

75



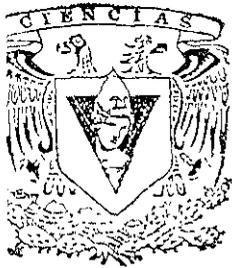
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DEL EFECTO PROTECTOR DE UN
EXTRACTO DE *Ginkgo biloba* (EGb 761) EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE
PARKINSON.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
BELEN GARDUÑO TORRES



DIRECTOR DE TESIS: DRA. PATRICIA ROJAS CASTAÑEDA

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



LIBERTAD NACIONAL
 AVENIDA DE
 MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
 Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
 Facultad de Ciencias
 Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Evaluación del Efecto Protector de un Extracto de *Ginkgo biloba* (EGb 761) en
 un Modelo Experimental de la Enfermedad de Parkinson"

realizado por Belén Garduño Torres

con número de cuenta 9560050-5, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
 propietario

Dra. Patricia Rojas Castañeda

propietario

Biól. Julio Alejandro Prieto Sagredo

propietario

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

suplente

Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

suplente

M. en IBB Laura del Carmen Vargas Parada

FACULTAD DE CIENCIAS

U. N. A. M.

Consejo Departamental de la carrera de Biología



Dra. Patricia Ramos Morales

DEPARTAMENTO
 DE BIOLOGIA

Muchos son a los que agradezco
el apoyo que de sí, me dieron.

A mis padres.

José y Loreto

A mi esposo

Julio

A mis hermanos.

Roselía, Gabriela,
Alberto, Julieta, José
y Emilio

A mi nueva familia.

Ricardo, María Luisa
y Lucía ..

Por el amor y comprensión,
por la compañía y el ejemplo

Gracias

Y a tantos más,
que sin saberlo siempre
estuvieron presentes

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurotoxicología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez".

Durante doce meses recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (No. 898) del proyecto 28605 M.

CONTENIDO

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Enfermedad de Parkinson (EP)	2
2.2. Modelos experimentales	4
2.3. Parkinsonismo inducido por la 1 - metil - 4 - fenil - 1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP)	4
2.3.1. Efectos en el comportamiento	5
2.3.2. Efectos neuroquímicos	6
2.3.3. Mecanismos de acción de la MPTP	6
2.3.4. Mecanismos de neurotoxicidad del ión 1-metil-4-fenilpiridino (MPP ⁺)	9
2.3.4.1. Hipótesis del estrés oxidativo	9
2.3.4.2. Participación de la neuromelanina en la neurotoxicidad inducida por la MPTP	11
2.3.4.3. Hipótesis de la inhibición de la cadena respiratoria	11
2.3.4.4. Excitotoxicidad por el desbalance de la homeostasis de calcio	13
2.3.4.5. Factores que intervienen en la neurotoxicidad del MPP ⁺	13
2.4. Daño oxidativo y EP	16
2.5. Radicales libres, metales y cerebro	17
2.5.1. Formación de los radicales libres en tejidos	17
2.5.2. Susceptibilidad del cerebro a la acción de los radicales libres	18
2.6. Mecanismos de protección contra los radicales libres	18
2.7. Peroxidación de lípidos (PL)	19
2.7.1. Reacciones de la PL	20
2.7.2. PL y daño celular	21
2.8. Detección y medición de la PL	22
2.9. Fitofármacos	23
2.10. <i>Ginkgo biloba</i>	23
2.11. Extracto de <i>Ginkgo biloba</i> (EGb 761)	23

2.11.1	Componentes	24
2.11.1.1	Flavonoides	24
2.11.1.2	Terpenoides	25
2.11.1.3	Ácidos orgánicos	25
2.11.2	Farmacocinética	25
2.11.2.1	En modelos animales	26
2.11.2.2	Estudios en humanos	26
2.11.3	Propiedades del EGb 761	27
2.11.3.1	Efecto multifactorial del EGb 761	27
2.11.3.2	Acción antioxidante y atrapadora de radicales libres del EGb 761	28
2.11.3.3	Funciones del EGb 761 en el sistema nervioso	28
2.11.3.4	Efectos del EGb 761 en el metabolismo de la dopamina (DA)	30
2.11.4	Uso terapéutico del EGb 761	32
3	Justificación	33
4	Hipótesis	33
5	Objetivos	34
6	Material y métodos	35
6.1	Animales	35
6.2	Drogas y reactivos	35
6.3	Pretratamiento con EGb 761 y administración del MPP ⁺	35
6.4	Evaluación de la PL	37
6.5	Análisis del contenido de DA estriatal	37
6.6	Análisis estadístico	38
7	Resultados	39
7.1	Evaluación del efecto dosis respuesta del EGb 761 en la PL inducida por MPP ⁺	39
7.2	Efectos del EGb 761 en la PL a diferentes tiempos de la administración del MPP ⁺	42
7.3	Efectos del EGb 761 en la PL a diferentes dosis de MPP ⁺	42

7.4. Efectos del EGb 761 en el contenido de DA en el CE después de la administración del MPP ⁺	45
8. Discusión	47
9. Conclusiones	53
10. Apéndices	54
A.1. Modelos experimentales	54
A.1.1. Modelo colinérgico	54
A.1.2. Lesiones neuronales no selectivas	54
A.1.3. Modelo del envejecimiento	54
A.1.4. Modelos químicos	54
A.1.4.1. Reserpina	55
A.1.4.2. 6-hidroxidopamina (6-OH-DA)	55
A.2. Radicales libres y especies reactivas del oxígeno	56
A.2.1. Oxígeno singulete	56
A.2.2. Superóxido	57
A.2.3. Peróxido de hidrógeno	58
A.2.4. Radical hidroxilo	59
A.2.5. Óxido nítrico	59
A.3. Protección contra los radicales libres	60
A.3.1. Superóxido dismutasa	60
A.3.2. Catalasa	60
A.3.3. Glutatión peroxidasa	61
A.3.4. Ceruloplasmina	61
A.3.5. Metalotioneínas	62
A.3.6. Antioxidantes	62
A.4. Fitofármacos	63
A.5. Características de <i>Ginkgo biloba</i>	64
A.5.1. Descripción	65
A.6. Estandarización del EGb 761	66
A.7. Cultivo, cosecha y extracción del EGb 761	66
12. Bibliografía	68

