas pequeñas, cuyos axones descienden como conexiones corticoespinales. Está representada por el homúnculo, un mapa motor de cada región específica responsable del movimiento (Penfield y Boldrey, 1937). El área premotora contiene un segundo mapa motor, y su importancia reside en el control de movimientos complejos y coordinados. También se encuentra el área 8 de Brodmann (campo visual frontal) implicada en los movimientos oculares. Dentro del giro frontal inferior, se localizan

las áreas 44 y 45 (área de Broca), en sentido anterior a la corteza motora. Esta es una zona de importancia para el habla, ya que controla los labios y la lengua (Waxman, 2011). La corteza prefrontal tiene conexiones recíprocas con el tálamo y con el sistema límbico. Esta es el área de asociación, recibe e integra la información de múltiples modalidades sensoriales, desempeña un conjunto de “funciones ejecutivas”, planeación, acciones adaptativas, priorización y secuencia de acciones, integración de las funciones motoras y sensoriales elementales de conducta (Nieuwenhuys, 2008; Waxman, 2011).

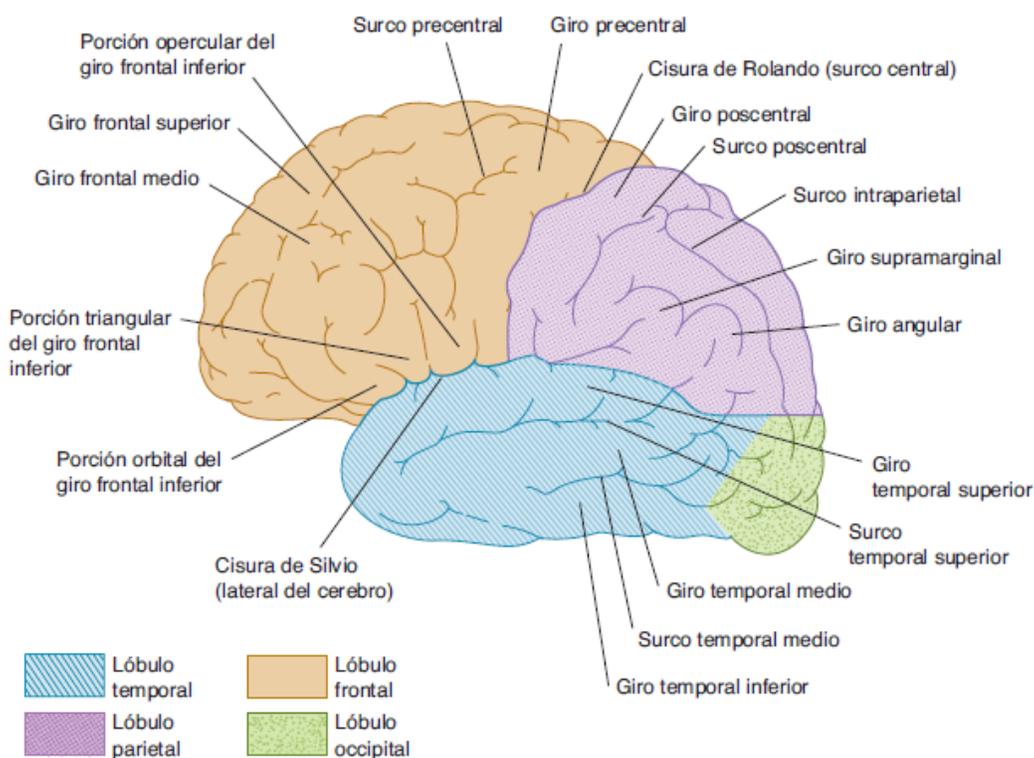


Figura 6. Vista lateral del hemisferio cerebral izquierdo. Modificado de (Waxman, 2011)

El tejido cortical es una estructura compleja de 6 capas, comenzando con la más superficial:

- Capa I o *lamina molecularis*: contiene pocos cuerpos celulares
- Capa II o *lamina granularis externa*: contiene pocos cuerpos celulares piramidales pequeños organizados de forma compacta
- Capa III o *lamina piramidalis externa*: está compuesta por somas piramidales que incrementan en tamaño conforme a la profundidad

- Capa IV o *lamina granularis interna*: contiene somas piramidales y no piramidales en forma compacta
- Capa V o *lamina pyramidalis interna*: compuesta por somas piramidales medianos y grandes dispersos y
- Capa VI o *lamina multiformis*: contiene somas piramidales de forma alargada y somas pequeños.

Esta organización en capas (**Figura 7**) no es homogénea, existiendo diferencias en la densidad, el tamaño y la forma de los cuerpos neuronales. (Nieuwenhuys, 2008).

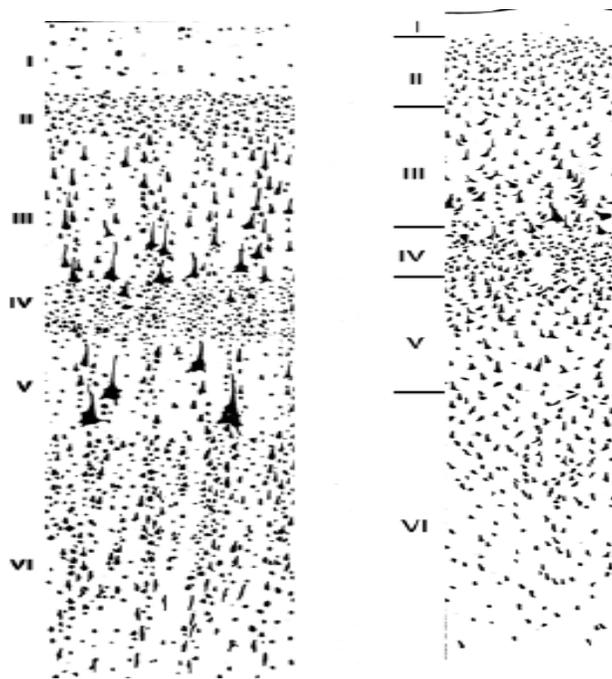


Figura 7. Organización en capas de tejido cortical en tinción de Nissl. (Nieuwenhuys, 2008)

Se han vinculado diversas funciones neuropsicológicas a áreas específicas en el lóbulo frontal, principalmente asociadas a la corteza prefrontal. Dentro de estas funciones se distinguen 2 tipos: cognitivas y del estado de ánimo. Las funciones cognitivas son definidas como el proceso mental de adquirir e interpretar el conocimiento a través del pensamiento, la experiencia y los sentidos (Henri-Bhargava, Stuss, y Freedman, 2018; Stuss, 2008). Este proceso depende de la corteza prefrontal y los circuitos frontoestriatales que conectan áreas del lóbulo frontal con los ganglios basales. Entre las funciones cognitivas se encuentran las siguientes: funciones ejecutivas, capacidad de atención, memoria de

trabajo y multitarea, lenguaje, y habilidades visoespaciales, entre otras (Stuss, 2008, 2011). Por otro lado, el estado de ánimo (tono sentimental) es el estado psicológico que refleja las vivencias afectivas y emocionales que se están teniendo, es menos intenso que una emoción y persiste durante el día (Calso *et al.*, 2019). Las funciones del estado de ánimo son las siguientes: integración emocional, conductas sociales, conductas depresivas, entre otros (Allain, 2016; Calso *et al.*, 2019).

1.1.3.2 Lóbulo frontal y edad

El lóbulo frontal es una estructura que sufre cambios funcionales con respecto a la edad. La corteza es la primera región del cerebro humano afectada con el deterioro de la capacidad cognitiva. Stuss y *colaboradores*, 2008, describen diferentes categorías para las alteraciones que sufren, con el envejecimiento, las funciones del lóbulo frontal. Entre ellas, se encuentran cambios en los procesos cognitivos: control ejecutivo (monitoreo y establecimiento de tareas), energización (inicio y mantenimiento de cualquier modo de respuesta), y del estado de ánimo que involucran la regulación emocional/conductual, toma de decisiones, y metacognición (autoconciencia y conciencia de los demás) (Stuss, 2008). Otros estudios sugieren que existe una heterogeneidad significativa entre los adultos mayores en la tasa de disminución de algunas habilidades, como las medidas del razonamiento perceptivo, la velocidad de procesamiento, atención, memoria, lenguaje (fluidez verbal), funciones ejecutivas y habilidad visoespaciales (Harada *et al.*, 2013). Además, las funciones del estado de ánimo que se ven afectadas con la edad son las siguientes: la integración emocional, las conductas sociales (Zanto y Gazzaley, 2019). También, con la edad existe tendencia a manifestaciones psiquiátricas como el trastorno depresivo mayor y ansiedad (Calso *et al.*, 2019; Zanto y Gazzaley, 2019).

1.1.3.3 Lóbulo frontal y su relación con los receptores A1 y A2A

Las funciones del lóbulo frontal (motoras, cognitivas y del estado de ánimo) se han asociado a la activación del receptor A1 y A2A (Giménez-Llort *et al.*, 2002; Ohno y Watanabe, 1996; Pereira *et al.*, 2005). Se ha visto que al utilizar agonistas del receptor A1 y antagonistas del receptor A2A, se reduce la hiperlocomoción causada por un modelo de esquizofrenia (Coelho *et al.*, 2014; Gotoh *et al.*, 2002; Pinna *et al.*, 1997; Yamada, Kobayashi, Shiozaki, *et al.*, 2014). La administración de agonistas altamente selectivo del

receptor A1, aumenta el número de errores en una prueba de memoria de trabajo en roedores, siendo esta una función cognitiva (Ohno y Watanabe, 1996). También, se ha demostrado que la memoria a corto plazo se ve interrumpida en roedores, usando un agonista del receptor A1 y antagonista del receptor A2A (Prediger y Takahashi, 2005). Asimismo, los agonistas de ambos receptores administrados en corteza cingulada posterior aumentan la pérdida de memoria espacial (Pereira *et al.*, 2005). Además, dentro de las funciones del estado de ánimo, en un estudio de ratones “knock-out” para A1^(-/-), presentan incremento de ansiedad y agresividad, así como reducción del comportamiento exploratorio, siendo conductas controladas por el lóbulo frontal (Giménez-Llort *et al.*, 2002; Ortega-escobar y Alcázar-córcoles, 2016). Esto sugiere que las funciones motoras, ejecutivas/cognitivas y del estado de ánimo podrían estar reguladas por la participación de los receptores A1 y A2A. Estas funciones son típicas de la corteza frontal y se sabe que se encuentran modificadas con la edad. Hasta la fecha se desconoce si el receptor A1 y A2A se modifica con la edad, en el lóbulo frontal.

1.1.4 Los receptores A1 y A2A en patologías neurológicas

En patologías neurológicas como la enfermedad de Alzheimer se ha reportado que existe decremento de la unión a los receptores A1, alrededor del 40% en hipocampo, en comparación con los controles. Estos datos sugieren una pérdida de los receptores A1 presinápticos en los terminales axónicos de las vías extrínsecas de hipocampo, región del cerebro que está íntimamente involucrada en los procesos de aprendizaje y memoria (Kalaria *et al.*, 1990). En esta patología, en tejido hipocampal, los sujetos presentan niveles elevados del receptor de adenosina A2A acoplado a la proteína Gs en los astrocitos (Orr *et al.*, 2015). Además, estudios en la expresión de estos receptores en células piramidales de la corteza prefrontal, en pacientes con esquizofrenia, sugieren que la disminución de los receptores A1 e incremento de A2A, y por lo tanto su desregulación en la neuromodulación de los sistemas glutamatérgicos y dopaminérgicos, contribuye a los signos y síntomas de la patología (O'Donovan *et al.*, 2018b; Zhang *et al.*, 2012). Asimismo, se sugiere que estos receptores están implicados en la regulación del metabolismo del ATP en diversas poblaciones neuronales, lo que conduce a una menor disponibilidad de sustratos necesarios para generar adenosina (Ułtas *et al.*, 1993). En esclerosis múltiple también se ha descrito, por inmunohistoquímica, la disminución de receptores A1 en

corteza frontal. (Johnston *et al.*, 2001). En epilepsia, existen pocos estudios que describen cambios en los receptores A1 y A2A. La disminución de receptores A1 y el aumento de los receptores A2A en diferentes patologías neurológicas, sugiere que, en otras patologías, como la epilepsia, puedan estar modificados estos receptores.

1.1.5 Epilepsia del lóbulo frontal (ELF)

La epilepsia es una enfermedad neurológica que afecta al 2% de la población mundial. Esta patología se caracteriza por la predisposición permanente a generar crisis epilépticas espontáneas y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta condición (Fisher *et al.*, 2005).

La epilepsia del lóbulo frontal (ELF) representa entre el 20-30% de todas las epilepsias siendo el segundo tipo de epilepsia más frecuente. Se estima que el 25% de los pacientes no responden a tratamiento con fármacos antiepilépticos. Las etiologías más frecuentes de este padecimientos son de origen tumoral (35%), anomalías del desarrollo (26%), trauma (21%), malformaciones vasculares (15%), origen genético (3%) y otras causas como encefalitis (1.5%) (Beleza y Pinho, 2011; Diehl, Sisodiya, y Manford, 2017; Fernández-Espejo, 2006; O'Muircheartaigh y Richardson, 2012)

Parte de la evaluación neurocognitiva de pacientes con ELF ha permitido identificar alteraciones en el lóbulo frontal. Dichas alteraciones afectan funciones cognitivas como la velocidad de procesamiento cognitivo, resolución de problemas, memoria a corto plazo y función ejecutiva. Además de las funciones cognitivas, también se han descrito alteraciones en funciones asociadas al estado de ánimo como problemas sociales, disfunción del pensamiento (disfunción del lenguaje y capacidad de concentración) (Pizzi *et al.*, 2009). El 20-80% de los pacientes con ELF presenta alguna comorbilidad psiquiátrica como trastorno depresivo mayor, ansiedad, trastorno por déficit de atención / hiperactividad (TDAH) o trastorno del espectro autista (van den Berg *et al.*, 2018). Se han estudiado cambios en dichas funciones con el envejecimiento fisiológico, en la edad adulta muestran problemas en la formación de conceptos, resolución de problemas y comprensión verbal (Verche, San Luis, y Hernández, 2018). Esas comorbilidades de la ELF podrían estar asociadas con cambios en la unión de los receptores de A1 y A2A.

1.1.5.1 Epilepsia y su asociación con los receptores A1 y A2A

Al presente existen dos estudios que evalúan la unión a receptores A1 en tejido de pacientes con epilepsia. Dichos estudios reportan resultados contradictorios, por un lado, Angelatou y *colaboradores* describen un incremento del 48%, mientras que el grupo de Glass y *colaboradores* encuentran un decremento de la unión de estos receptores del 70%, en epilepsia del lóbulo temporal (ELT). Esta discrepancia podría deberse a las condiciones de cada estudio. Ambos estudios utilizan metodología de autorradiografía *in vitro*, corteza temporal y el mismo ligando marcado con tritio ciclohexiladenosina ($[^3\text{H}]\text{CHA}$). Se puede sugerir que esta diferencia se deba a una saturación del receptor ante una alta concentración de ligando utilizado. Así mismo, las condiciones de los grupos control (uso de tejido peritumoral) podría afectar la densidad de receptores. También, el rango de edad, el número de sujetos evaluados en ambos casos es reducido, o que el tipo de ELT sea diferente en cada estudio (Angelatou *et al.*, 1993; Glass *et al.*, 1996). En el caso del receptor A2A, con función excitadora, se ha implicado en un número significativo de patologías cerebrales caracterizadas comúnmente por excitotoxicidad neuronal. La expresión del receptor A2A se ha reportado que incrementa en el hipocampo y corteza cerebral de pacientes humanos con epilepsia del lóbulo temporal mesial y sujetos con encefalitis de Rasmussen (Barros-Barbosa *et al.*, 2016; He *et al.*, 2020)

Patodia y *colaboradores* reportan que los receptores A1 y A2A, en pacientes con ELT con esclerosis hipocampal, no presenta diferencias significativas entre las áreas estudiadas (corteza, hipocampo y amígdala cerebral), por la técnica de inmunohistoquímica. En el grupo de pacientes se consideró el riesgo a presentar muerte súbita en epilepsia o, SUDEP (*Sudden unexpected death in epilepsy*, por sus siglas en ingles), se dividió en 3 subgrupos (alto, mediano y bajo riesgo a SUDEP). En este caso, en el grupo de pacientes con ELT con alto riesgo a SUDEP se incrementó la expresión del receptor A1 en la amígdala cerebral, sugiriendo que podría estar implicado un desbalance celular regional en la adenosina (Patodia *et al.*, 2020). Sin embargo, aún no se cuentan con estudios que permitan relacionar a la ELF y a los receptores A1 y A2A.