1. RESUMEN

El ion 1-metil-4-fenilpiridino (MPP⁺) es usado como modelo experimental de la enfermedad de Parkinson (EP), la producción excesiva de radicales libres se ha propuesto como su posible mecanismo de daño a las neuronas dopaminérgicas del cuerpo estriado (CE). Estos radicales libres son capaces de afectar a los lípidos de las membranas a través de la peroxidación de lípidos (PL). Por otra parte, el EGb 761 es un fármaco proveniente de las hojas de *Ginkgo biloba* que tiene actividad antioxidante y es atrapador de radicales libres. Esto sugiere su posible acción protectora en el daño inducido por el MPP⁺. Se evaluó si el EGb 761 protege de la PL y la neurotoxicidad dopaminérgica producida por el MPP⁺. Se utilizaron ratones macho de la cepa C-57 black (25-30 g), el EGb 761 se administró durante 17 días a diferentes dosis (0.63, 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/kg). Terminado el pretratamiento se inyectó el MPP⁺ (0.18, 0.36 y 0.72 mg/kg) en el ventrículo lateral derecho. La PL se analizó en el CE a diferentes tiempos (0.5, 1, 2 y 24 h) después de la administración del MPP⁺, por medio de la técnica de formación de productos fluorescentes lipídicos. El contenido de (DA) en el CE se evaluó por HPLC en los grupos tratados sólo con EGb 761 a la dosis más alta (10 mg/kg) a diferentes tiempos (2, 24 y 168 horas) después de la administración de MPP⁺ (0.72 mg/kg). Se encontró que los grupos tratados con MPP⁺ tuvieron un incremento en la PL de 72% comparado con el grupo control. La PL inducida por el MPP⁺ fue completamente bloqueada (100%) por el pretratamiento con EGb 761 (10 mg/kg). El contenido de DA en el CE en ratones tratados con MPP⁺ se redujo un 40% como resultado de su acción neurotóxica. El pretratamiento con EGb 761 en ratones tratados con MPP⁺ previno del daño parcialmente (32%) a 24 h en comparación con el grupo tratado con MPP⁺. Los resultados sugieren que el EGb 761 puede ser efectivo en la prevención del estrés oxidativo inducido por el MPP⁺, posiblemente actuando como un potente agente antioxidante o atrapador de radicales libres

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Enfermedad de Parkinson

Los desórdenes neurodegenerativos se definen como aquellas alteraciones que aceleran la tasa de muerte celular de grupos neuronales específicos. El ejemplo más característico de una enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson (EP).

En 1817, James Parkinson describió un síndrome caracterizado por alteraciones motoras: dificultad para iniciar movimientos (acinesia), lentitud en los mismos (bradicinesia), temblor de las extremidades durante el reposo (tremor) y rigidez muscular. En 1966, Hornykiewicz determinó que los pacientes con la EP presentaban degeneración de las neuronas de la sustancia negra compacta, un núcleo del mesencéfalo que recibe su nombre por la presencia de melanina. Estas neuronas constituyen uno de los principales grupos productores de dopamina (DA). De esta manera se asoció la DA con la expresión de la actividad motora y se originó una amplia serie de investigaciones destinadas a conocer las causas por las que la falta de este neurotransmisor puede provocar enfermedades incapacitantes.

Se han descrito una gran cantidad de cambios patológicos y bioquímicos en la EP, sin embargo, la alteración primaria es la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta, con la consecuente disminución masiva del contenido del neurotransmisor DA en el cuerpo estriado (CE) (Hornykiewicz y Kish, 1986). Los síntomas motores aparecen hasta que la pérdida de DA en el CE rebasa el 80% (Hornykiewicz y Kish, 1986); aunque en la sustancia negra la pérdida neuronal sea sólo del 50% (Marsden, 1992).

Aún cuando estos cambios han sido extensamente documentados, no ha sido identificada la causa que origina el proceso de degeneración neuronal. Existen numerosas hipótesis con respecto a la etiología de la EP. Esta enfermedad puede ser producida por un proceso fortuito (Calne et al., 1983) o bien ser la causa del envejecimiento acelerado (Appel, 1981), ser la consecuencia

de la falta de una hormona neurotrófica (Robbins *et al.*, 1985); de la deficiencia en los mecanismos de reparación del ácido desoxirribonucleico (DNA) (Barbeau *et al.*, 1982); de defectos genéticos específicos o predisposición genética (Golbe *et al.*, 1990); puede tener un origen viral (Elizán *et al.*, 1983); o bien, puede ser causada por la exposición a compuestos tóxicos presentes en el ambiente (interno y externo) del cuerpo, con efectos a corto y largo plazo sobre la función neuronal (Schoenberg *et al.*, 1985).

Sin embargo, ninguna de estas hipótesis explica la cascada de eventos responsable de la iniciación y causa de la EP. Existen numerosas evidencias del papel del estrés oxidativo producido por radicales libres del oxígeno como un factor muy importante y determinante en esta enfermedad (Jellinger, 1986).

El descubrimiento del factor o factores involucrados en la pérdida neuronal acelerada, es muy importante para el desarrollo de una estrategia terapéutica capaz de evitar la neurodegeneración, ya que dichas enfermedades dependen de un mecanismo que actúa por periodos relativamente prolongados antes de la aparición de los síntomas que la constituyen. Los primeros tratamientos utilizados fueron las cirugías propuestas por Birkmayer y Honnykiewicz (1964), quienes introdujeron la terapéutica quirúrgica esterotáxica sobre el globo pálido y núcleos ventrolaterales anteriores del tálamo para controlar funcionalmente el temblor y rigidez en la EP.

Desde el descubrimiento de la relación existente entre la muerte de neuronas nigroestriales y la EP (Hornykiewicz y Kish, 1986), se han desarrollado un gran número de terapias enfocadas a la regulación de la transmisión sináptica dopaminérgica. Estas incluyen la administración del fármaco L-dihidroxitifenilalanina (L-DOPA) (Lees, 1994), de agonistas dopaminérgicos (Goetz, 1990), de inhibidores de las enzimas monoamino oxidasa B (MAO-B) y de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) (Olanow, 1993). Sin embargo estos fármacos tienen severos efectos secundarios y sólo disminuyen la sintomatología de la enfermedad pero no la neurodegeneración.

2.2. Modelos experimentales

En un modelo experimental de la EP, se requiere destruir las neuronas del sistema nigroestriatal y corroborar que esto se acompañe con la disminución de la DA en los núcleos blanco de este sistema como el CE. Esto puede lograrse empleando neurotoxinas que destruyen selectivamente estas células. Las toxinas más comúnmente empleadas son la 6-hidroxidopamina (6-OH-DA) en ratas y la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) en primates y roedores.

Con el fin de estudiar los mecanismos que se producen y desencadenan la EP se han desarrollado varios modelos (ver apéndice 1).

2.3. Parkinsonismo inducido por la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)

El desarrollo de modelos experimentales con toxinas específicas, se ha enfocado en la posible participación de las neurotoxinas endógenas o ambientales en la patogénesis de la EP. Con el descubrimiento de una neurotoxina selectiva, la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) capaz de inducir parkinsonismo en el hombre (Langston *et al.*, 1983), otros primates (Burns *et al.*, 1983) y roedores (Heikkilä *et al.*, 1984) se destruyen las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de manera selectiva, teniendo un modelo que reproduce los aspectos sintomatológicos, neuropatológicos y bioquímicos de la EP (Langston *et al.*, 1983; Burns *et al.*, 1983; Heikkilä *et al.*, 1984; Kopin, 1986; Kopin, 1987).

La neurotoxina se produjo y distribuyó como un contaminante intermediario de una droga de abuso producida ilícitamente. A principios de los años ochenta, siete adictos a la heroína se inyectaron esta meperidina sintética (polvo de ángel) que contenía la sustancia tóxica MPTP y fueron internados en diferentes hospitales de California. Estos pacientes presentaron un síndrome parkinsoniano permanente, con destrucción selectiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta (Langston *et al.*, 1983; Davis *et al.*, 1979).

La administración de la MPTP a ratones, monos y humanos produce una disminución de la DA en el CE y una degeneración celular de la vía nigroestriatal semejante a los déficits en la enfermedad idiopática (Snyder y D'Amato, 1986, Markey y Schmuff, 1986; Markey *et al.*, 1986).

2.3.1. Efectos en el comportamiento

La exposición a MPTP en humanos provoca un síndrome parkinsoniano crónico que se caracteriza por acinesia, rigidez, temblor, postura flexionada, pérdida de los reflejos posturales y del habla (Langston *et al.*, 1983). El mejoramiento de los signos clínicos con tratamiento de L-DOPA refuerza que la deficiencia de DA es responsable de este síndrome. En primates no humanos como el mono *Rhesus* (Burns *et al.*, 1983), el mono verde (Elsworth *et al.*, 1989) y el mono ardilla (Langston *et al.*, 1984) se desarrollan deficiencias motoras parkinsonianas como la acinesia y la rigidez después de la administración de MPTP. Sin embargo, los síntomas son temporales (Eidelberg *et al.*, 1986; Ueki *et al.*, 1989; Russ *et al.*, 1991). El temblor en reposo es observado muy rara vez (Robertson *et al.*, 1990; Russ *et al.*, 1991). Ratones C-57 black tratados con MPTP muestran una reducción en su actividad locomotora y acinesia durante las 4 semanas posteriores al término de la administración de la MPTP como resultado de la denervación de la DA inducida por la neurotoxina (Arai *et al.*, 1990).

El bloqueo temporal de las entradas glutamatérgicas con ácido quinurénico en la sustancia negra de monos tratados con MPTP produce alteraciones motoras como acinesia y rigidez gradualmente, simulando la evolución de la EP en los humanos (Bezard, *et al.*, 1997a). La inyección sistémica de MPTP a bajas dosis en monos produce temblor, acinesia, rigidez, así como dificultad para balancearse y caminar reproduciendo la muerte progresiva y continua de las neuronas de la sustancia negra en la EP en humanos (Bezard *et al.*, 1997b).

Los animales tratados con MPP⁺ presentan un descenso en la temperatura corporal, actuando como un agonista indirecto de la norepinefrina que estimula los

$\alpha 2$ adrenoreceptores, sin destruir a las neuronas que contienen norepinefrina en oposición a la acción del MPP⁺ en neuronas dopaminérgicas (Drouet *et al.*, 1997).

2.3.2. Efectos neuroquímicos

La actividad neurotóxica de la MPTP produce varios cambios químicos, el más característico es la reducción de las concentraciones de DA y sus metabolitos: ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA) (Russ, *et al.*, 1991). Hay una disminución en la actividad de la tirosina hidroxilasa y una reducción en la densidad de receptores de DA (Piffl *et al.*, 1990). Estos cambios se producen más claramente en el sistema nigroestriatal, sin embargo hay cambios en las regiones extraestriatales (núcleo acumbens y en el área ventral tegmental).

Existe reducción en la concentración de otras aminas biogénicas como la noradrenalina en el putamen y la serotonina en el núcleo caudado y el putamen (Russ *et al.*, 1991). Sin embargo, los efectos de la MPTP en la serotonina son controvertidos, por ejemplo, en la administración aguda de la MPTP en ratas se encuentra un incremento en los niveles de serotonina y una reducción en el ácido 5-hidroxiindolacético en el núcleo rafe y la sustancia negra, pero no se observaron cambios de estas indolaminas en el CE y en el núcleo acumbens. En contraste, se ha reportado una disminución de la serotonina en el CE de ratas después de la administración de MPTP. Así como otros casos donde no hay alteración en los contenidos de serotonina y ácido 5-hidroxiindolacético (Hon-Wei y Yuan-Feen, 1993)

2.3.3. Mecanismos de acción de la MPTP

La MPTP es un compuesto altamente lipofílico, por lo tanto, después de su administración sistémica, puede llegar rápidamente al cerebro porque cruza libremente la barrera hematoencefálica (Riachi y Harik, 1989). En 1984 Chiba y sus colaboradores dieron las primeras evidencias, la MPTP requería ser

biotransformada para ejercer neurotoxicidad. Marsden (1992) encontró que una vez en el cerebro, la MPTP se convierte en su metabolito activo, el 1-metil-4-fenilpiridino (MPP⁺). La MPTP es oxidada por la acción de la MAO-B, enzima encargada de la desaminación oxidativa de la DA (Salach *et al.*, 1984), que está localizada en la mitocondria de las células astrogliales (Javitch y Snyder, 1984) o en las neuronas serotoninérgicas (Shen *et al.*, 1985; Nakamura y Vincent, 1986; Kopin, 1986)(Figura 1).