2 Justificación

La activación de los receptores A1 y A2A se asocia a funciones típicas del lóbulo frontal (cognitivas como referencia espacial, memoria de trabajo, memoria a corto plazo y del estado de ánimo) en diversos modelos, y éstas funciones disminuyen con la edad. En pacientes con epilepsia del lóbulo frontal existen alteraciones en funciones típicas del lóbulo frontal. En estos pacientes se desconoce el estado de la unión a estos receptores y si dicha unión es modificada con la edad.

En la ELF existen cambios en la excitabilidad cerebral y en las funciones cognitivas que pudieran asociarse a cambios en la unión a los receptores A1 y A2A. Estos cambios pudieran ser más evidentes en pacientes con edades avanzadas.

3 Hipótesis

En corteza frontal de pacientes con ELF habrá una disminución de la unión del receptor A1 e incremento de la unión a receptores A2A. Estos cambios se correlacionarán negativamente con la edad de los pacientes y serán más evidentes en comparación con autopsias de sujetos sin epilepsia.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Cuantificar la unión a los receptores A1 y A2A en tejido cortical frontal de autopsias y pacientes con ELF, así como realizar la correlación de los valores obtenidos, con la edad y variables clínicas de los sujetos.

4.2 Objetivos específicos

En corteza frontal de autopsias y pacientes con ELF con diferentes etiologías:

- I. Cuantificar la unión a receptores A1 y A2A
- II. Evaluar la densidad neuronal
- III. Correlacionar la unión a receptores A1 y A2A con la densidad neuronal y las variables clínicas

5 Metodología General

Se utilizó tejido frontal cortical de 21 pacientes con ELF sometidos a cirugía de resección de foco epiléptico. Los resultados de autorradiografía *in vitro* e histología fueron comparados con los resultados obtenidos de tejido frontal cortical de 19 autopsias.

5.1 Obtención y manipulación de tejido cortical

5.1.1 Selección de pacientes con ELF

Las muestras de tejido de corteza frontal de pacientes con ELF fueron obtenidas mediante el programa de “Cirugía de Epilepsia” en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Este programa evalúa a los pacientes que sufren epilepsia. En estos pacientes, la cirugía es un tratamiento disponible capaz de disminuir o, en algunos casos, eliminar las crisis epilépticas espontáneas. Durante la cirugía se coloca una malla de electrodos sobre la corteza cerebral que permite identificar el foco epiléptico y garantizar la disección completa. El tejido obtenido fue almacenado inmediatamente a -70°C hasta su uso. Se consideraron los siguientes criterios de inclusión y exclusión del programa de “Cirugía de Epilepsia” (**Tabla 3**):

Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión para la selección de pacientes con ELF

Criterios de Inclusión:	Criterios de exclusión:
<ul style="list-style-type: none">• Pacientes candidatos a cirugía de epilepsia con diagnóstico de ELFF• Edad entre 3 y 53 años• Pacientes que sepan leer y escribir• Valoración preoperatoria completa• Las crisis se asociaron a un deterioro de la calidad de vida• Libres de FAE 24 horas antes del procedimiento quirúrgico	<ul style="list-style-type: none">• Enfermedades sistémicas graves que contraindicaran cirugía mayor• Pacientes con diagnóstico de enfermedad neurodegenerativa• Falta de apego al tratamiento• Presencia de implantes, prótesis metálicas y/o claustrofobia• Pacientes previamente sometidos a cualquier neurocirugía• Pacientes sin valoración clínica adecuada

FAE: fármacos antiepilépticos.

En la **tabla 4**, se muestran las variables clínicas del grupo de pacientes con epilepsia del lóbulo frontal.

Tabla 4. Variables clínicas de pacientes con ELF

Pacientes	Edad (años)	Sexo	Edad inicio de crisis (años)	Duración epilepsia (años)	Frecuencia de crisis (por mes)	Diagnóstico
73	3	H	0.5	2.5	30	Glioblastoma
112	4	M	3	1	8	Oligoastrocitoma
122	5	H	4	1	1	Oligoastrocitoma
135	13	M	9	4	76	DFC
139	20	H	5	14	60	Oligoastrocitoma
221	24	H	16	9	90	EPT
225	28	H	10	18	4	DFC
278	28	H	7	21	1	Astrocitoma
471	28	H	8	20	150	DFC
477	29.25	H	29.15	0.1	3	EPT
479	29	M	4	25	5	MAV
480	34	H	24	10	3	DFC
490	35	H	0.8	34	6	DFC
492	37	H	2	35	30	DFC
520	39	H	26	13	90	DFC
524	40	H	40	0.16	1	DFC
526	43	M	41	2	1	EPT
536	46	H	10	36	15	DFC
537	48	H	43	5	0.4	DFC
541	53	H	1	52	300	DFC
543	53	H	52	1	10	DFC

M: mujer, H: hombre, $\bar{x} \pm s$: desviación estándar de cada variable. DFC: Displasia focal cortical, MAV: Malformación arteriovenosa, EPT: Epilepsia postraumática

5.1.2 Tejido de autopsias

Las muestras de tejido de corteza frontal de autopsias fueron obtenidas del Servicio Médico Forense (SEMEFO), de sujetos sin historial de enfermedades neurológicas y con diversas causas de fallecimiento. Las muestras se obtuvieron mediante autopsia con un intervalo post-mortem (IPM) de 10-20 horas e inmediatamente almacenadas después de su obtención a -70°C . Las variables clínicas de las autopsias se representan en la **tabla 5**.

Tabla 5. Variables clínicas de autopsias

Autopsias	Edad (años)	Sexo	Causa de muerte	Intervalo postmortem (h)
A11	12	M	Asfixia	> 14
A21	16	H	Asfixia	18
A 20	17	M	Asfixia	18
A19	22	M	Trauma tóraco-abdominal	12
A17	25	H	Herida punzocortante en tórax	> 18
A2	29	H	Policontusión	18
A3	30	H	Lesión por proyectil de arma de fuego	12 a 14
A9	33	M	Traumatismo torácico	12
A13	33	M	Asfixia	16-18
A10	36	H	Traumatismo torácico por proyectil de arma de fuego	12
A12	40	M	Herida por proyectil de arma de fuego	20
A 4	40	H	Lesión por proyectil de arma de fuego	12 a 14
A7	45	H	Asfixia	18
A14	45	M	Desconocido	10
A6	49	M	Asfixia	18
A18	55	H	Trauma tóraco-abdominal	14-16
A16	57	H	Infarto del miocardio	> 18
A8	73	H	Complicaciones de diabetes mellitus	15
A5	73	H	Neumonía	12 a 14
$\bar{x} \pm s$	38.4±17.5	M=8; H=11		15.4±3

M: mujer, H: hombre, $\bar{x} \pm s$: desviación estándar de cada variable.

5.1.3 Manipulación de tejido

Se obtuvieron secciones paralelas, de 20 μm de grosor, de tejido cortical frontal del grupo de autopsias y del grupo de pacientes con ELF, mediante un criostato a -20°C . Las secciones se montaron en laminillas de vidrio previamente gelatinizadas o cubiertas con poly-L lisina. Estas laminillas, bajo las mismas condiciones, fueron divididas en dos bloques. El primer bloque, 9 laminillas por muestra, fue utilizado para el ensayo de autorradiografía *in vitro* (unión al receptor A1). El segundo bloque, 3 laminillas por muestra, se utilizó para la histología (densidad neuronal). Todas las laminillas se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5.2 Experimento 1. Evaluación de la densidad neuronal en corteza frontal de pacientes con ELF mediante histología

5.2.1 Histología

El conteo neuronal se evaluó mediante histología por la tinción de Nissl. Tres laminillas por muestra se utilizaron para este ensayo. Las secciones en paralelo correspondientes para histología (20 µm de grosor) se fijaron con paraformaldehído al 4%, con buffer de fosfatos 1x (PBS) por 20 minutos y se dejaron secar. Las laminillas se mantuvieron en refrigeración a temperatura de 4°C hasta su uso. Al momento del ensayo se enjuagaron en agua destilada a temperatura ambiente. Después se tiñeron en la solución de violeta de cresilo a 57°C por 6 minutos y se deshidrataron en varios cambios de etanol al 96%. Por último, las laminillas se enjuagaron en agua corriente y se dejaron secar hasta el momento de montarlas (Gittins y Harrison, 2004).

5.2.2 Método de conteo fraccionario

Las imágenes obtenidas, del procedimiento histológico, se digitalizaron usando una cámara (Nikon DSFi3), conectada al microscopio (Zeis Axioskop 2 Mot), objetivo (seco) Plan-Neofluar 20x (NA=0.5), y se evaluaron con ayuda del programa NIS-Elements v.5.50. Se determinó el número de células por unidad de volumen en las capas I-VI de corteza usando el método de conteo fraccionado (West, 1993).

Para el método de conteo fraccionado se evalúa 1 muestra seriada obtenida a intervalos de cada 3 muestras. En este caso, se tomarán en cuenta 3 fracciones: la fracción de muestreo (ssf), la fracción de área de muestreo (asf) y la fracción del espesor de muestreo (h/t). La fracción de muestreo, (ssf)= área (cuadrante)/(x,y), se calcula considerando el área de conteo. La fracción del espesor de muestreo (h/t) considera la altura del disector (h) y el grosor de las secciones (t), en este caso corresponde a 20 micras. El número de células se calculó usando la siguiente fórmula:

$$N = \sum Q^{-} * \frac{t}{h} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{ssf}$$

En donde Q representa el número de células positivas para violeta de cresilo en una fracción de volumen conocido de cada área evaluada (West, 1993; West, Slomianka, y Gundersen, 1991).

5.3 Experimento 2. Evaluación de la unión al receptor A2A y A1 en corteza frontal de pacientes con ELF mediante autorradiografía *in vitro*

5.3.1 Ensayo para evaluar la unión a los receptores A2A y A1

Tres laminillas por sujeto se utilizaron para este ensayo. Las laminillas fueron pre-incubadas en Buffer 50 mM Tris-HCl pH 7.4 conteniendo 10 mM MgCl₂ y 2 UI/ml de adenosina deaminasa a 37°C por 30 min para remover adenosina endógena.

5.3.1.1 Ensayo para evaluar la unión total (unión a A1 y A2A)

Posteriormente, una laminilla por sujeto se incubó en Tris-HCl conteniendo 5 nM [³H]CGS 21680 (30 Ci/mmol) por 2 h a 23 °C. Debido a que [³H]CGS 21680 es ligando para los receptores A1 y A2A, se consideró como unión total. La reacción de unión se terminó lavando las laminillas por 5 min en buffer frío seguido (-4°C) por un rápido enjuague con agua destilada en frío. (Jarvis y Williams, 1989; Lindström, Ongini, y Fredholm, 1996)

5.3.1.2 Ensayo para evaluar la unión a A2A

Posterior a la sección 5.3.1, una laminilla por sujeto se incubó en Tris-HCl conteniendo 5 nM [³H]CGS 21680 (30 Ci/mmol) por 2 h a 23 °C. Debido a que el [³H]CGS 21680 es un agonista de los receptores A1 y A2A, se adicionó un antagonista de los receptores A1 DCPXP (100 nM). La reacción de unión se terminó lavando las laminillas por 5 min en buffer frío seguido (-4°C) por un rápido enjuague con agua destilada en frío. Estos datos arrojaron la cuantificación de la unión al receptor A2A (Jarvis y Williams, 1989; Lindström, Ongini, y Fredholm, 1996)

5.3.1.3 Ensayo para evaluar la unión a A1

Para esta sección se utilizaron los valores de la sección 5.3.1.2. La diferencia entre la unión total y la unión de A2A permitió conocer la unión al receptor A1. (Jarvis y Williams, 1989; Lindström, Ongini, y Fredholm, 1996)

5.3.2 Ensayo para evaluar la unión inespecífica

Se utilizó una laminilla para este ensayo el cual se realizó como se describió en la sección 5.3.1.2, excepto que en la incubación con [³H]CGS 21680 se adicionó (SCH 58261, 100 nM), un antagonista de los receptores A1. Los resultados que se obtuvieron indicaron la unión inespecífica del ligando marcado.

Al término de todos los ensayos, las secciones cerebrales fueron secadas bajo un flujo gentil de aire tibio, después colocadas en magazines de plomo con un estándar de tritio (ARC Inc.) y fueron expuestas a una película sensible a tritio a temperatura ambiente por 5 meses. Posteriormente las películas fueron reveladas con solución reveladora Kodak D19 y solución fijadora Kodak a temperatura ambiente (Jarvis y Williams, 1989).

5.3.3 Análisis de autorradiogramas

Los análisis cuantitativos de los autorradiogramas fueron realizados utilizando *Bioquant Life Science V11.2*, usando densitometría con análisis de imagen. Se obtuvo primero las lecturas de densidad óptica relativa del estándar de tritio. A partir de los valores de densidad óptica relativa se hizo una relación con las medidas de radioactividad (dpm/mm² de tejido) para obtener una curva estándar. Se obtuvieron las lecturas de densidad óptica del tejido cortical. Posteriormente, la densidad óptica se convierte en radioactividad con base en la proyección de los datos a la curva estándar. Finalmente, los valores se convierten a fmol/mg de proteína a partir de la siguiente formula:

$$\frac{\text{dpm}}{\text{mm}^2} \times \frac{1\text{pCi}}{2.2 \text{ dpm}} \times \frac{\text{fmol}}{\text{pCi}}$$

Se determinó la densidad óptica presente en los pares de capas I-II, III-IV y V-VI de cada muestra de tejido, 10 lecturas por par de capa, y a partir de estos valores se calculó la radioactividad promedio por miligramo de tejido (Jarvis y Williams, 1989; Kuhar, 2001).

5.4 Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos fueron sujetos a análisis por T de Student o prueba de U de Mann-Whitney y correlacionados con las variables clínicas de las autopsias (edad e intervalo postmortem) y de los pacientes (edad, edad de inicio, tiempo de evolución y

frecuencia de crisis), mediante correlación de Pearson o Spearman, estableciendo un valor para $\alpha=0.05$. Los valores son expresados como media \pm error estándar.

6 Resultados

Las autopsias presentaron las siguientes características clínicas: edad 38.4 ± 17.5 años e intervalo postmortem 15.4 ± 3.4 horas. En el grupo de pacientes con ELF se reportan los siguientes valores: edad 30.4 ± 15 años, edad de inicio 15.9 ± 16.3 años, tiempo de evolución 14.5 ± 14.8 años y frecuencia de crisis 42.1 ± 70.1 por mes (**Tabla 6**). En el grupo de pacientes con ELF se encontraron 3 tipos de etiologías: lesional, epilepsia postraumática (EPT) y displasia focal cortical (DFC). El resumen de los valores de cada etiología se encuentra en la **tabla 6**.