Como se observa en la Figura 1 el MPP⁺ se internaliza en las células dopaminérgicas por el sistema de recaptura de la DA pues es una molécula polar y no puede entrar libremente a las células (Javitch *et al.*, 1985). Tanto los inhibidores de la MAO-B (Youngster *et al.*, 1989) como los inhibidores de la captura de la DA (Javitch *et al.*, 1985) previenen los efectos neurotóxicos de la MPTP en el ratón. El MPP⁺ causa la liberación de la DA de las vesículas (Sirinathsinghi *et al.*, 1988; Rollema *et al.*, 1986) e inhibe algunas enzimas involucradas en la síntesis de la DA (Naoi *et al.*, 1988; Ozaki *et al.*, 1988), lo que probablemente incrementa el metabolismo de la MAO y la degradación del neurotransmisor con la producción subsecuente de peróxido de hidrógeno.

El MPP⁺ se considera responsable de la neurotoxicidad de la MPTP (Gerlach *et al.*, 1991). El MPP⁺ tiene alta afinidad por el transportador de la DA (DAT) de la membrana plasmática neuronal, así como por transportadores de noradrenalina y serotonina. Se ha observado en ratones transgénicos que sobreexpresan el DAT mayor susceptibilidad al daño producido por la MPTP. Esto sugiere que los individuos con mayor densidad de DAT tienen mayor riesgo de desarrollar la EP (Kostic *et al.*, 1996). Una vez dentro de las neuronas dopaminérgicas puede ser tomado por los transportadores vesiculares de las monoaminas (VMATs) y almacenado dentro de las vesículas sinápticas (Przedborski y Jackson-Lewis, 1998).

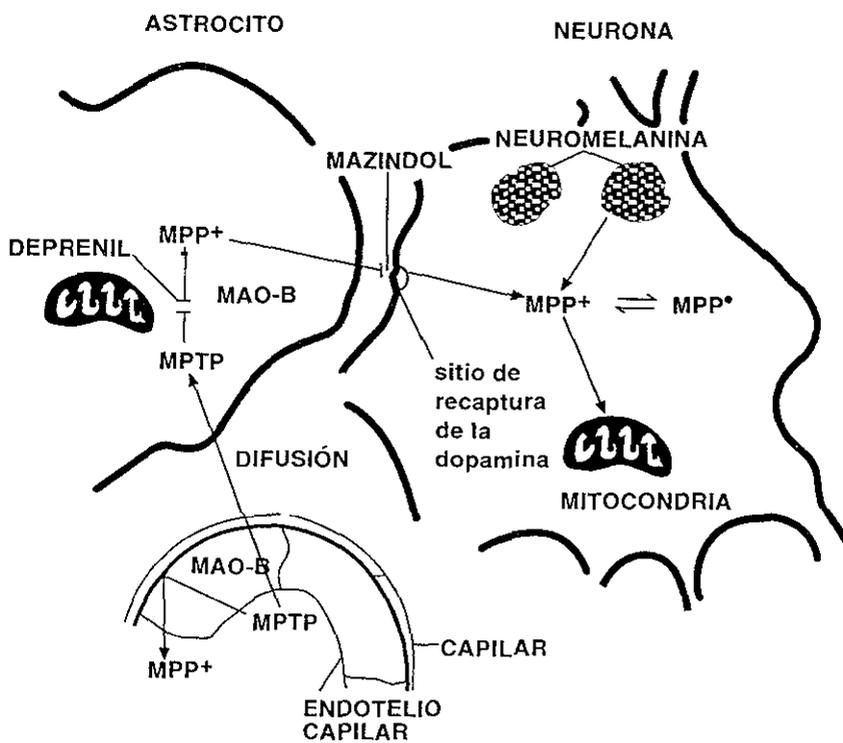


Figura 1 Proceso involucrado en la toxicidad de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) en las neuronas dopaminérgicas MPP⁺: ion 1-metil-4-fenilpiridino, MPP[•]: radical 1-metil-4-fenilpiridino (Tomado de Kopin, 1986)

2.3.4. Mecanismos de neurotoxicidad del ion 1-metil-4-fenilpiridino (MPP⁺)

Los mecanismos de neurotoxicidad inducidos por el MPP⁺ se desconocen, aunque se han propuesto una serie de hipótesis que a continuación se mencionan:

2.3.4.1. Hipótesis del estrés oxidativo

El estrés oxidativo fue el primer mecanismo de toxicidad sugerido para el MPP⁺, ya que en la destrucción de las neuronas dopaminérgicas inducida por ésta neurotoxina se producen radicales superóxido e hidroxilo durante la reducción y autooxidación intracelular del MPP⁺. Este proceso es similar al sucedido en la EP como consecuencia de la disminución progresiva del número de neuronas nigroestriatales en el envejecimiento ocasionado por la producción de radicales libres en la oxidación de la DA catalizada por la MAO-B (Singer y Ramsay, 1990).

En presencia de oxígeno se forman especies reactivas como el ion superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno causando PL en la membrana, dañando al DNA y RNA, o bien inactivando enzimas vitales. En el metabolismo normal las enzimas superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa previenen la acumulación de radicales libres.

Existen numerosas evidencias a favor de esta hipótesis:

1. El MPP⁺ genera radicales libres como el superóxido e hidroxilo *in vitro* (Wu *et al.*, 1993) La producción de estos radicales está determinada por la presencia de metales de transición (Poirier *et al.*, 1985).
2. El peróxido de hidrógeno es un compuesto importante porque media la formación de radicales libres. La MPTP cuando es metabolizada a MPP⁺ produce peróxido de hidrógeno en astrocitos y neuronas serotoninérgicas (Chiba *et al.*, 1985) La producción de peróxido de hidrógeno puede generar especies reactivas del oxígeno como son los radicales hidroxilo (Cohen, 1985)

3. El dietiliditiocarbamato (un inhibidor de la superóxido dismutasa), potencia la neurotoxicidad de la MPTP, indicando que la superóxido dismutasa es crítica para la protección de la toxicidad de la MPTP, en la detoxificación del radical superóxido (Corsini *et al.*, 1985).
4. En ratones deficientes de vitamina E tratados con MPTP hay una sobreproducción de radicales superóxido (Odunze *et al.*, 1990).
5. La MPTP disminuye los niveles de glutatión en la sustancia negra de roedores, implicando una reducción en los mecanismos de defensa contra los radicales libres (Ferraro *et al.*, 1986).
6. El tratamiento con antioxidantes previene el efecto neurotóxico de la MPTP y el MPP⁺ (Golbe y Farrel, 1988).
7. En homogenados de cerebro se demostró que el MPP⁺ produce la PL (Ríos y Tapia, 1987).
8. La administración intracerebroventricular (icv) de MPP⁺ incrementa la PL en el CE de ratón (Rojas y Ríos, 1993).
9. El daño inducido por la MPTP es atenuado en ratones transgénicos que sobreexpresan la superóxido dismutasa, implicando la generación de radicales libres (Przedborski *et al.*, 1992).
10. La sobreexpresión de Bcl-2 (proto-oncogen inhibidor de la apoptosis) en ratones transgénicos protege contra la neurotoxicidad inducida por la MPTP por mecanismos que involucran tanto actividad antioxidante como la inhibición de rutas apoptóticas (Yang *et al.*, 1998)
11. Después de la administración de la MPTP disminuyen los niveles de manganeso y cobre, metales que constituyen parte de los sitios activos de la enzima superóxido dismutasa (Ríos *et al.*, 1995),
12. El pretratamiento con cobre y manganeso en ratones protege contra la neurotoxicidad del MPP⁺ (Rojas y Ríos, 1995; Alcaraz-Zubeldía *et al.*, 2001)
13. La metalotioneína protege contra la neurotoxicidad producida por el MPTP/MPP⁺ (Rojas y Ríos, 1997; Rojas *et al.*, 2000a; 2000b).

2.3.4.2. Participación de la neuromelanina en la neurotoxicidad de la MPTP

La DA en las neuronas de la sustancia negra puede oxidarse enzimáticamente o no enzimáticamente. La MAO desamina la DA a 3,4 dihidroxifenil acetaldehído pero produce peróxido de hidrógeno. La autooxidación de la DA produce quinonas, peróxido de hidrógeno y oxirradicales. La neuromelanina es el producto más importante de la autooxidación de la DA y se encuentra en altas concentraciones en la sustancia negra (Graham, 1978).

La neuromelanina está compuesta de un complejo químicamente heterogéneo que contiene gránulos de lipofuscina y quinonas que se forman por la autooxidación de las catecolaminas (Barden y Levine, 1983). Se ha demostrado que los complejos de melanina contienen radicales libres y quinonas reactivas redox. Aunque el papel fisiológico de la neuromelanina no está claro, se ha propuesto que cuando se incrementa su contenido en el cerebro con la edad puede tener una función importante en los estados degenerativos relacionados con el envejecimiento, de origen natural o ambiental (Mann y Yates, 1983). Se demostró que la disminución de las neuronas dopaminérgicas incrementa en proporción al contenido de neuromelanina (Hirsch *et al.*, 1988).

Youdim *et al* (1989), han propuesto que la neuromelanina facilita la formación de radicales hidroxilo por la reacción de Fenton. La afinidad del MPP⁺ por la neuromelanina puede explicar la selectividad de la MPTP para dañar los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (Snyder y D'Amato, 1986; Javitch y Snyder, 1984).

2.3.4.3. Hipótesis de la inhibición de la cadena respiratoria y disminución en la producción de ATP

El papel de la mitocondria en la patogénesis de la EP se sugirió al encontrar que el MPP⁺ inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (Figura 2) Ramsay y Singer en 1986, demostraron que el MPP⁺ es captado por la mitocondria, mediante un mecanismo dependiente de energía

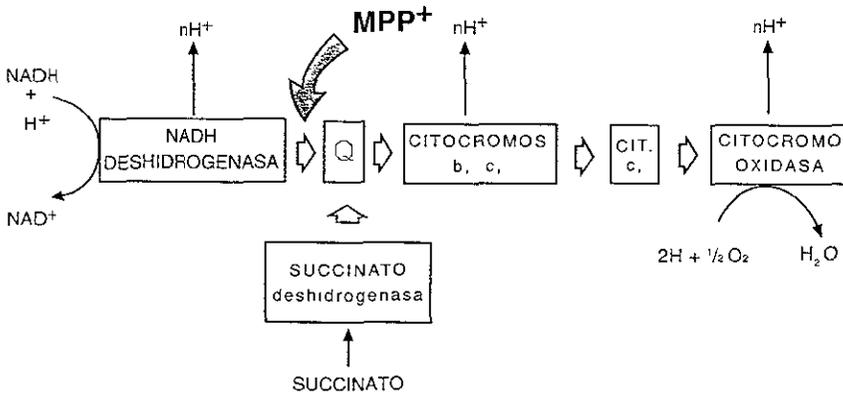


Figura 2. Sitio de reacción hipotética del MPP⁺ en la cadena respiratoria (Tomado de Singer y Ramsay, 1990).

Las evidencias a favor de esta hipótesis son:

1. Inhibidores de la respiración mitocondrial que actúan sobre el complejo I, como la rotenona, producen daño dopaminérgico cuando se administran intracerebralmente (Ramsay *et al.*, 1987)
2. La administración de la MPTP o MPP⁺ disminuye el contenido de ATP en hepatocitos de rata (DiMonte *et al.*, 1987, Chacón *et al.*, 1987)
3. La administración de la MPTP a hepatocitos produce un incremento en el Ca²⁺ citosólico y una disminución del mitocondrial, considerándose esto un índice de daño estructural a la mitocondria (Kass, 1988) Este hallazgo sugiere que el desequilibrio entre la entrada y la salida de calcio puede ser el mecanismo de muerte celular en la neurotoxicidad producida por MPTP (Frei y Ritcher, 1986).

2.3.4.4. Excitotoxicidad por el desbalance de la homeostasis de calcio intracelular

La MPTP produce acumulación de Ca^{2+} en hepatocitos (Kaas *et al.*, 1988). Los antagonistas de N-metil-D-aspartato (NMDA) protegen a la sustancia negra de la neurotoxicidad del MPP^+ (Turski *et al.*, 1991), ya que inhiben el influjo excesivo de Ca^{2+} a través de canales operados por sus receptores (Siesjo, 1990).

Otros estudios mostraron que las neuronas que contienen niveles altos de proteínas que unen Ca^{2+} (calbindina-D28K) reducen la toxicidad inducida por la MPTP (German *et al.*, 1992).

En la EP idiopática el incremento en los niveles de hierro en las áreas donde se produce estrés oxidativo se asocian con alteraciones en el metabolismo del Ca^{2+} intracelular, disminución de glutatión y muerte celular (Youdim *et al.*, 1993).