Tabla 6. Características clínicas del tejido utilizado

Variables clínicas	Autopsias (n=19)	Pacientes ELF totales (n=21)	Pacientes ELF Lesional (n=6)	Pacientes ELF EPT (n=3)	Pacientes ELF DFC (n=12)
Sexo	8F 11M	4F 17M	2 F 4 M	0 F 3 M	3 F 9 M
Edad (años)	38.4 ± 17.5	30.4 ± 15	40.2 ± 10.01	40 ± 5.56	23.16 ± 15.06
Edad de inicio (años)	-	15.9 ± 16.3	35.8 ± 14.6	12.26 ± 12.75	6.95 ± 6.85
Tiempo de evolución (años)	-	14.5 ± 14.8	4.37 ± 6.91	27.66 ± 12.74	16.2 ± 15.5
Frecuencia de crisis (mes)	-	42.1 ± 70.1	3.23 ± 3.58	37 ± 46.11	69.08 ± 85.4
IPM (horas)	15.4 ± 3.4	-	-	-	-

Los valores representan la media \pm desviación estándar. F: femenino, M: masculino, EPT: epilepsia postraumática, DFC: displasia focal cortical

6.1 Densidad neuronal, unión a A1 y A2A en corteza frontal de autopsias y su correlación con variables clínicas

En el tejido obtenido mediante autopsia se obtuvieron los siguientes valores del número de neuronas por mm^3 : capa I-II 1552 ± 40.39 , capa III-IV 1395 ± 30.5 y capa V-VI 1164 ± 45.49 (**Figura 8**).

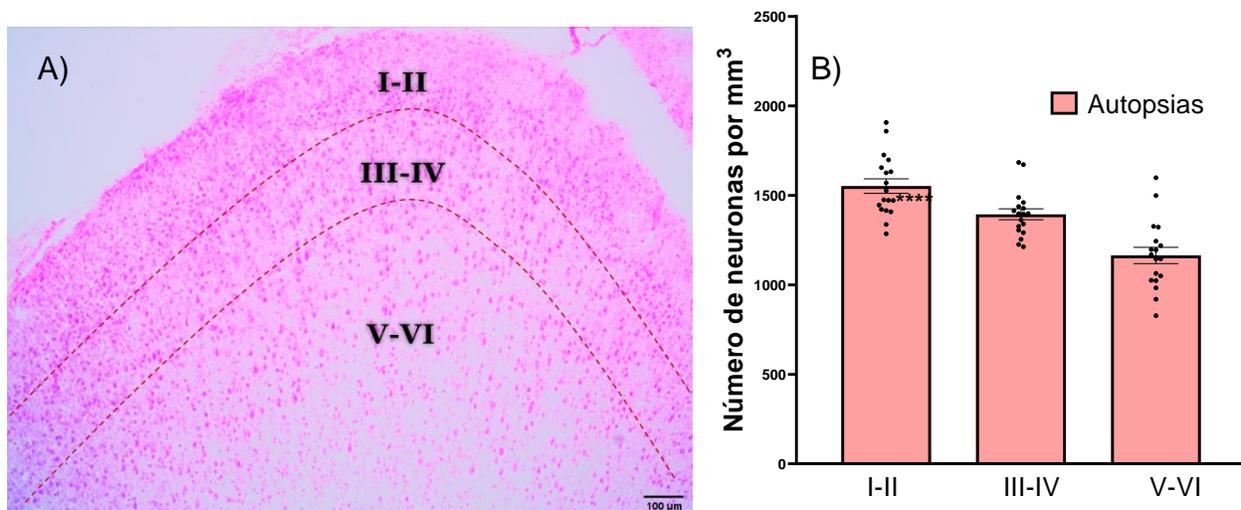


Figura 8. A) Microfotografía representativa de una sección cortical de una autopsia teñida con la tinción de Nissl. B) Representación de la densidad neuronal en las diferentes capas de la corteza frontal de autopsias. Los valores se representan como la media + error estándar.

En el tejido obtenido mediante autopsias se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas entre la edad y la densidad neuronal, en las capas superficiales e intermedias (**Tabla 7**). Se encontró que los sujetos de mayor edad presentaron menor número de neuronas en las capas I-II ($p=0.003$) y III-IV ($p=0.014$).

En el rango de IPM (10-20 h) del presente estudio no hubo decremento de la cuenta neuronal. Esto indica que bajo nuestras condiciones experimentales hubo una buena preservación del tejido

Tabla 7. Correlación entre las variables clínicas y la densidad neuronal del tejido de autopsia

Variables clínicas	Rango	I-II			III-IV			V-VI		
		r	r ²	p	r	r ²	p	r	r ²	p
Edad (años)	12-73	-0.597	0.356	0.003**	-0.503	0.253	0.014*	-0.314	0.098	0.096
IPM (horas)	12-18	0.288	0.082	0.116	0.036	0.001	0.441	0.234	0.054	0.168

Los valores representan los coeficientes de correlación de Spearman. IPM: Intervalo postmortem.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

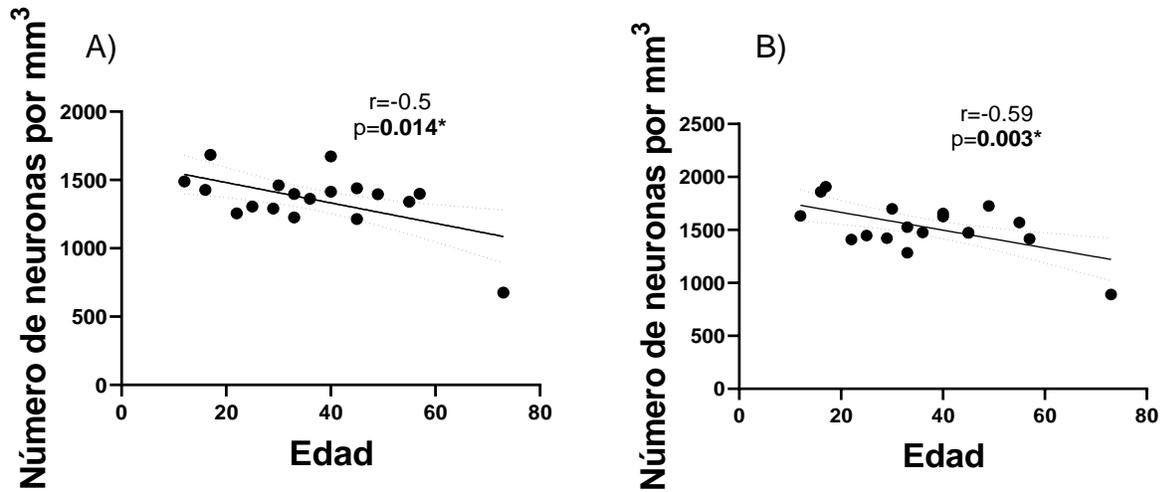


Figura 9. Representación de la correlación entre la edad y el conteo neuronal en las capas I-II (A) y III-IV (B) de tejido cortical de autopsias.

La densidad óptica de la unión a A2A de las diferentes capas fue similar. En el tejido obtenido mediante autopsia se obtuvieron los siguientes valores de la unión al receptor A2A: capas I-II 9.193 ± 1.6 fmol/mg de proteína, capas III-IV 7.457 ± 1.3 fmol/mg de proteína y capas V-VI 6.666 ± 0.7 fmol/mg de proteína. (**Figura 9**).

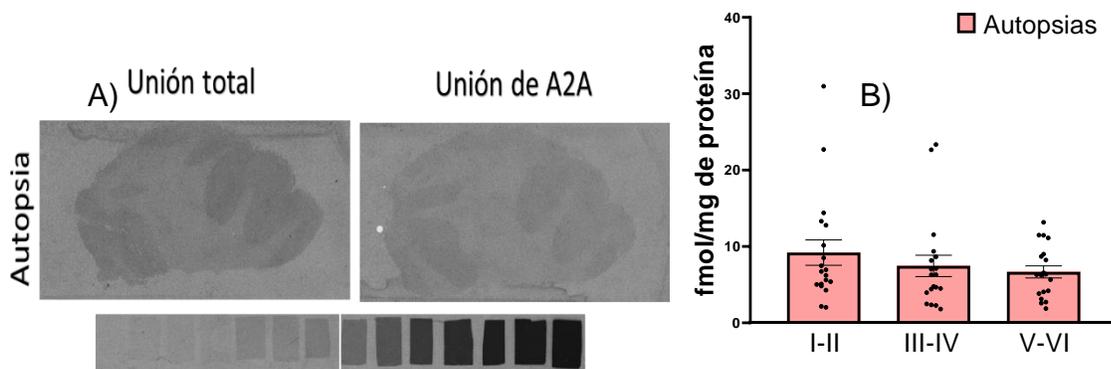


Figura 10. A) Autorradiograma representativo de tejido cortical obtenido de autopsia. La unión total corresponde a la unión del agonista $[3H]CGS21680$, mientras que la unión de A2A corresponde al agonista $[3H]CGS21680$ ante la presencia de un antagonista de A1. Nótese la menor densidad óptica en este último. En la parte inferior se muestra la imagen del estándar utilizado en el ensayo. B) Representación de la unión al receptor A2A en la corteza frontal de autopsias. Los valores representan la media + error estándar.

En el tejido obtenido mediante autopsias no se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas entre las variables clínicas y la unión al receptor A2A (**Tabla 8**) ni entre el conteo neuronal y la unión al receptor A2A (**Tabla 9**).

Tabla 8. Correlación entre las variables clínicas y la unión al receptor A2A del tejido de autopsia

Variables clínicas	Rango	I-II			III-IV			V-VI		
		r	r ²	p	r	r ²	p	r	r ²	p
Edad (años)	12-73	-0.54	0.29	0.13	-0.065	0.0042	0.79	0.005	0.00005	0.98
IPM (horas)	12-18	-0.066	0.004	0.78	-0.61	0.0037	0.8	-0.41	0.001	0.86

Los valores representan los coeficientes de correlación de Spearman. IPM: Intervalo postmortem.

Tabla 9. Correlación entre el conteo neuronal y la unión al receptor A2A del tejido de autopsia

		Unión al receptor A2A								
		I-II			III-IV			V-VI		
		r	r ²	p	r	r ²	p	r	r ²	p
Conteo neuronal	I-II	0.025	0.0006	0.919	-	-	-	-	-	-
	III-IV	-	-	-	0.095	0.009	0.704	-	-	-
	V-VI	-	-	-	-	-	-	0.011	0.0001	0.964

Los valores representan los coeficientes de correlación de Spearman.

En el caso de la unión al receptor A1, la densidad entre las diferentes capas fue similar y se obtuvieron los siguientes valores de unión: capas I-II 27.78 + 2.04 fmol/mg de proteína, capas III-IV 28+ 1.9 fmol/mg de proteína y capas V-VI 25.24 + 1.4 fmol/mg de proteína. En cuanto a la unión a A1 y el IPM (10-20 h) no se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas, lo que refiere preservación del tejido cortical del grupo comparativo. Por otro lado, se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas entre la edad y la unión al receptor A1 en capas intermedias (III-IV). El análisis de correlación reveló que los sujetos de mayor edad presentaron menores valores de unión en las capas III-IV (**Tabla 10 y figura 11**). Además, no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre la unión al receptor A1 y el conteo neuronal (**Tabla 11**).

Tabla 10. Correlación entre las variables clínicas y la unión al receptor A1 del tejido de autopsia

Variables clínicas	Rango	I-II			III-IV			V-VI		
		r	r ²	p	r	r ²	p	r	r ²	p
Edad (años)	12-73	-0.241	0.057	0.32	-0.499	0.240	0.03*	-0.323	0.102	0.17
IPM (horas)	12-18	-0.168	0.025	0.49	-0.063	0.003	0.79	-0.009	0.00008	0.97

Los valores representan los coeficientes de correlación de Spearman. IPM: Intervalo post-mortem.
*p < 0.05, **p < 0.01

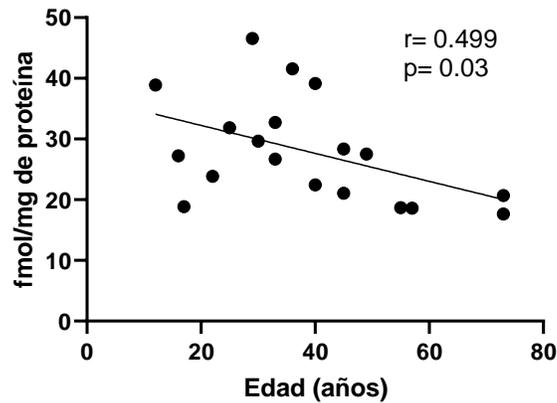


Figura 11. Representación de la correlación entre la unión al receptor A1 y la edad en la capa III-IV de tejido cortical de autopsias.

Tabla 11. Correlación entre el conteo neuronal y la unión al receptor A1 del tejido de autopsia

		Unión de A1								
		I-II			III-IV			V-VI		
		r	r ²	p	r	r ²	p	r	r ²	p
Conteo neuronal	I-II	-0.184	0.034	0.463	-	-	-	-	-	-
	III-IV	-	-	-	-0.041	0.0016	0.87	-	-	-
	V-VI	-	-	-	-	-	-	-0.236	0.05	0.34

Los valores representan los coeficientes de correlación de Spearman.

6.1.1 Conclusiones de la evaluación del tejido de autopsias:

- No existen cambios de la densidad neuronal, ni en la unión a A2A ni A1, conforme aumenta el IPM, por lo que el tejido de las autopsias puede considerarse control.
- Conforme aumenta la edad la densidad neuronal (capas I-II y III-IV), así como la unión al receptor A1 (capas III-IV) disminuyen. Sin embargo, estos cambios no se correlacionan entre sí.
- La unión de A2A no se modifica con respecto a la edad, ni se correlaciona con la densidad neuronal.

6.2 Densidad neuronal, unión a A1 y A2A en corteza frontal de pacientes con ELF y su correlación con variables clínicas

6.2.1 Densidad neuronal en corteza frontal de pacientes con ELF y su correlación con variables clínicas

En comparación al tejido de autopsia, en tejido de pacientes con ELF, se observó un decremento de la densidad neuronal de 40.4% en capas superficiales (923.7 ± 58.1 número de neuronas por mm^3 , $p < 0.0001$), 36.7% en capas intermedias (882.5 ± 57.9 número de neuronas por mm^3 , $p < 0.0001$) y 33.2% en capas profundas (776.7 ± 57.9 número de neuronas por mm^3 , $p < 0.0001$). Estos valores se encuentran representados en las **figuras 12 y 13**. Esta tendencia fue similar para las diferentes etiologías de la ELF (**Figura 14**).

Los valores obtenidos para la densidad neuronal y las variables clínicas revelaron que no existen correlaciones significativas entre el conteo neuronal y las variables analizadas (**Tabla 12**).