Sin embargo, actualmente se considera que las hipótesis antes mencionadas, no parecen ser tan independientes, porque tanto el estrés oxidativo como la inhibición de la cadena de transporte de electrones, la disminución de ATP y el incremento de calcio intracelular están involucrados conjuntamente en el daño celular producido por el MPP^+ (Przedborski y Jackson-Lewis, 1998; Sriram *et al.*, 1997).

2.3.4.5. Factores que intervienen en la neurotoxicidad del MPP^+

El MPP^+ intracelular se puede unir con alta afinidad a la neuromelanina (D'Amato *et al.*, 1987) o bien, concentrarse en la mitocondria por el gradiente electroquímico (Ramsay y Singer, 1986) y bloquear selectiva y potencialmente el complejo I de la cadena de transporte de electrones, teniendo como consecuencia la disminución en la producción de ATP (Ali *et al.*, 1994), el incremento en la formación de radicales libres como el superóxido, pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y finalmente la muerte celular (Cassarino y Bennet, 1999).

Después de la administración del MPP⁺ se ha observado que las defensas antioxidantes endógenas disminuyen formando excesivamente especies reactivas del oxígeno como radicales hidróxilo, superóxido y peróxido de hidrógeno. El radical superóxido juega un papel muy importante en los mecanismos de daño celular por la generación excesiva de otros radicales, estos a su vez son capaces de dañar proteínas, lípidos y DNA contribuyendo al daño celular. Tanto el estrés oxidativo como la pérdida de ATP por la inhibición del complejo I, impide a la célula mantener su potencial intracelular provocando la muerte celular o citotoxicidad. Existen reportes de alteraciones en el complejo IV de la cadena respiratoria y daño directo al DNA causado por el MPP⁺ (Buu, 1993).

También se ha sugerido que el óxido nítrico se encuentra relacionado con la neurotoxicidad inducida por el MPP⁺ (al combinarse con el radical superóxido derivado de la interferencia en el transporte de electrones de la mitocondria) (Przedborski *et al.*, 1996; Schulz *et al.*, 1995; Hantraye *et al.*, 1996), produciendo el peroxinitrito un anión altamente tóxico que tiene mayor difusión y vida media que el óxido nítrico, que a su vez es un precursor del radical hidroxilo. El daño celular inducido por el MPP⁺ es una interacción compleja entre la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, disminución de energía y posiblemente excitotoxicidad. Factores muy semejantes son los que se desencadenan en la EP, provocando necrosis, apoptosis o disminución de la función celular, según la fase de la enfermedad (Przedborski y Jackson-Lewis, 1998).

Como todo modelo experimental, el modelo de MPTP/MPP⁺ presenta discordancias con respecto a la sintomatología característica de la EP (Tabla 1). Sin embargo, a pesar del gran número de modelos que han sido propuestos, el modelo de administración intracerebroventricular del MPP⁺ ha demostrado ser el que más asemeja las alteraciones bioquímicas que constituyen la enfermedad (Markey *et al.*, 1984). Entre las principales alteraciones bioquímicas derivadas de la administración del MPP⁺, se encuentran tanto el incremento en la PL, como la reducción en el contenido de DA en el CE (Rojas y Ríos, 1993).

Tabla 1. Relación entre la enfermedad de Parkinson idiopático y el parkinsonismo inducido por MPTP.

	Enfermedad de Parkinson	Parkinsonismo inducido por MPTP
<i>Sintomatología</i>		
Síntomas motores cardinales	Acinesia, rigidez y temblor en reposo	Acinesia, rigidez, rara vez se observa temblor en reposo
Respuesta a terapia con drogas antiparkinsonianas	Sí	Sí
Progresión de los síntomas	Sí	No
<i>Neuropatología</i>		
Pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc	Sí	Sí
Presencia de cuerpos de Lewy	Sí	No
<i>Cambios neuroquímicos</i>		
Disminución de la DA en CE	Sí	Sí
Decremento en la actividad TH	Sí	Sí
Disminución de la DA extraestriatal	Sí	Sí
Reducción de otras aminas biogénicas	Sí	Sí
Peroxidación de lípidos	Sí	Sí
Incremento de hierro	Sí	No
Desbalance de la homeostasis del calcio	Sí	Sí
Disminución de la actividad enzimática en el complejo I y III de la cadena respiratoria	Sí	Sí, solo complejo I

CE, cuerpo estriado; DA, dopamina; SNc, sustancia negra compacta; TH, tirosina hidroxilasa

Tomado de Gerlach *et al*, 1991.

2.4. Daño oxidativo y EP

El estudio de las especies reactivas del oxígeno es muy relevante pues estas participan en la fisiopatogénesis de las enfermedades neurodegenerativas (Richardson *et al.*, 1990). La excesiva formación de radicales libres en el tejido cerebral es un mecanismo que participa de manera importante en la EP (Dexter *et al.*, 1989).

Es importante relacionar las evidencias que apoyan la hipótesis de la formación de radicales libres en este modelo de la EP con el parkinsonismo idiopático humano, ya que existen reportes de estudios *post mortem* que indican lo siguiente:

1. En los cerebros de parkinsónicos la PL basal y la actividad de la superóxido dismutasa aumenta (Youdim, 1993).
2. El contenido de ácidos grasos poliinsaturados (substrato de la PL) en la sustancia negra de los cerebros parkinsónicos disminuye (Dexter *et al.*, 1989).
3. Los niveles de glutatión reducido en la sustancia negra de sujetos parkinsónicos disminuyen (Riederer *et al.*, 1989). Sin embargo, existen otros reportes donde se ha observado que los niveles de glutatión y vitamina E se elevan como un mecanismo compensatorio para contrarrestar el daño del estrés oxidativo (Adams *et al.*, 1991).
4. El ion hierro (Fe^{2+}), promotor de radicales libres, está aumentado en la sustancia negra de pacientes con EP (Riederer *et al.*, 1989)
5. Hay disminución de cobre en la sustancia negra y en el CE de cerebros parkinsónicos (Riederer *et al.*, 1989; Dexter *et al.*, 1991), provocando una reducción de las funciones de enzimas dependientes de cobre (Mann *et al.*, 1994)
6. En pacientes con la EP se ha encontrado una disminución en el complejo I y III de la cadena respiratoria en la sustancia negra (Jellinger *et al.*, 1992)

2.5. Radicales libres, metales y cerebro

El oxígeno tiene dos electrones desapareados, cada uno localizado en diferente orbital (Halliwell, 1981), los compuestos orgánicos del cuerpo humano son casi totalmente especies no radicales, que pueden reaccionar inmediatamente con el oxígeno del aire y oxidar una molécula para aceptar un par de electrones en los espacios vacíos de los orbitales del oxígeno.