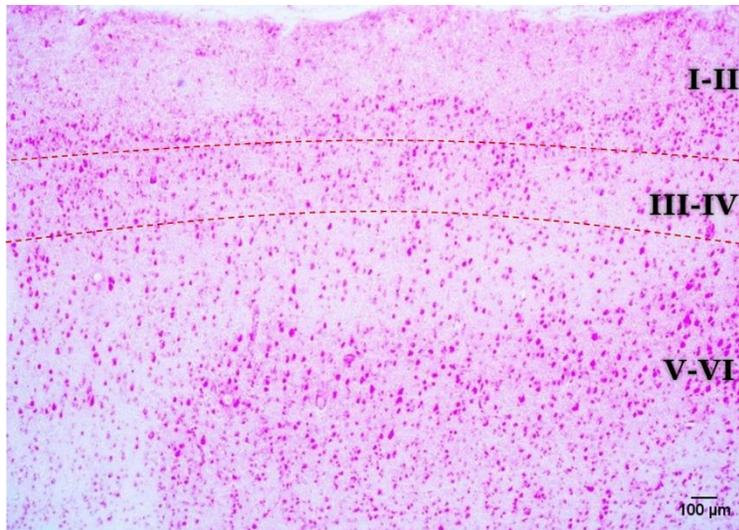


Figura 12. Microfotografía representativa de la tinción de Nissl de tejido cortical de pacientes con ELF.

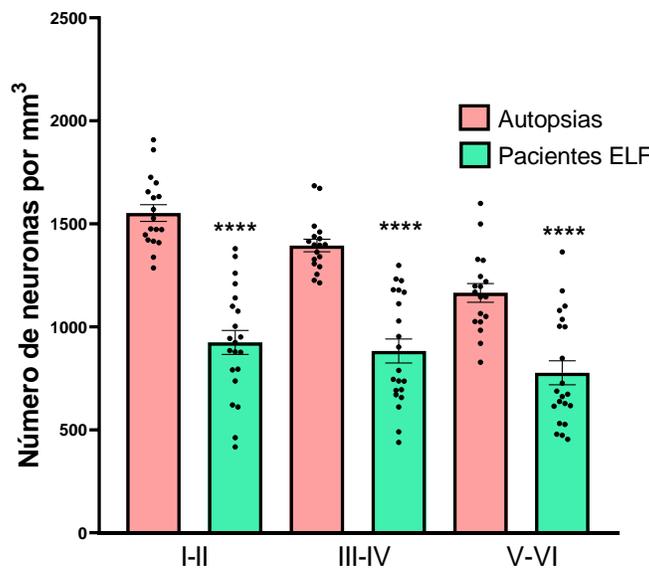


Figura 13. Representación de la densidad neuronal en las capas superficiales (I-II), intermedias (III-IV) y profundas (V-VI) en tejido cortical de autopsias y pacientes con ELF. Los valores representan la media + error estándar. U-Mann Whitney. **** $p < 0.0001$ con respecto a los valores obtenidos en el tejido cortical de autopsia.

Tabla 12. Correlación entre las variables clínicas y la densidad neuronal del tejido cortical de pacientes con ELF

Variables clínicas	Rango	I-II			III-IV			V-VI		
		r	r ²	p	r	r ²	p	r	r ²	p
Edad (años)	3-53	0.234	0.055	0.13	0.201	0.041	0.24	0.098	0.009	0.22
Edad de inicio (años)	0.8-52	0.166	0.027	0.057	0.272	0.074	0.11	0.194	0.037	0.06
Duración de epilepsia (años)	1-35	-0.049	0.002	0.27	-0.153	0.023	0.26	-0.114	0.012	0.19
Frecuencia de crisis (mensual)	3-90	-0.077	0.005	0.22	0.018	0.0003	0.45	0.002	0.000004	0.33

Los valores representan los coeficientes de correlación de Spearman. IPM: Intervalo post-mortem.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

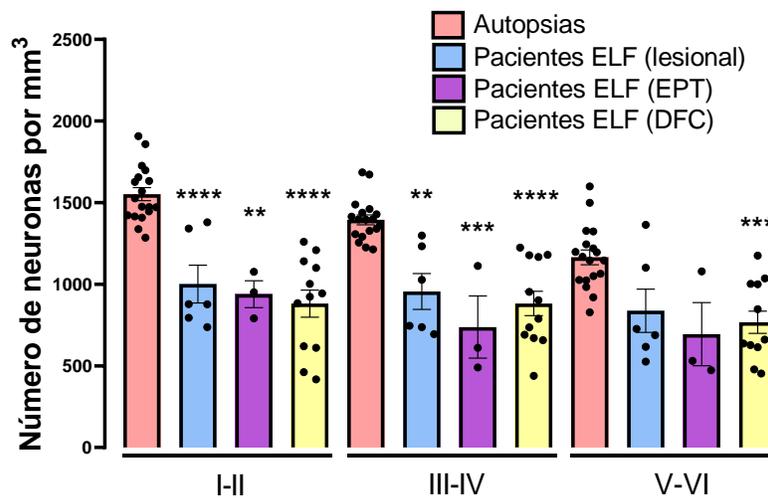


Figura 14. Representación de la densidad neuronal en las capas superficiales (I-II), intermedias (III-IV) y profundas (V-VI) en tejido cortical de autopsias y pacientes con ELF con diferentes etiologías. EPT: Epilepsia postraumática, DFC: Displasia focal cortical. Los valores representan la media + error estándar de la media. Anova-1 vía. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ con respecto a los valores obtenidos en el tejido cortical de autopsia.

6.2.2 Unión al receptor A2A en corteza frontal de pacientes con ELF y su correlación con variables clínicas

En comparación al tejido de autopsia, la unión al receptor A2A en tejido de pacientes con ELF, se observaron valores similares en todas las capas estudiadas. Estos valores se encuentran representados en las **figuras 15 y 16**. Esta situación se mantuvo cuando se analizaron los datos dependiendo de las diferentes etiologías (**Figura 17**).

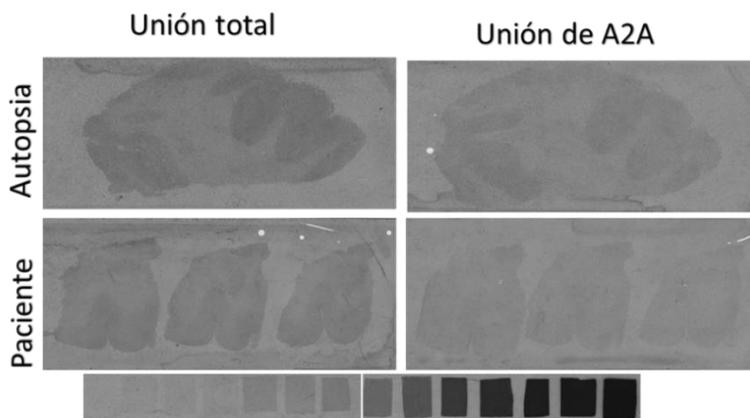


Figura 15. Autorradiograma representativo de la unión al receptor A2A de tejido cortical obtenido de autopsia y paciente con ELF.

Los valores obtenidos para la unión del radioligando a los receptores A2A y las variables clínicas revelaron que, en los pacientes con ELF, no se reportan correlaciones estadísticamente significativas (**Tabla 13**).

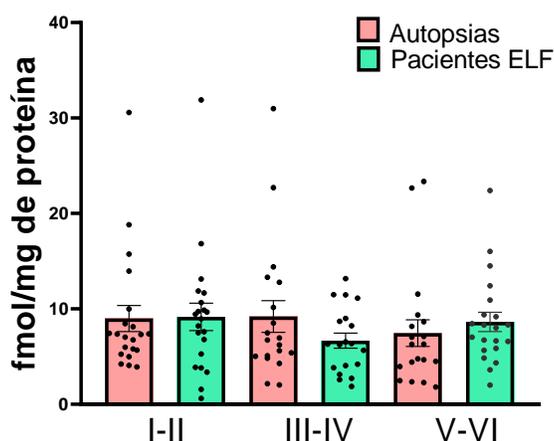


Figura 16. Representación de la unión al receptor A2A en las capas superficiales (I-II), intermedias (III-IV) y profundas (V-VI) en tejido cortical de autopsias y pacientes con ELF. U-Mann Whitney. Los valores representan la media + error estándar.

Tabla 13. Correlación entre las variables clínicas y la unión al receptor A2A del tejido cortical de pacientes con ELF

Variables clínicas	Rango	I-II			III-IV			V-VI		
		r	r ²	p	r	r ²	p	r	r ²	p
Edad (años)	3-53	0.034	0.001	0.88	0.039	0.001	0.86	0.053	0.002	0.81
Edad de inicio (años)	0.8-52	-0.042	0.001	0.85	-0.255	0.065	0.26	-0.033	0.001	0.88
Duración de epilepsia (años)	1-35	0.057	0.003	0.80	0.041	0.001	0.85	0.041	0.001	0.86
Frecuencia de crisis (mensual)	3-90	-0.111	0.012	0.63	0.128	0.016	0.57	-0.163	0.026	0.47

Los valores representan los coeficientes de correlación de Spearman.

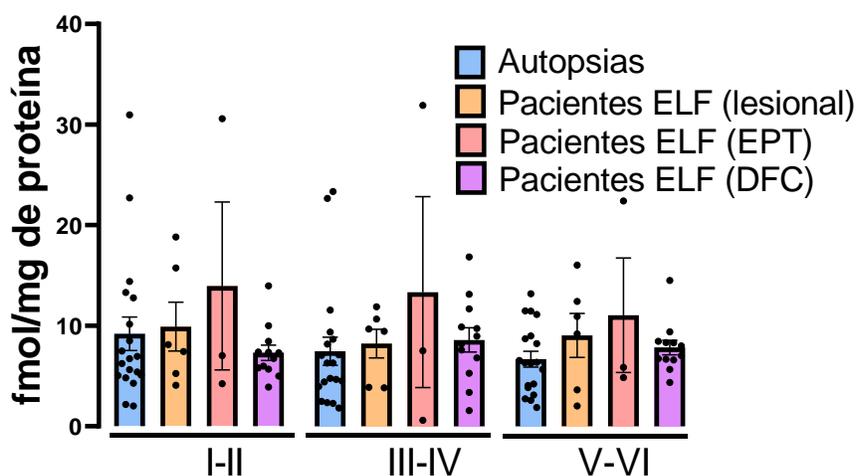


Figura 17. Representación de la unión al receptor A2A en las capas superficiales (I-II), intermedias (III-IV) y profundas (V-VI) en tejido cortical de autopsias y pacientes con ELF con diferentes etiologías. DFC: Displasia focal cortical, EPT: epilepsia postraumática. U-Mann Whitney. Los valores representan la media \pm error estándar de la media.

De acuerdo con estos valores obtenidos, no se encontraron correlaciones significativas entre la unión al receptor A2A y el conteo neuronal (**Tabla 14**). Sin embargo, al clasificar entre las diferentes etiologías, el grupo de pacientes con DFC presentaron una correlación

significativa en las capas superficiales, a mayor número de neuronas, menor unión a A1 (Figura 18).

Tabla 14. Correlaciones entre conteo neuronal y la unión al receptor A2A del tejido cortical de pacientes con ELF

		Unión de A2A								
		I-II			III-IV			V-VI		
		r	r ²	p	r	r ²	p	r	p	r ²
Conteo neuronal	I-II	-0.322	0.103	0.154	-	-	-	-	-	-
	III-IV	-	-	-	-0.194	0.038	0.397	-	-	-
	V-VI	-	-	-	-	-	-	0.164	0.027	0.474

Los valores representan los coeficientes de correlación de Spearman. IPM: Intervalo post-mortem.
*p < 0.05, **p < 0.01

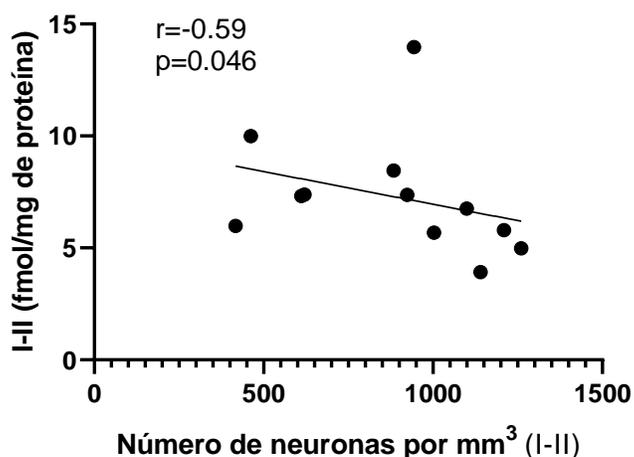


Figura 18. Representación de la correlación entre la unión al receptor A2A y la densidad neuronal en la capa I-II de tejido cortical de pacientes con ELF que presentan DFC.

6.2.3 Unión al receptor A1 en corteza frontal de pacientes con ELF y su correlación con variables clínicas

En comparación al tejido de autopsia, en tejido de pacientes con ELF, se observó un decremento de la unión al receptor A1 de 49.6% en capas superficiales I-II (13.98 ± 1.9 fmol/mg de proteína, $p < 0.001$), 55.4% en capas intermedias III-IV (12.47 ± 1.7 fmol/mg de proteína, $p < 0.0001$) y 60.9% en capas profundas V-VI (9.865 ± 1.4 fmol/mg de proteína,

$p < 0.0001$). Estos valores se encuentran representados en la **figura 19**. Además, al separar el grupo de pacientes con ELF en las diferentes etiologías se mantiene esta tendencia en todas las capas (**Figura 20**)

Las correlaciones de los valores obtenidos para la unión al receptor A1 y las variables clínicas revelaron que los pacientes con ELF de mayor edad son los que presentan los valores más altos de unión al receptor A1 en capas superficiales I-II e intermedias III-IV. También se encontró que los pacientes con mayor duración de la epilepsia presentan mayor unión a A1 en todas las capas corticales (I-II, III-IV, V-VI) (**Tabla 15**). Estas correlaciones positivas se representan en la **figura 21**. Además, sujetos que inician a edades tempranas presentan una mayor unión al receptor A1 en capas profundas. Esta correlación negativa se representa en la **figura 21**. Los valores más altos son similares a los promedios de las autopsias.

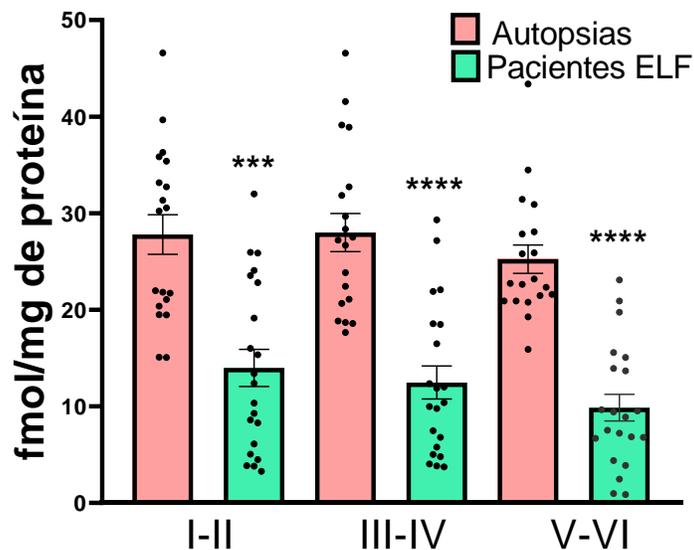


Figura 19. Representación de la unión al receptor A1 en las capas superficiales (I-II), intermedias (III-IV) y profundas (V-VI) en tejido cortical de autopsias y pacientes con ELF. Los valores representan la media + error estándar de la media. U-Mann Whitney. **** $p < 0.0001$ con respecto a los valores obtenidos en el tejido cortical de autopsia.

Tabla 15. Correlación entre las variables clínicas y la unión al receptor A1 del tejido cortical de pacientes con ELF

Variables clínicas	Rango	I-II			III-IV			V-VI		
		r	r ²	p	r	r ²	p	r	r ²	p
Edad (años)	3-53	0.484	0.23	0.026*	0.554	0.302	0.009**	0.058	0.003	0.801
Edad de inicio (años)	0.8-52	-0.056	0.003	0.8	0.112	0.012	0.62	-0.581	0.337	0.006**
Duración de epilepsia (años)	1-35	0.364	0.132	0.027*	0.257	0.066	0.028*	0.525	0.275	0.014*
Frecuencia de crisis (mensual)	3-90	-0.293	0.086	0.19	-0.167	0.028	0.46	0.122	0.014	0.597

Los valores representan los coeficientes de correlación de Spearman. IPM: Intervalo post-mortem.

*p < 0.05, **p < 0.01

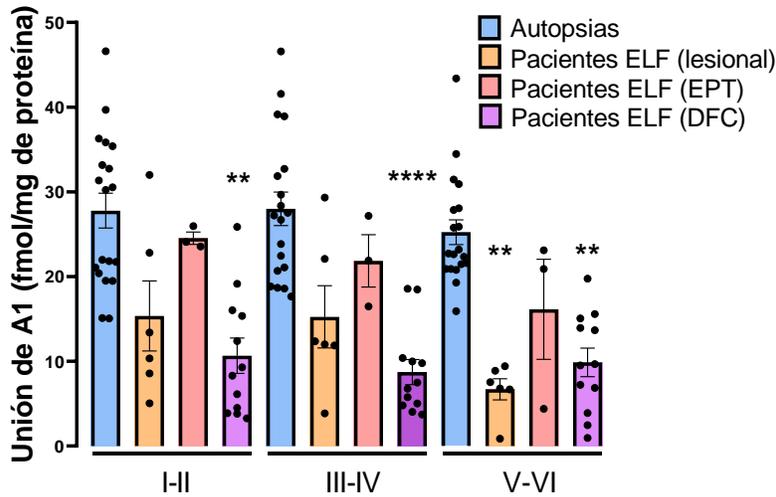
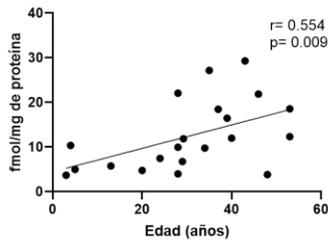
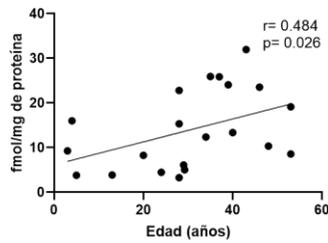


Figura 20. Representación de la unión al receptor A1 en las capas superficiales (I-II), intermedias (III-IV) y profundas (V-VI) en tejido cortical de autopsias y pacientes con ELF con diferentes etiologías. U-Mann Whitney. Los valores representan la media + error estándar de la media.

La edad de correlaciona de forma positiva con la unión de A1 en capas superficiales e intermedias en paciente con ELF



La edad de inicio (años) se correlaciona de forma negativa con la unión de A1 en capas profundas (V-VI) en tejido cortical de pacientes con ELF

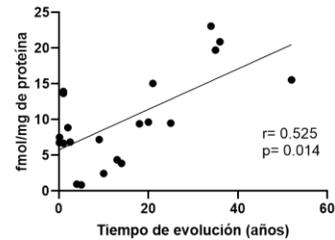
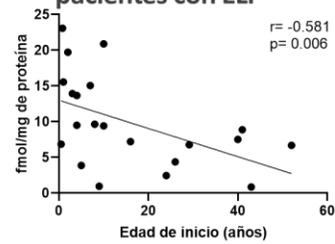


Figura 21. Representación de las correlaciones significativas entre la unión al receptor A1 y la edad en las capas I-II y III-IV (lado izquierdo). Correlación significativa entre la unión al receptor A1 y edad de inicio, así como tiempo de evolución de la patología (años) en capas profundas V-VI (lado derecho) de tejido cortical de pacientes con ELF.

Tabla 16. Correlaciones entre conteo neuronal y la unión al receptor A1 del tejido cortical de pacientes con ELF

		Unión de A1								
		I-II			III-IV			V-VI		
		r	r ²	p	r	r ²	p	r	r ²	p
Conteo neuronal	I-II	0.512	0.263	0.017*						
	III-IV				0.206	0.042	0.369			
	V-VI							-0.375	0.14	0.093

Los valores representan los coeficientes de correlación de Spearman. IPM: Intervalo post-mortem.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

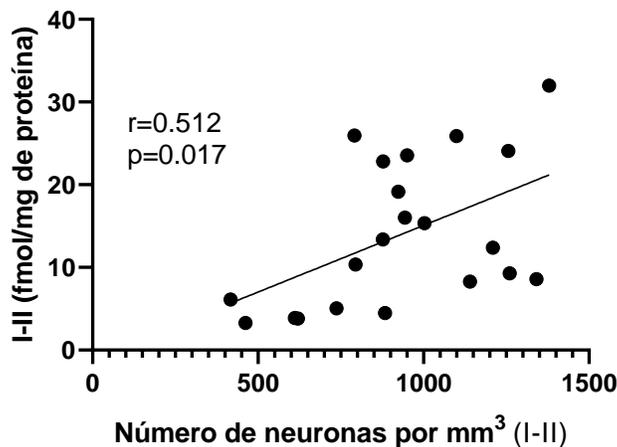


Figura 22. Representación de la correlación significativa entre la unión al receptor A1 y la densidad neuronal en las capas I-II de pacientes con ELF

6.2.3.1 Conclusiones de la evaluación de la densidad neuronal en corteza frontal de pacientes con ELF y su correlación con variables clínicas

- La ELF, sin importar la etiología, se asocia a la disminución de la densidad neuronal en tejido cortical.
- Los factores clínicos (edad del sujeto, edad de inicio de la epilepsia, duración de la enfermedad y frecuencia de crisis epilépticas) no influyen en la disminución de la densidad neuronal.

6.2.3.2 Conclusiones de la evaluación de la unión al receptor A2A en corteza frontal de pacientes con ELF y su correlación con variables clínicas

- La unión al receptor es similar al tejido de las autopsias, a pesar de la disminución de la población neuronal.
- Es necesario determinar si esta condición se debe al aumento a nivel neuronal de la afinidad o número de receptores, o aumento de la expresión de este receptor en otro tipo de células.
- Ni la población neuronal ni los factores clínicos (edad del sujeto, edad de inicio de la epilepsia, duración de la enfermedad y frecuencia de crisis epilépticas) influyen en la unión al receptor.

6.2.3.3 Conclusiones de la evaluación de la unión al receptor A1 en corteza frontal de pacientes con ELF y su correlación con variables clínicas

- La ELF se asocia a la disminución de la unión al receptor.
- Entre los pacientes con ELF, los de mayor edad presentan mayor unión en las capas superficiales e intermedias, en comparación con los pacientes jóvenes.
- Independientemente del decremento de la población neuronal en las capas corticales profundas, existe mayor unión en los pacientes que iniciaron la ELF en etapas tempranas de la vida y con mayor duración de la enfermedad. Estos valores alcanzan aquellos presentados en las autopsias.

6.3 Discusión general

Los resultados indican que la densidad neuronal y la unión al receptor A1, pero no la unión al receptor A2A, disminuyen con la edad en las capas superficiales e intermedias en tejido cortical frontal obtenido de sujetos de autopsias. En los sujetos con ELF se observó esta correlación entre la edad y la unión al receptor A1, pero no con la densidad neuronal o la unión al receptor A2A. En la corteza de los pacientes con ELF encontramos una reducción de la densidad neuronal y la unión al receptor A1, mientras que la unión a los receptores A2A fue similar al grupo de autopsias. Estos resultados se mantuvieron independientemente de la etiología de la ELF

Se sabe que los procesos enzimáticos que ocurren después de la muerte pueden afectar la expresión de proteínas y sus funciones. En el presente estudio, los valores obtenidos de las autopsias (densidad neuronal, unión al receptor A1 y A2A) no correlacionaron con el IPM. Lo anterior demuestra que bajo nuestras condiciones experimentales y en el rango del IPM utilizado (10-20 h), la densidad neuronal, así como la unión a los receptores A1 y A2A no fueron afectados por los cambios que suceden inmediatamente después de la muerte. Nuestros hallazgos coinciden con ensayos postmortem realizados en tejido cerebral humano que han demostrado que el almacenamiento y manipulación del tejido bajo condiciones adecuadas preserva la cuantificación/concentración de diversos neuromedidores (μ , 5-HT_{1A}, GABA_B, canabinoides) y RNAm (MOR) a IPM similares a los utilizados en el presente estudio (Cuellar-Herrera *et al.*, 2012; Hynd *et al.*, 2003). Con base

en estos hallazgos es posible considerar a los valores de conteo neuronal y unión a los receptores de adenosina de las autopsias como un valor de referencia control/comparativo para el presente estudio.

Los valores de la densidad neuronal en autopsias obtenidos de nuestros experimentos son similares a los previamente reportados en corteza temporal de sujetos sin enfermedades neurológicas (Rocha *et al.*, 2007), y disminuye a mayor edad. Este hallazgo está de acuerdo a los reportados por otros autores en sujetos libres de enfermedades neurológicas (Garey 2010; Stark *et al.*, 2007) y confirma que en condiciones normales, a mayor edad existe un decremento en la población neuronal.

También encontramos que, a mayor edad, la unión al receptor A1 es menor. Este resultado apoya a lo reportado en ensayos *in vivo* y *por autorradiografía in vitro* obtenidos por otros autores (Fastbom *et al.*, 1987; Meyer *et al.*, 2007; Mishina *et al.*, 2017). Debido a que el receptor A1 se expresa a nivel neuronal, el decremento de su unión con la edad podría deberse al decremento de este tipo celular que se presenta conforme avanza la edad. A pesar de que la cuenta neuronal y la unión al receptor A1 disminuyen con la edad, nuestros resultados no revelaron una correlación significativa entre ambos parámetros de las autopsias. Esto podría deberse al tamaño de muestra incluida en el estudio no fue suficiente para obtener una correlación significativa. Por otra parte, existen evidencias indicando que la disminución del receptor A1 con la edad no se correlaciona con la población neuronal en modelos murinos (Economou, Pagonopoulou, y Angelatou, 2000). Es posible que la falta de correlación se deba a que la velocidad de la pérdida neuronal con la edad es menor a la velocidad de decremento de unión a A1. Se requieren estudios adicionales para confirmar esta hipótesis. Otra explicación puede deberse a cambios en la adenosina endógena. En modelos murinos se ha descrito que el decremento hipocampal de la expresión de receptores A1 con la edad se debe a un incremento de la adenosina endógena (Sperlágh *et al.*, 1997). El incremento de la adenosina endógena y disminución de la expresión del receptor A1 con la edad se han asociado al incremento de la expresión de la enzima ecto-5'nucleotidasa y el decremento de los transportadores de adenosina con el envejecimiento (Cunha, Almeida, y Ribeiro, 2001). También es posible que la unión del receptor A1 disminuya con la edad como consecuencia de un decremento

en la expresión de ARNm de dicho receptor como consecuencia de la disminución del factor de transcripción de la proteína 1 activadora que se une a la región promotora del gen A1 humano (Cheng *et al.*, 2000).

Por otro lado, encontramos que la unión al receptor A2A en la corteza frontal obtenido de autopsias no se modificó con la edad. Este hallazgo difiere del encontrado en hipocampo en humanos y modelos murinos (Temido-Ferreira *et al.*, 2020), sugiriendo que la unión al receptor A2A depende del área estudiada. A pesar del decremento en la población neuronal en los sujetos de mayor edad se obtuvieron estos resultados. Se sabe que el receptor A2A se expresa en neuronas, astrocitos (Patodia *et al.*, 2020) y células endoteliales (He *et al.*, 2020). También se sabe que la glía en la corteza cerebral no se modifica con la edad, a diferencia de la población neuronal (Peters, 2007; Peters y Kemper, 2012). Es posible que la ausencia de correlación de la unión del receptor A2A evaluada en el presente estudio se deba a que el receptor evaluado se expresa en la glía de la corteza frontal de las autopsias. Sin embargo, el ensayo utilizado en nuestro estudio no permite diferenciar el tipo celular.

En relación con la corteza de pacientes con ELF y en comparación con las autopsias, en el presente estudio encontramos un decremento de la densidad neuronal en las diferentes capas corticales evaluadas. Esta tendencia se mantuvo sin importar la etiología de la ELF. Este resultado se encuentra de acuerdo con estudios que indican un decremento en la población celular del neocortex de pacientes con ELF como consecuencia de un decremento de interneuronas gabaérgicas y neuronas multipolares (Ferrer *et al.*, 1994). Estos cambios se asocian a un decremento del volumen y adelgazamiento de la corteza frontal en pacientes con esta patología (Lundbom *et al.*, 2001).

Los hallazgos de nuestros experimentos de autorradiografía indican que la unión al receptor A1 se encuentra disminuida en todas las capas corticales de la corteza frontal de pacientes con ELF, sin importar la etiología. Estos cambios se correlacionaron con la población neuronal en las capas corticales superficiales (I-II). Debido a que el receptor A1 juega un papel inhibitor en la actividad neuronal (Schubert y Kreutzberg, 1993), la disminución en su unión podría conducir a una alta excitabilidad cortical y facilitar la actividad epiléptica. La disminución en la unión del receptor A1 encontrada en nuestros

experimentos concuerdan con el decremento de la unión de receptores A1 en tejido cortical de pacientes con ELT reportada previamente (Glass *et al.*, 1996).

Los sujetos con ELF no presentaron modificación en la unión a los receptores A2A. Además, esta tendencia se mantuvo independientemente de las diferentes etiologías. Estos resultados son similares con lo reportado en tejido cortical de pacientes con ELT en los que no se encontraron cambios de la expresión proteica de receptores A2A (Patodia *et al.*, 2020). Debido a que existe un decremento de la densidad neuronal, estos resultados nos indicaría que la unión al receptor A2A neuronal se encuentra aumentada en otro tipo de células como la glía (He *et al.*, 2020). Al respecto, existen evidencias experimentales que indican que la corteza cerebral con actividad epileptiforme de pacientes con epilepsia presenta un aumento de la gliosis (Vossler *et al.*, 2012). Es posible que la unión al receptor A2A evaluada en el presente estudio dependa de la glía y no de la población neuronal de la corteza con actividad epiléptica. Otra posibilidad es que exista un aumento en el número de receptores o su afinidad en las neuronas que sobreviven en la corteza cerebral de pacientes con ELF. Sin embargo, la estrategia experimental usada en el presente estudio no permite identificar cambios en número o afinidad de receptores. Se requieren estudios futuros de ensayos de unión en membranas en los que se evalúen estos parámetros.

La cuenta neuronal de la corteza frontal de los pacientes con ELF no mostró correlación significativa con las variables clínicas. Es posible que la larga duración de la epilepsia que presentaron los pacientes del presente estudio no permita identificar la influencia de los factores clínicos en la misma. También es probable que el daño neuronal dependa de la epilepsia *per se*. Al respecto, se sabe que como consecuencia de cada crisis epiléptica existe un exceso de liberación de glutamato (Rocha *et al.*, 1996), así como un aumento de los procesos de neurotoxicidad que favorecen el daño neuronal (Bourgeois, Dodson, y Ferrendelli, 1983; Taskiran y Ergul, 2021).

Los factores clínicos de los pacientes con ELF (edad del sujeto, edad de inicio de la epilepsia, duración de la enfermedad y frecuencia de crisis epilépticas) tampoco influyeron en la unión del receptor A2A. Estos datos podrían explicarse a que el largo proceso de la epilepsia que presentaron los pacientes del presente estudio no permita identificar la influencia de los factores clínicos. Por el contrario, esto difiere de estudios con tejido

cerebral de pacientes con ELT, en los que encuentran mayor expresión proteica en astrocitos en sujetos con mayor duración de la enfermedad (Patodia *et al.*, 2020). Estas diferencias pueden explicarse porque nuestro estudio evalúa unión, mientras que el de Patodia *et al.*, (2020) analiza expresión proteica del receptor.