La ruta principal del metabolismo del oxígeno molecular involucra su reducción completa hasta formar agua por aceptar cuatro electrones. Durante este proceso se forman radicales libres y peróxido de hidrógeno (Elstner, 1990) (ver apéndice 2).

2.5 1. Formación de radicales libres en tejidos

Los radicales libres se forman en las células y en los tejidos por procesos fisiológicos normales como la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, en el sistema citocromo P-450, en la fagocitosis y en la síntesis de prostaglandinas (Yu, 1994)

Varios procesos y agentes endógenos son capaces de generar radicales libres *in vivo*, como es el caso del peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo que se generan en el organismo como consecuencia del metabolismo normal.

La interacción de algunos componentes celulares con las especies reactivas del oxígeno pueden contribuir en las enfermedades dependientes de la edad. Sin embargo, hay un balance homeostático entre la generación de radicales libres y los mecanismos de defensa de los sistemas celulares. Cuando los mecanismos antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, no son suficientes para contrarrestar la producción excesiva de especies reactivas del oxígeno, la célula está en un estrés oxidativo.

2.5.2. Susceptibilidad del cerebro a la acción de los radicales libres

El cerebro es un órgano particularmente susceptible a la acción dañina de los radicales libres por las siguientes razones:

1. La tasa metabólica del cerebro es elevada, permitiendo la generación de radicales del oxígeno.
2. Las membranas neuronales son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, lo que favorece la PL (Halliwell y Gutteridge, 1989).
3. El cerebro es rico en metales de transición (Fe y Cu, por ejemplo), promotores de la generación de radicales libres (Riederer *et al.*, 1989).
4. El cerebro tiene poca actividad de catalasa (Chance, B., *et al.*, 1979) y poca cantidad de superóxido y glutatión peroxidasa (Cohen, G., 1988).

2.6. Mecanismos de protección contra los radicales libres

Los radicales del oxígeno se producen continuamente en los tejidos de manera normal en el organismo ya sea como subproductos del metabolismo energético o bien cumpliendo funciones específicas como aquellas relacionadas con la respuesta inmune.

Los radicales libres pueden dañar a las células si las concentraciones exceden a su capacidad antioxidante endógena. Las enzimas tales como la catalasa, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa representan la primera línea de defensa contra las especies tóxicas.

Las células han desarrollado mecanismos para el control de una producción excesiva de radicales libres, como la remoción de especies derivadas del oxígeno, secuestro de hierro y otros metales en formas poco o no reactivas, atrapando radicales libres o reparando el daño molecular. Los mecanismos de protección contra el daño oxidativo producido por los radicales libres incluyen sistemas de enzimas que atrapan o detoxifican de especies reactivas del oxígeno como la superóxido dismutasa para el ion superóxido, la catalasa y la glutatión peroxidasa para el peróxido de hidrógeno. Así como antioxidantes no específicos como el

glutatión reducido, la transferrina, etc. Entre otros compuestos antioxidantes que actúan como atrapadores o inactivadores de radicales libres, se encuentran los ubiquinolés, la bilirrubina, la ceruloplasmina, ácido úrico, vitamina E, beta caroteno y las metalotioneínas (ver apéndice 3).

2.7. Peroxidación de lípidos (PL)

Los radicales libres producen gran cantidad de efectos tóxicos sobre las células. Entre estos, uno de los más importantes es la PL, el índice comúnmente utilizado para medir el efecto biológico de los radicales libres.

La fluidez de la membrana proporciona a las células propiedades esenciales para su funcionamiento. Esta capacidad está dada por los ácidos grasos poliinsaturados que en su estructura tienen un doble enlace en la unión del hidrógeno y en el carbón alílico (Figura 3). Los hidrógenos alílicos son susceptibles a ser sustraídos por especies químicamente reactivas que contienen uno o más electrones desapareados como los radicales libres (Sahnoun *et al.*, 1997). El radical lípido formado, reacciona con el oxígeno molecular en la primera de las reacciones que producen el rompimiento de la estructura de los ácidos grasos poliinsaturados. Esta secuencia de reacciones es conocida como PL (Gutteridge y Halliwell, 1990).

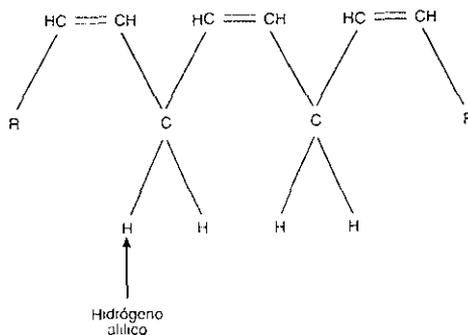
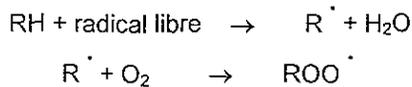


Figura 3 Estructura de los ácidos grasos poliinsaturados que facilitan la iniciación de la peroxidación de lípidos (Tomado de Sahnoun *et al.*, 1997)

2.7.1. Reacciones de la PL

La PL es una reacción en cadena que se produce de manera general en tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Figura 4).

1. **Iniciación:** La iniciación de la reacción en cadena se localiza en un doble enlace de un ácido graso insaturado. Los radicales libres captan un átomo de hidrógeno para su transformación en agua. Los ácidos grasos insaturados son dañados y se transforman en radicales libres R^\cdot , con una súbita reorganización de sus dobles enlaces, en presencia de oxígeno, forman un radical peroxilipídico ROO^\cdot .



2. **Propagación:** El radical peroxilipídico ROO^\cdot desprendido, actúa sobre una cadena insaturada vecina intacta, con formación de un hidrógeno y un hidroperóxido $ROOH$ inestable, mientras que el radical ROO^\cdot que él ha formado, puede recomenzar un nuevo ciclo. De esta reacción en cadena, resulta el ataque de los lípidos de membrana por los radicales libres.



3. **Terminación:** La reacción en cadena se detiene cuando dos radicales lipídicos pertenecientes o no a la misma molécula, interactúan, creando enlaces covalentes lípido-lípido, forman un producto no radical pero que daña la membrana celular.