Un hallazgo interesante fue que, a pesar del decremento de la unión del receptor A1 los pacientes con mayor edad o con mayor duración de la epilepsia presentaron en las capas corticales superficiales (I-II) e intermedias (III-IV) valores de la unión cercanos a los valores de las autopsias. Es posible que este sea un mecanismo por el cual, en sujetos de mayor edad, los receptores A1 en las capas superficiales e intermedias modulan la respuesta a las señales provenientes de áreas subcorticales y su propagación cortico-cortical. Estos cambios se podrían deber a que en sujetos con un largo proceso de la epilepsia existe una deficiencia de adenosina, y por ende una sensibilización del receptor (Angelatou *et al.*, 1993; Gouder, 2004) que representa un mecanismo compensatorio para controlar las descargas epilépticas. Por otro lado, las capas corticales profundas (V-VI) participan en la sincronización en la corteza y juegan un importante papel en la propagación de la actividad epiléptica (Chervin, Pierce, y Connors, 1988). Iniciados los eventos sincrónicos por neuronas de la capa V, estos se pueden propagar verticalmente a otras capas y horizontalmente (Chagnac-Amitai y Connors, 1989; Chervin *et al.*, 1988). La unión aumentada de A1 en las capas V-VI podría estar involucrada en mecanismos de inhibición de la propagación de la actividad epiléptica de la neocorteza a otras áreas cerebrales. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para apoyar esta hipótesis.

Es importante hacer notar que la realización del presente estudio proporciona información que permite el diseño de estrategias farmacológicas en el tratamiento de ELF. Debido a que la activación del receptor A1 presenta efectos neuroprotectores, inhibitorios y antiepilépticos, es posible sugerir el estimular la producción de adenosina local a bajas concentraciones en neocórtex (Liu *et al.*, 2019), lo cual permitiría la activación del receptor A1. Este efecto podría disminuir la exacerbada liberación de glutamato, así como sus consecuencias en funciones cognitivas y del estado de ánimo-asociadas a la ELF. Para el caso del receptor A2A, el uso de antagonistas selectivos permitiría el bloqueo (Mouro *et al.*, 2018) de su efecto excitador en pacientes con ELF. Otra alternativa sería utilizar

bloqueadores de la recaptura (transportadores) o inhibidores de enzimas que metabolizan adenosina (Corciulo *et al.*, 2017), con lo cual se lograría la presencia de este ligando en el espacio extracelular. También se ha estudiado la liberación continua en hipocampo de adenosina local controlada con el uso de un polímero (Szybala *et al.*, 2009), lo que puede controlar la generación de actividad convulsiva, sin embargo solo ha sido estudiado en modelos murinos. Los efectos de adenosina a nivel sistémico dependerían de encontrar agonistas que resistan la degradación y efectos periféricos.

Los hallazgos encontrados en este estudio, son similares a los descritos en patologías neurológicas (Liu *et al.*, 2019) que cursan con comorbilidades psiquiátricas, como el trastorno depresivo mayor y la ansiedad, y evidencian al sistema de adenosina y a los receptores A1 y A2A como un posible blanco terapéutico para el tratamiento en los pacientes con epilepsia del lóbulo frontal.

Es importante mencionar que los ensayos realizados en tejido cerebral humano están sujetos a una serie de limitaciones y variables fuera del control del investigador que pudieran modificar los resultados obtenidos. Dentro de las principales limitaciones de este estudio podemos mencionar:

- a) El tamaño de muestra del tejido de autopsia es reducido y el rango de edades es corto, esto no permitió evaluar los cambios descritos asociados a la edad.
- b) La dificultad que lleva la obtención de tejido cortical de pacientes con ELF limita el tamaño de la muestra analizada.
- c) Factores como sexo, comorbilidades psiquiátricas y el uso de fármacos antiepilépticos no fueron analizados.

6.4 Perspectivas

Los hallazgos descritos y las limitaciones señaladas previamente permiten proponer como perspectivas de este estudio las siguientes:

- Identificar si existe la participación de los receptores A1 y A2A como heterodímeros en tejido cortical de pacientes con ELF.

- Este estudio solo permite evaluar la unión a los receptores A1 y A2A. Por esto se propone analizar la capacidad de activación de los receptores (autorradiografía funcional) y las vías transduccionales en tejido frontal cortical de pacientes con ELF.
- Analizar los cambios epigenéticos de genes asociados al sistema de adenosina en tejido de pacientes con ELF.
- Analizar el posible efecto de los fármacos antiepilépticos en los cambios descritos en los receptores de adenosina en tejido frontal cortical de pacientes con ELF.
- Analizar la relación en los cambios descritos en los receptores de adenosina y las comorbilidades psiquiátricas en tejido frontal cortical de pacientes con ELF.
- Desarrollar un modelo animal de ELF que permita identificar el curso temporal de los cambios observados en tejido humano.
- En un modelo animal, determinar la interacción entre la actividad epiléptica y la activación de vías de señalización en el sistema de adenosina en focos epilépticos frontales.

VI. Referencias

- Allain, Philippe. 2016. "Le Vieillessement Normal Des Fonctions Normal Aging of Frontal Lobe Functions." *c*(1):77–85.
- Ambrósio, António F., João O. Malva, Arsélio P. Carvalho, and Caetana M. Carvalho. 1997. "Inhibition of N-, P/Q- and Other Types of Ca²⁺ Channels in Rat Hippocampal Nerve Terminals by the Adenosine A1 Receptor." *European Journal of Pharmacology* 340(2–3):301–10.
- Angelatou, Fevronia, Olga Pagonopoulou, Theodor Maraziotis, Andre Olivier, Jean Guy Villemeure, Massimo Avoli, and George Kostopoulos. 1993. "Upregulation of A1 Adenosine Receptors in Human Temporal Lobe Epilepsy: A Quantitative Autoradiographic Study." *Neuroscience Letters* 163(1):11–14.
- Barros-Barbosa, Aurora R., Fátima Ferreirinha, Ângela Oliveira, Marina Mendes, M. Graça Lobo, Agostinho Santos, Rui Rangel, Julie Pelletier, Jean Sévigny, J. Miguel Cordeiro, and Paulo Correia-de-Sá. 2016. "Adenosine A2A Receptor and Ecto-5'-Nucleotidase/CD73 Are Upregulated in Hippocampal Astrocytes of Human Patients with Mesial Temporal Lobe Epilepsy (MTLE)." *Purinergic Signalling* 12(4):719–34.
- Belardinelli, L., and G. Isenberg. 1983. "Isolated Atrial Myocytes: Adenosine and Acetylcholine Increase Potassium Conductance." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 13(5):1–4.
- Beleza, Pedro, and João Pinho. 2011. "Frontal Lobe Epilepsy." *Journal of Clinical Neuroscience* 18(5):593–600.
- van den Berg, Lydia, Al de Weerd, Marieke Reuvekamp, Eveline Hagebeuk, and Jaap van der Meere. 2018. "Executive and Behavioral Functioning in Pediatric Frontal Lobe Epilepsy." *Epilepsy & Behavior* 87:117–22.
- Borea, Pier Andrea, Stefania Gessi, Stefania Merighi, and Katia Varani. 2016. "Adenosine as a Multi-

Signalling Guardian Angel in Human Diseases: When, Where and How Does It Exert Its Protective Effects?" *Trends in Pharmacological Sciences* 37(6):419–34.

- Borea, Pier Andrea, Stefania Gessi, Stefania Merighi, Fabrizio Vincenzi, and Katia Varani. 2018. "Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art." *Physiological Reviews* 98(3):1591–1625.
- Bourgeois, B. F. D., W. E. Dodson, and J. A. Ferrendelli. 1983. "Primidone, Phenobarbitai and PEMA: II. Seizure Protection, Neurotoxicity, and Therapeutic Index of Varying Combinations in Mice." *Neurology* 33(3):291–291.
- Calso, Cristina, J r my Besnard, and Philippe Allain. 2019. "Frontal Lobe Functions in Normal Aging : Metacognition , Autonomy , and Quality of Life Frontal Lobe Functions in Normal Aging : Metacognition , Autonomy , and Quality of Life." *Experimental Aging Research* 00(00):1–18.
- Carr , David A., Claire H. Mitchell, Peterson Yantorno Kim, Miguel Coca-Prados, and Mortimer M. Civan. 2000. "Similarity of A3-Adenosine and Swelling-Activated Cl- Channels in Nonpigmented Ciliary Epithelial Cells." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 279(2 48-2):440–51.
- Chen, Yu, Ross Corriden, Yoshiaki Inoue, Linda Yip, Naoyuki Hashiguchi, Annelies Zinkernagel, Victor Nizet, Paul A. Insel, and Wolfgang G. Junger. 2006. "ATP Release Guides Neutrophil Chemotaxis via P2Y2 and A3 Receptors." *Science* 314(5806):1792–95.
- Chen, Zhicheng, Jocelyn Stockwell, and Francisco S. Cayabyab. 2016. "Adenosine A1 Receptor-Mediated Endocytosis of AMPA Receptors Contributes to Impairments in Long-Term Potentiation (LTP) in the Middle-Aged Rat Hippocampus." *Neurochemical Research* 41(5):1085–97.
- Chen, Zhicheng, Cherry Xiong, Cassandra Pancyr, Jocelyn Stockwell, Wolfgang Walz, and Francisco S. Cayabyab. 2014. "Prolonged Adenosine A1 Receptor Activation in Hypoxia and Pial Vessel Disruption Focal Cortical Ischemia Facilitates Clathrin-Mediated AMPA Receptor Endocytosis and Long- Lasting Synaptic Inhibition in Rat Hippocampal CA3-CA1 Synapses: Differential Regula." *Journal of Neuroscience* 34(29):9621–43.
- Cheng, Juei Tang, I. Min Liu, Shioh Wen Juang, and Shuo Bin Jou. 2000. "Decrease of Adenosine A-1 Receptor Gene Expression in Cerebral Cortex of Aged Rats." *Neuroscience Letters* 283(3):227–29.
- Chervin, R. D., P. A. Pierce, and B. W. Connors. 1988. "Periodicity and Directionality in the Propagation of Epileptiform Discharges across Neocortex." *Journal of Neurophysiology* 60(5):1695–1713.
- Ciruela, Francisco, Vicent Casad , Ricardo J. Rodrigues, Rafael Luján, Javier Burgue o, Meritxell Canals, Janusz Borycz, Nelson Rebola, Steven R. Goldberg, Josefa Mallol, Antonio Cort s, Enric I. Canela, Juan F. López-Giménez, Graeme Milligan, Carme Llu s, Rodrigo A. Cunha, Sergi Ferré, and Rafael Franco. 2006. "Presynaptic Control of Striatal Glutamatergic Neurotransmission by Adenosine A1-A2A Receptor Heteromers." *Journal of Neuroscience* 26(7):2080–87.
- Coelho, Joana E., Pedro Alves, Paula M. Canas, Jorge S. Valadas, Tatiana Shmidt, V rnia L. Batalha, Diana G. Ferreira, Joaquim A. Ribeiro, Michael Bader, Rodrigo A. Cunha, Frederico Simões do Couto, and Luísa V. Lopes. 2014. "Overexpression of Adenosine A2A Receptors in Rats: Effects on Depression, Locomotion, and Anxiety." *Frontiers in Psychiatry* 5.
- Coney, A. M., and Janice M. Marshall. 1998. "Role of Adenosine and Its Receptors in the Vasodilatation Induced in the Cerebral Cortex of the Rat by Systemic Hypoxia." *Journal of Physiology* 509(2):507–18.
- Corciulo, Carmen, Martin Lendhey, Tuere Wilder, Hanna Schoen, Alexander Samuel Cornelissen, Gregory Chang, Oran D. Kennedy, and Bruce N. Cronstein. 2017. "Endogenous Adenosine Maintains Cartilage Homeostasis and Exogenous Adenosine Inhibits Osteoarthritis Progression." *Nature Communications* 8(1):15019.
- Coyle, J. T., and Candace B. Pert. 1976. "Ontogenetic Development of [3H]Naloxone Binding in Rat Brain." *Neuropharmacology* 15(9):555–60.

- Coyle, Joseph T., and Henry I. Yamamura. 1976. "Neurochemical Aspects of the Ontogenesis of Cholinergic Neurons in the Rat Brain." *Brain Research* 118(3):429–40.
- Cuellar-Herrera, Manola, Ana Luisa Velasco, Francisco Velasco, Laura Chavez, Sandra Orozco-Suarez, Guliz Armagan, Ezgi Turunc, Engin Bojnik, Ayfer Yalcin, Sandor Benyhe, Anna Borsodi, Mario Alonso-Vanegas, and Luisa Rocha. 2012. "Mu Opioid Receptor mRNA Expression, Binding, and Functional Coupling to G-Proteins in Human Epileptic Hippocampus." *Hippocampus* 22(2):122–27.
- Cunha, Rodrigo A. 2005. "Neuroprotection by Adenosine in the Brain: From A1 Receptor Activation to A2A Receptor Blockade." *Purinergic Signalling* 1(2):111–34.
- Cunha, Rodrigo A. 2016. "How Does Adenosine Control Neuronal Dysfunction and Neurodegeneration?" *Journal of Neurochemistry* 139(6):1019–55.
- Cunha, Rodrigo A., Teresa Almeida, and J. A. Ribeiro. 2001. "Parallel Modification of Adenosine Extracellular Metabolism and Modulatory Action in the Hippocampus of Aged Rats." *Journal of Neurochemistry* 76(2):372–82.
- Cunha, Rodrigo A., M. Dolores Constantino, Ana M. Sebastião, and J. Alexandre Ribeiro. 1995. "Modification of A₁ and A_{2a} Adenosine Receptor Binding in Aged Striatum, Hippocampus and Cortex of the Rat." *NeuroReport* 6(11):1583.
- Deussen, Andreas, Markus Brand, Annette Pexa, and Johannes Weichsel. 2006. "Metabolic Coronary Flow Regulation - Current Concepts." *Basic Research in Cardiology* 101(6):453–64.
- Diehl, B., S. Sisodiya, and M. Manford. 2017. "EPILEPSY 2017: From Bench to Bedside." Oxford, UK.
- Dolphin, B. Y. A. C., S. R. Forda, and R. H. Scott. 1872. "Calcium-Dependent Currents in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Neurones Are Inhibited by an Adenosine Analogue." *The Lancet* 100(2562):506.
- Duncker, Dirk J., Noëmi S. Van Zon, Todd J. Pavsek, Sara K. Herrlinger, and Robert J. Bache. 1995. "Endogenous Adenosine Mediates Coronary Vasodilation during Exercise after K⁺ATP Channel Blockade." *Journal of Clinical Investigation* 95(1):285–95.
- Dunwiddie, T. V., and B. B. Fredholm. 1989. "Adenosine A₁ Receptors Inhibit Adenylate Cyclase Activity and Neurotransmitter Release and Hyperpolarize Pyramidal Neurons in Rat Hippocampus." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 249(1):31–37.
- Ekonomou, Antigoni, Olga Pagonopoulou, and Fevronia Angelatou. 2000. "Age-Dependent Changes in Adenosine A₁ Receptor and Uptake Site Binding in the Mouse Brain: An Autoradiographic Study." *Journal of Neuroscience Research* 60(2):257–65.
- Englert, Martin, Ursula Qwitterer, and Karl Norbert Klotz. 2002. "Effector Coupling of Stably Transfected Human A₃ Adenosine Receptors in CHO Cells." *Biochemical Pharmacology* 64(1):61–65.
- Fastbom, J., A. Pazos, A. Probst, and J. M. Palacios. 1987. "Adenosine A₁ Receptors in the Human Brain: A Quantitative Autoradiographic Study." *Neuroscience* 22(3):827–39.
- Feoktistov, Igor, Sergey Ryzhov, Hongyan Zhong, Anna E. Goldstein, Anton Matafonov, Dewan Zeng, and Italo Biaggioni. 2004. "Hypoxia Modulates Adenosine Receptors in Human Endothelial and Smooth Muscle Cells toward an A_{2B} Angiogenic Phenotype." *Hypertension* 44(5):649–54.
- Fernández-Espejo, E. 2006. *Neurobiología de La Adicción a Psicoestimulantes*.
- Ferré, Sergi, and Mary Claire O'Brien. 2011. "Alcohol and Caffeine: The Perfect Storm." *Journal of Caffeine Research* 1(3):153–62.
- Ferrer, I., B. Oliver, A. Russi, R. Casas, and R. Rivera. 1994. "Parvalbumin and Calbindin-D28k Immunocytochemistry in Human Neocortical Epileptic Foci." *Journal of the Neurological Sciences* 123(1–2):18–25.

- Fisher, Robert S., Walter Van Emde Boas, Warren Blume, Christian Elger, Pierre Genton, Phillip Lee, and Jerome Engel. 2005. "Response: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE) [4]." *Epilepsia* 46(10):1701–2.
- Fox, Irving H., and William N. Kelley. 1978. "Irving, H., Kelley, F., Kelley, W., Ann. The Role of Adenosine and 2'-Deoxyadenosine in Mammalian Cells. *Rev. Biochem.* 1978, 47, 655–686."
- Fredholm, Bertil B., Jiang Fan Chen, Susan A. Masino, and Jean Marie Vaugeois. 2005. "Actions of Adenosine at Its Receptors in the CNS: Insights from Knockouts and Drugs." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45(30):385–412.
- Fredholm, Bertil B., and Karin Lindström. 1999. "Autoradiographic Comparison of the Potency of Several Structurally Unrelated Adenosine Receptor Antagonists at Adenosine A1 and A(2A) Receptors." *European Journal of Pharmacology* 380(2–3):197–202.
- Freissmuth, M., E. Selzer, and W. Schutz. 1991. "Interactions of Purified Bovine Brain A1-Adenosine Receptors with G-Proteins. Reciprocal Modulation of Agonist and Antagonist Binding." *Biochemical Journal* 275(3):651–56.
- Freund, Sebastian, Martin Ungerer, and Martin J. Lohse. 1994. "A1 Adenosine Receptors Expressed in CHO-Cells Couple to Adenylyl Cyclase and to Phospholipase C." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 350(1):49–56.
- Garey, Laurence. 2010. "When Cortical Development Goes Wrong: Schizophrenia as a Neurodevelopmental Disease of Microcircuits." *Journal of Anatomy* 217(4):324–33.
- Giménez-Llort, Lydia, Alberto Fernández-Teruel, Rosa Maria Escorihuela, Bertil B. Fredholm, Adolf Tobeña, Milos Pekny, and Björn Johansson. 2002. "Mice Lacking the Adenosine A1 Receptor Are Anxious and Aggressive, but Are Normal Learners with Reduced Muscle Strength and Survival Rate." *European Journal of Neuroscience* 16(3):547–50.
- Gittins, Rebecca, and Paul J. Harrison. 2004. "Neuronal Density, Size and Shape in the Human Anterior Cingulate Cortex: A Comparison of Nissl and NeuN Staining." *Brain Research Bulletin* 63(2):155–60.
- Glass, M., R. L. M. Faull, J. Y. Bullock, K. Jansen, E. W. Mee, E. B. Walker, B. J. L. Synek, and M. Dragunow. 1996. "Loss of A1 Adenosine Receptors in Human Temporal Lobe Epilepsy." *Brain Research* 710(1–2):56–68.
- Gomes, Catarina V., Manuella P. Kaster, Angelo R. Tomé, Paula M. Agostinho, and Rodrigo A. Cunha. 2011. "Adenosine Receptors and Brain Diseases: Neuroprotection and Neurodegeneration." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808(5):1380–99.
- Gotoh, Leo, Noriko Kawanami, Tatsuo Nakahara, Hisao Hondo, and Keisuke Motomura. 2002. "Effects of the Adenosine A 1 Receptor Agonist N 6 -Cyclopentyladenosine on Phencyclidine-Induced Behavior and Expression of the Immediate- Early Genes in the Discrete Brain Regions of Rats." 100:1–12.
- Gouder, N. 2004. "Overexpression of Adenosine Kinase in Epileptic Hippocampus Contributes to Epileptogenesis." *Journal of Neuroscience* 24(3):692–701.
- Harada, Caroline N., Marissa C. Natelson Love, and Kristen L. Triebel. 2013. "Normal Cognitive Aging." *Clinics in Geriatric Medicine* 29(4):737–52.
- Haskó, György, Joel Linden, Bruce Cronstein, and Pál Pacher. 2008. "Adenosine Receptors: Therapeutic Aspects for Inflammatory and Immune Diseases." *Nature Reviews Drug Discovery* 7(9):759–70.
- He, Xinghui, Fan Chen, Yifan Zhang, Qing Gao, Yuguang Guan, Jing Wang, Jian Zhou, Feng Zhai, Detlev Boison, Guoming Luan, and Tianfu Li. 2020. "Upregulation of Adenosine A2A Receptor and Downregulation of GLT1 Is Associated with Neuronal Cell Death in Rasmussen's Encephalitis." *Brain Pathology* 30(2):246–60.
- Henri-Bhargava, Alexandre, Donald T. Stuss, and Morris Freedman. 2018. "Clinical Assessment of Prefrontal

- Lobe Functions." *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology* 24(3, BEHAVIORAL NEUROLOGY AND PSYCHIATRY):704–26.
- Hettinger, Barbara D., Amy Lee, Joel Linden, and Diane L. Rosin. 2001. "Ultrastructural Localization of Adenosine A2A Receptors Suggests Multiple Cellular Sites for Modulation of GABAergic Neurons in Rat Striatum." *Journal of Comparative Neurology* 431(3):331–46.
- Heurteaux, Catherine, Inger Lauritzen, Catherine Widmann, and Michel Lazdunski. 1995. "Essential Role of Adenosine, Adenosine A1 Receptors, and ATP-Sensitive K⁺ Channels in Cerebral Ischemic Preconditioning." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(10):4666–70.
- Hynd, Matthew R., Joanne M. Lewohl, Heather L. Scott, and Peter R. Dodd. 2003. "Biochemical and Molecular Studies Using Human Autopsy Brain Tissue." *Journal of Neurochemistry* 85(3):543–62.
- Jarvis, Michael F., and Michael Williams. 1989. "Direct Autoradiographic Localization of Adenosine A2 Receptors in the Rat Brain Using the A2-Selective Agonist, [3H]CGS 21680." *European Journal of Pharmacology* 168(2):243–46.
- Jockers, R., M. E. Linder, M. Hohenegger, C. Nanoff, B. Bertin, A. D. Strosberg, S. Marullo, and M. Freissmuth. 1994. "Species Difference in the G Protein Selectivity of the Human and Bovine A1-Adenosine Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 269(51):32077–84.
- Johnston, James B., Claudia Silva, Guido Gonzalez, Janet Holden, Kenneth G. Warren, Luanne M. Metz, and Christopher Power. 2001. "Diminished Adenosine A1 Receptor Expression on Macrophages in Brain and Blood of Patients with Multiple Sclerosis." (April):650–58.
- Kalaria, R. N., S. Sromek, B. J. Wilcox, and J. R. Unnerstall. 1990. "Hippocampal Adenosine A1 Receptors Are Decreased in Alzheimer's Disease." *Neuroscience Letters* 118(2):257–60.
- Kashfi, Shirin, Kamran Ghaedi, Hossein Baharvand, Mohammad Hossein Nasr-Esfahani, and Mohammad Javan. 2017. "A1 Adenosine Receptor Activation Modulates Central Nervous System Development and Repair." *Molecular Neurobiology* 54(10):8128–39.
- Krügel, Ute. 2016. "Purinergic Receptors in Psychiatric Disorders." *Neuropharmacology* 104:212–25.
- Kuhar, Michael J. 2001. "In Vitro Autoradiography." *Current Protocols in Pharmacology* 1–9.
- Kull, B., P. Svenningsson, and B. B. Fredholm. 2000. "Adenosine A(2A) Receptors Are Colocalized with and Activate G(Olf) in Rat Striatum." *Molecular Pharmacology* 58(4):771–77.
- Kutzbach, Carl, and E. L. R. Stokstad. 1967. "Feedback Inhibition of Methylene-Tetrahydrofolate Reductase in Rat Liver by S-Adenosylmethionine." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 139(1):217–20.
- Latek, D. 2015. "G Protein-Coupled Receptors — Recent Advances Dorota." *NIH Public Access* 59(4):515–29.
- Latini, Serena, Marta Pazzagli, Giancarlo Pepeu, and Felicita Pedata. 1996. "A2 Adenosine Receptors: Their Presence and Neuromodulatory Role in the Central Nervous System." *General Pharmacology* 27(6):925–33.
- Linden, J. 2001. "Molecular Approach to Adenosine Receptors: Receptor-Mediated Mechanisms of Tissue Protection." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41(1):775–87.
- Linden, Joel, Tami Thai, Heidi Figler, Xiaowei Jin, and Anna S. Robeva. 1999. "Characterization of Human A(2B) Adenosine Receptors: Radioligand Binding, Western Blotting, and Coupling to G(q) in Human Embryonic Kidney 293 Cells and HMC-1 Mast Cells." *Molecular Pharmacology* 56(4):705–13.
- Lindström, Karin, Ennio Ongini, and Bertil B. Fredholm. 1996. "The Selective Adenosine A(2A) Receptor Antagonist SCH 58261 Discriminates between Two Different Binding Sites for [3H]-CGS 21680 in the

- Rat Brain." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 354(4):539–41.
- Liu, Ying-Jiao, Jiao Chen, Xun Li, Xin Zhou, Yao-Mei Hu, Shi-Feng Chu, Ye Peng, and Nai-Hong Chen. 2019. "Research Progress on Adenosine in Central Nervous System Diseases." *CNS Neuroscience & Therapeutics* 25(9):899–910.
- Von Lubitz, D. K., R. C. Lin, N. Bischofberger, M. Beenhakker, M. Boyd, R. Lipartowska, and K. A. Jacobson. 1999. "Protection against Ischemic Damage by Adenosine Amine Congener, a Potent and Selective Adenosine A1 Receptor Agonist." *European Journal of Pharmacology* 369(3):313–17.
- Lundbom, N., E. Gaily, K. Vuori, R. Paetau, E. Liukkonen, J. C. Rajapakse, L. Valanne, A-M. Häkkinen, and M-L. Granström. 2001. "Proton Spectroscopic Imaging Shows Abnormalities in Glial and Neuronal Cell Pools in Frontal Lobe Epilepsy." *Epilepsia* 42(12):1507–14.
- Marangos, P. J., J. Patel, and J. Stivers. 1982. "Ontogeny of Adenosine Binding Sites in Rat Forebrain and Cerebellum." *Journal of Neurochemistry* 39(1):267–70.
- Meerlo, Peter, Viktor Roman, Eszter Farkas, Jan N. Keijser, Csaba Nyakas, and Paul G. M. Luiten. 2004. "Ageing-Related Decline in Adenosine A1 Receptor Binding in the Rat Brain: An Autoradiographic Study." *Journal of Neuroscience Research* 78(5):742–48.
- Meyer, Philipp T., David Elmenhorst, Christian Boy, Oliver Winz, Andreas Matusch, Karl Zilles, and Andreas Bauer. 2007. "Effect of Aging on Cerebral A1 Adenosine Receptors: A [18F]CPFPX PET Study in Humans." *Neurobiology of Aging* 28(12):1914–24.
- Mishina, Masahiro, Yuichi Kimura, Mika Naganawa, Kenji Ishii, Keiichi Oda, Muneyuki Sakata, Jun Toyohara, Shiro Kobayashi, Yasuo Katayama, and Kiichi Ishiwata. 2012. "Differential Effects of Age on Human Striatal Adenosine A1 and A2A Receptors." *Synapse* 66(9):832–39.
- Mishina, Masahiro, Yuichi Kimura, Muneyuki Sakata, Kenji Ishii, Keiichi Oda, Jun Toyohara, Kazumi Kimura, and Kiichi Ishiwata. 2017. "Age-Related Decrease in Male Extra-Striatal Adenosine A1 Receptors Measured Using 11C-MPDX PET." *Frontiers in Pharmacology* 8(DEC):1–7.
- Mogul, David J., Michael E. Adams, and Aaron P. Fox. 1993. "Differential Activation of Adenosine Receptors Decreases N-Type but Potentiates P-Type Ca²⁺ Current in Hippocampal CA3 Neurons." *Neuron* 10(2):327–34.
- Mouro, Francisco M., Diogo M. Rombo, Raquel B. Dias, Joaquim A. Ribeiro, and Ana M. Sebastião. 2018. "Adenosine A2A Receptors Facilitate Synaptic NMDA Currents in CA1 Pyramidal Neurons." *British Journal of Pharmacology* 175(23):4386–97.
- Nabbi-Schroeter, Danje, David Elmenhorst, Angela Oskamp, Stefanie Laskowski, Andreas Bauer, and Tina Kroll. 2018. "Effects of Long-Term Caffeine Consumption on the Adenosine A1 Receptor in the Rat Brain: An In Vivo PET Study with [18F]CPFPX." *Molecular Imaging and Biology* 20(2):284–91.
- Ngai, Al C., Ellicia F. Coyne, Joseph R. Meno, G. Alexander West, and H. Richard Winn. 2001. "Receptor Subtypes Mediating Adenosine-Induced Dilation of Cerebral Arterioles." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 280(5 49-5):2329–35.
- Nieuwenhuys, Rudolf. 2008. *The Human Central Nervous System. A Synopsis and Atlas*.
- O'Donovan, Sinead Marie, Courtney Sullivan, Rachael Koene, Emily Devine, Kathryn Hasselfeld, Cassidy Lynn Moody, and Robert Erne McCullumsmith. 2018a. "Cell-Subtype-Specific Changes in Adenosine Pathways in Schizophrenia." *Neuropsychopharmacology* 43(8):1667–74.
- O'Donovan, Sinead Marie, Courtney Sullivan, Rachael Koene, Emily Devine, Kathryn Hasselfeld, Cassidy Lynn Moody, and Robert Erne McCullumsmith. 2018b. "Cell-Subtype-Specific Changes in Adenosine Pathways in Schizophrenia." *Neuropsychopharmacology* 43(8):1667–74.
- O'Muircheartaigh, Jonathan, and Mark P. Richardson. 2012. "Epilepsy and the Frontal Lobes." *Cortex* 48(2):144–55.

- Ohno, Masuo, and Shigenori Watanabe. 1996. "Working Memory Failure by Stimulation of Hippocampal Adenosine A1 Receptors in Rats." *NeuroReport* 7(18):3013–16.
- Olah, Mark E. 1997. "Identification of A 2a Adenosine Receptor Domains Involved in Selective Coupling to G S." *Journal of Biological Chemistry* 272(1):337–44.
- Orr, Anna G., Edward C. Hsiao, Max M. Wang, Kaitlyn Ho, Daniel H. Kim, Weikun Guo, Jing Kang, Gui-qiu Yu, Anthony Adame, Nino Devidze, B. Dena, Eliezer Masliah, Bruce R. Conklin, and Lennart Mucke. 2015. "Astrocytic Adenosine Receptor A2A and Gs-Coupled Signaling Regulate Memory." *Nature Neuroscience* 18(3):423–34.
- Ortega-escobar, Joaquín, and Miguel Ángel Alcázar-córcoles. 2016. "Anuario de Psicología Jurídica 2016." *Anuario de Psicología Jurídica* 26(1):60–69.
- Palmer, Timothy M., Thomas W. Gettys, and Gary L. Stiles. 1995. "Differential Interaction with and Regulation of Multiple G-Proteins by the Rat A 3 Adenosine Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 270(28):16895–902.
- Pardo, José V., Ian Creese, David R. Burt, and Solomon H. Snyder. 1977. "Ontogenesis of Dopamine Receptor Binding in the Corpus Striatum of the Rat." *Brain Research* 125(2):376–82.
- Patodia, Smriti, Beatrice Paradiso, Maria Garcia, Matthew Ellis, Beate Diehl, Maria Thom, and Orrin Devinsky. 2020. "Adenosine Kinase and Adenosine Receptors A1R and A2AR in Temporal Lobe Epilepsy and Hippocampal Sclerosis and Association with Risk Factors for SUDEP." *Epilepsia* 61(4):787–97.
- Penfield, Wilder, and Edwin Boldrey. 1937. "Somatic Motor and Sensory Representation in Man." *Brain* 389–443.
- Pereira, Grace Schenatto, Janine Inez Rossato, João José Freitas Sarkis, Martín Cammarota, Carla Denise Bonan, and Iván Izquierdo. 2005. "Activation of Adenosine Receptors in the Posterior Cingulate Cortex Impairs Memory Retrieval in the Rat." *Neurobiology of Learning and Memory* 83(3):217–23.
- Peters, Alan. 2007. *The Effects of Normal Aging on Nerve Fibers and Neuroglia in the Central Nervous System*.
- Peters, Alan, and Thomas Kemper. 2012. "A Review of the Structural Alterations in the Cerebral Hemispheres of the Aging Rhesus Monkey." *Neurobiology of Aging* 33(10):2357–72.
- Pierce, Kerrie D., Timothy J. Furlong, Lisa A. Selbie, and John Shine. 1992. "Molecular Cloning and Expression of an Adenosine A2b Receptor from Human Brain." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 187(1):86–93.
- Pinna, Annalisa, Jadwiga Wardas, Gloria Cristalli, and Micaela Morelli. 1997. "Adenosine A(2A) Receptor Agonists Increase Fos-like Immunoreactivity in Mesolimbic Areas." *Brain Research* 759(1):41–49.
- Pizzi, Amanda M., Jessica S. Chapin, George E. Tesar, and Robyn M. Busch. 2009. "Comparison of Personality Traits in Patients with Frontal and Temporal Lobe Epilepsies." *Epilepsy and Behavior* 15(2):225–29.
- Prediger, Rui D. S., and Reinaldo N. Takahashi. 2005. "Modulation of Short-Term Social Memory in Rats by Adenosine A1 and A2A Receptors." *Neuroscience Letters* 376(3):160–65.
- Preti, Delia, Pier Giovanni Baraldi, Allan R. Moorman, Pier Andrea Borea, and Katia Varani. 2015. "History and Perspectives of A 2A Adenosine Receptor Antagonists as Potential Therapeutic Agents." *Medicinal Research Reviews* 35(4):790–848.
- Rebola, Nelson, Joana E. Coelho, Ana Rita Costenla, Luísa V. Lopes, António Parada, Catarina R. Oliveira, Patrício Soares-da-Silva, Alexandre De Mendonça, and Rodrigo A. Cunha. 2003. "Decrease of Adenosine A1 Receptor Density and of Adenosine Neuromodulation the Hippocampus of Kindled Rats." *European Journal of Neuroscience* 18(4):820–28.

- Ribeiro, J. A., A. M. Sebastião, and A. De Mendonça. 2002. "Adenosine Receptors in the Nervous System: Pathophysiological Implications." *Progress in Neurobiology*.
- Rivkees, Scott A. 1995. "The Ontogeny of Cardiac and Neural A1 Adenosine Receptor Expression in Rats." *Developmental Brain Research* 89(2):202–13.
- Rocha, L., M. Briones, R. F. Ackermann, B. Anton, N. T. Maidment, C. J. Evans, and J. Engel. 1996. "Pentylentetrazol-Induced Kindling: Early Involvement of Excitatory and Inhibitory Systems." *Epilepsy Research* 26(1):105–13.
- Rocha, Luisa, Lourdes Lorigados-Pedre, Sandra Orozco-Suárez, Lilia Morales-Chacón, Mario Alonso-Vanegas, Iván García-Maeso, Juana Villeda-Hernández, Laura Osorio-Rico, Bárbara Estupiñán, and Christian Quintana. 2007. "Autoradiography Reveals Selective Changes in Serotonin Binding in Neocortex of Patients with Temporal Lobe Epilepsy." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 31(6):1208–18.
- Rodrigues, Ricardo J., Tiago M. Alfaro, Nelson Rebola, Catalina R. Oliveira, and Rodrigo A. Cunha. 2005. "Co-Localization and Functional Interaction between Adenosine A2A and Metabotropic Group 5 Receptors in Glutamatergic Nerve Terminals of the Rat Striatum." *Journal of Neurochemistry* 92(3):433–41.
- Romagnoli, Romeo, Pier Giovanni Baraldi, Allan R. Moorman, Pier Andrea Borea, and Katia Varani. 2015. "Current Status of A 1 Adenosine Receptor Allosteric Enhancers." *Future Medicinal Chemistry* 7(10):1247–59.
- Ross, Ashley E., and B. Jill Venton. 2015. "Adenosine Transiently Modulates Stimulated Dopamine Release in the Caudate-Putamen via A1 Receptors." *Journal of Neurochemistry* 132(1):51–60.
- Ryzhov, Sergey, Rinat Zaynagetdinov, Anna E. Goldstein, Sergey V. Novitskiy, Mikhail M. Dikov, Michael R. Blackburn, Italo Biaggioni, and Igor Feoktistov. 2008. "Effect of A 2B Adenosine Receptor Gene Ablation on Proinflammatory Adenosine Signaling in Mast Cells ." *The Journal of Immunology* 180(11):7212–20.
- Schubert, Peter, and G. W. Kreutzberg. 1993. "Cerebral Protection by Adenosine." Pp. 80–88 in *Mechanisms of Secondary Brain Damage*. Vienna: Springer Vienna.
- Schulte, Gunnar, and Bertil B. Fredholm. 2003. "Signalling from Adenosine Receptors to Mitogen-Activated Protein Kinases." *Cellular Signalling* 15(9):813–27.
- Seidler, Rachael D., Jessica A. Bernard, Taritonye B. Burutolu, Brett W. Fling, Mark T. Gordon, Joseph T. Gwin, Youngbin Kwak, and David B. Lipps. 2010. "Motor Control and Aging: Links to Age-Related Brain Structural, Functional, and Biochemical Effects." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 34(5):721–33.
- Sperlágh, B., G. Zsilla, M. Baranyi, A. Kékes-Szabó, and E. Sylvester Vizi. 1997. "Age-Dependent Changes of Presynaptic Neuromodulation via A1-Adenosine Receptors in Rat Hippocampal Slices." *International Journal of Developmental Neuroscience* 15(6):739–47.
- Stark, A. K., A. O. Petersen, J. Gardi, H. J. G. Gundersen, and B. Pakkenberg. 2007. "Spatial Distribution of Human Neocortical Neurons and Glial Cells According to Sex and Age Measured by the Saucer Method." *Journal of Neuroscience Methods* 164(1):19–26.
- Stockwell, Jocelyn, Zhicheng Chen, Mina Niazi, Siddarth Nosib, and Francisco S. Cayabyab. 2016. "Protein Phosphatase Role in Adenosine A1 Receptor-Induced AMPA Receptor Trafficking and Rat Hippocampal Neuronal Damage in Hypoxia/Reperfusion Injury." *Neuropharmacology* 102:254–65.
- Stockwell, Jocelyn, Elisabet Jakova, and Francisco S. Cayabyab. 2017. "Adenosine A1 and A2A Receptors in the Brain: Current Research and Their Role in Neurodegeneration." *Molecules* 22(4):1–18.
- Stuss, Donald T. 2008. "Rehabilitation of Frontal Lobe Dysfunction: A Working Framework." Pp. 3–18 in

Rehabilitation of Executive Disorders. Oxford University Press.

- Stuss, Donald T. 2011. "Functions of the Frontal Lobes: Relation to Executive Functions." *Journal of the International Neuropsychological Society* 17(05):759–65.
- Sun, Meng-Juan, Fang Liu, Ya-Fei Zhao, and Xiao-Ai Wu. 2020. "In Vivo Positron Emission Tomography Imaging of Adenosine A2A Receptors." *Frontiers in Pharmacology* 11.
- Svenningsson, Per, Håkan Hall, Göran Sedvall, and Bertil B. Fredholm. 1997. "Distribution of Adenosine Receptors in the Postmortem Human Brain: An Extended Autoradiographic Study." *Synapse* 27(4):322–35.
- Szybala, Cory, Eleanor M. Pritchard, Theresa A. Lusardi, Tianfu Li, Andrew Wiltz, David L. Kaplan, and Detlev Boison. 2009. "Antiepileptic Effects of Silk-Polymer Based Adenosine Release in Kindled Rats." *Experimental Neurology* 219(1):126–35.
- Taskiran, Ahmet Sevki, and Mustafa Ergul. 2021. "The Modulator Action of Thiamine against Pentylentetrazole-Induced Seizures, Apoptosis, Nitric Oxide, and Oxidative Stress in Rats and SH-SY5Y Neuronal Cell Line." *Chemico-Biological Interactions* 340:109447.
- Temido-Ferreira, Mariana, Diana G. Ferreira, Vânia L. Batalha, Inês Marques-Morgado, Joana E. Coelho, Pedro Pereira, Rui Gomes, Andreia Pinto, Sara Carvalho, Paula M. Canas, Laetitia Cuvelier, Valerie Buée-Scherrer, Emilie Faivre, Younis Baqi, Christa E. Müller, José Pimentel, Serge N. Schiffmann, Luc Buée, Michael Bader, Tiago F. Outeiro, David Blum, Rodrigo A. Cunha, Héléne Marie, Paula A. Pousinha, and Luísa V. Lopes. 2020. "Age-Related Shift in LTD Is Dependent on Neuronal Adenosine A2A Receptors Interplay with MGlur5 and NMDA Receptors." *Molecular Psychiatry* 25(8):1876–1900.
- Tracey, W. Ross, William Magee, Hiroko Masamune, Joseph J. Oleynek, and Roger J. Hill. 1998. "Selective Activation of Adenosine A3 Receptors with N6-(3-Chlorobenzyl)-5'-N-Methylcarboxamidoadenosine (CB-MECA) Provides Cardioprotection via K(ATP) Channel Activation." *Cardiovascular Research* 40(1):138–45.
- Trussell, L. O., and M. B. Jackson. 1985. "Adenosine-Activated Potassium Conductance in Cultured Striatal Neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(14):4857–61.
- Ulas, J., L. C. Brunner, L. Nguyen, and C. W. Cotman. 1993. "Reduced Density of Adenosine A1 Receptors and Preserved Coupling of Adenosine A1 Receptors to G Proteins in Alzheimer Hippocampus: A Quantitative Autoradiographic Study." *Neuroscience* 52(4):843–54.
- Vallon, V., K. Richter, D. Y. Huang, T. Rieg, and J. Schnermann. 2004. "Functional Consequences at the Single-Nephron Level of the Lack of Adenosine A1 Receptors and Tubuloglomerular Feedback in Mice." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 448(2):214–21.
- Verche, Emilio, Concepción San Luis, and Sergio Hernández. 2018. "Neuropsychology of Frontal Lobe Epilepsy in Children and Adults: Systematic Review and Meta-Analysis." *Epilepsy and Behavior* 88:15–20.
- Vossler, David G., Steven W. Rostad, Alan M. Haltiner, Bradley Davis, Timothy W. Powell, Anthony J. Bell, and Diana L. Kraemer. 2012. "Increased Ictal Discharge Frequency and Neocortex Gliosis in Lateral Temporal Lobe Epilepsy." *Journal of Clinical Neurophysiology* 29(5):449–57.
- Waxman. 2011. *Neuroanatomía Clínica*. 26a edición. Mc Graw Hill Lange.
- Weltha, Landen, Jesica Reemmer, and Detlev Boison. 2019. "The Role of Adenosine in Epilepsy." *Brain Research Bulletin* 151(August 2018):46–54.
- West, M. J., L. Slomianka, and H. J. G. Gundersen. 1991. "Unbiased Stereological Estimation of the Total Number of Neurons in the Subdivisions of the Rat Hippocampus Using the Optical Fractionator." *The Anatomical Record* 231(4):482–97.

- West, Mark J. 1993. "New Stereological Methods for Counting Neurons." *Neurobiology of Aging* 14(4):275–85.
- Wilson, Mustafa &. 2009. *Adenosine Receptors in Health and Disease*. Vol. 193. edited by C. N. Wilson and S. J. Mustafa. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Yakel, J. L., R. A. Warren, S. M. Reppert, and R. A. North. 1993. "Functional Expression of Adenosine A2b Receptor in *Xenopus* Oocytes." *Molecular Pharmacology* 43(2):277–80.
- Yamada, Koji, Minoru Kobayashi, and Tomoyuki Kanda. 2014. "Involvement of Adenosine A2A Receptors in Depression and Anxiety." Pp. 373–93 in.
- Yamada, Koji, Minoru Kobayashi, Shizuo Shiozaki, Teruko Ohta, Akihisa Mori, Peter Jenner, and Tomoyuki Kanda. 2014. "Antidepressant Activity of the Adenosine A2A Receptor Antagonist, Istradefylline (KW-6002) on Learned Helplessness in Rats." *Psychopharmacology* 231(14):2839–49.
- Zannikos, P. N., S. Rohatagi, and B. K. Jensen. 2001. "Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of the Antilipolytic Effects of an Adenosine Receptor Agonist in Healthy Volunteers." *Journal of Clinical Pharmacology* 41(1):61–69.
- Zanto, Theodore P., and Adam Gazzaley. 2019. *Aging of the Frontal Lobe*. Vol. 163. 1st ed. Elsevier B.V.
- Zarek, Paul E., Ching Tai Huang, Eric R. Lutz, Jeanne Kowalski, Maureen R. Horton, Joel Linden, Charles G. Drake, and Jonathan D. Powell. 2008. "A2A Receptor Signaling Promotes Peripheral Tolerance by Inducing T-Cell Anergy and the Generation of Adaptive Regulatory T Cells." *Blood* 111(1):251–59.
- Zhang, C., T. W. Hein, and L. Kuo. 2000. "Transmural Difference in Coronary Arteriolar Dilation to Adenosine: Effect of Luminal Pressure and K(ATP) Channels." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 279(6 48-6):2612–19.
- Zhang, Jie, Chadi G. Abdallah, Junqing Wang, Xiaona Wan, Chunlian Liang, Liyun Jiang, Yuzhen Liu, Haixing Huang, Xiaohong Hong, Qingjun Huang, Renhua Wu, and Chongtao Xu. 2012. "Upregulation of Adenosine A2A Receptors Induced by Atypical Antipsychotics and Its Correlation with Sensory Gating in Schizophrenia Patients." *Psychiatry Research* 200(2–3):126–32.