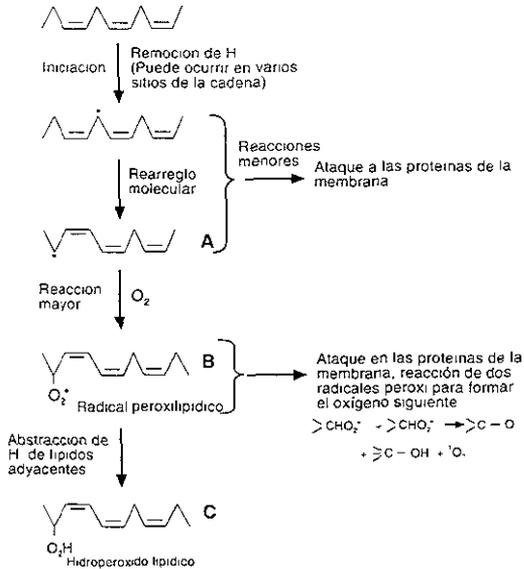


Figura 4 Formación de radicales lipídicos, radicales peroxilipídicos e hidroperóxidos lipídicos en la secuencia de reacciones que constituyen la peroxidación de lípidos (Tomado de Gutteridge y Halliwell, 1990).

En la PL los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana se degradan, lo que produce un cambio en la composición lipídica de la membrana celular que a su vez induce cambios en las propiedades fisicoquímicas de la misma, entre ellos un aumento en la rigidez membranal y disfunción que puede llevar a la muerte celular por alteraciones energéticas subsecuentes (Yu *et al.*, 1992).

2.7.2 PL y daño celular

La PL causa destrucción de los lípidos de las membranas lo que produce reducción en la fluidez de la membrana, inactivación de los receptores y enzimas unidos a membrana e incremento en la permeabilidad inespecífica a iones como el

Ca^{2+} , lisis mitocondrial y reducción del ATP conduciendo a la muerte celular (Yu, 1992).

Las enzimas que contienen grupos sulfhidrilo pueden inactivarse como la ATPasa- Ca_2 de la membrana plasmática debido a la oxidación de los enlaces sulfhidrilo lo que conduce a una deficiencia en la homeostasis del calcio citosólico (Jones *et al.*, 1983).

La PL es una fuente importante de productos citotóxicos como aldehídos producidos por la descomposición de hidroperóxidos lipídicos (Esterbauer *et al.*, 1990).

2.8. Detección y medición de la PL

El efecto biológico de los radicales libres *in vitro* e *in vivo*, puede medirse de diversas formas, los más comunes evalúan el efecto sobre la PL. En este trabajo se evaluó la formación de PFL como un índice del daño inducido por el MPP⁺. Este es un método altamente sensible que se basa en la formación de bases de Schiff como resultado de la reacción del MDA con los grupos amino. Estos compuestos, junto con productos de polimerización de MDA, producen la fluorescencia que puede ser medida en extractos lipídicos de cloroformo-metanol. Es un buen método para medir PL *in vivo*, siempre y cuando se caracterice que la fluorescencia proviene de los productos finales de la PL, mediante la medición simultánea de otro índice (Triggs y Willmore, 1984).

Otros métodos utilizados en la detección y medición de la PL son análisis de ácidos grasos por HPLC; análisis titrimétrico usando liberación de yoduro; ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS); medición por fluorescencia cuando los aldehídos reaccionan con los grupos amino formando bases de Schiff y formación de dienos conjugados entre otros. Otras técnicas pueden medir la PL de forma indirecta cuando se detecta la presencia de radicales libres

2.9. Fitofármacos

Los fitofármacos son medicamentos cuya sustancia activa se encuentra en el extracto de una determinada planta, a diferencia de un fármaco sintético que proviene de una molécula químicamente sintetizada (Lozoya y Gómez, 1997) (ver apéndice 4).

2.10. *Ginkgo biloba*

El *G. biloba* (ver apéndice 5) se menciona en la farmacopea de la china tradicional. Los chinos preparaban infusiones con las hojas del árbol para el tratamiento del asma y la bronquitis. El primer registro de las propiedades medicinales de las hojas de este árbol data de 1505 como tratamiento en enfermedades del corazón y pulmones.

Los árboles de *G. biloba* se plantan en lugares muy soleados y se cultivan extensamente por sus nueces comestibles o con propósitos ornamentales, también por las propiedades medicinales de sus hojas en el mejoramiento de la circulación sanguínea, el funcionamiento cerebral y pulmonar, así como su uso en aterosclerosis, angina pectoral, niveles altos de colesterol, disentería y filariasis (Foster y Chongxi, 1992).

Actualmente se han obtenido numerosos extractos principalmente de las hojas del árbol de *G. biloba*, uno de ellos es el que se utilizó para este trabajo. El extracto se denomina EGb 761, es una mezcla bien definida y estandarizada que generalmente se utiliza para el tratamiento de insuficiencia cerebral, desórdenes cerebrales (incluyendo demencias), problemas neurosensoriales y disturbios en la circulación periférica (DeFeudis, 1998).

2.11. Extracto de *Ginkgo biloba* (EGb 761)

En 1965 el Dr. Wilmar Schwabe en Alemania caracterizó las actividades farmacológicas del extracto de *G. biloba* registrándolo para su uso terapéutico como "EGb 761", estando presente para 1978 en preparación oral en el Tebonin

761 (40 mg) y para 1982 como Tebonin forte (80 mg) comercializados por Schwabe (Alemania) (DeFeudis, 1998).

El EGb 761 es una mezcla compleja pero bien definida (ver apéndice 6), mediante un proceso de extracción se obtienen los compuestos activos de las hojas del árbol de *G. biloba* (ver apéndice 7). El extracto es conocido por sus efectos benéficos en la patología de las enfermedades cardio y cerebrovasculares, mejorando el flujo cerebral global y local, así como la microcirculación; tiene efectos protectores contra hipoxia, inhibe el factor de agregación plaquetaria (FAP), incrementa la reología de la sangre y reduce la permeabilidad capilar (DeFeudis, 1991).

La eficacia terapéutica del EGb 761 no se basa en los efectos individuales de los múltiples ingredientes activos, sino en la interacción de todos los ingredientes, es decir una actividad combinada y polivalente (DeFeudis, 1998).

2.11.1. Componentes

2.11.1.1. **Flavonoides:** glucósidos flavónicos, kaempferol, quercitina, isoramnetina que están unidos a un azúcar y en menor proporción proantocianidinas.

Los flavonoides son sustancias de bajo peso molecular presentes en el reino vegetal, responsables del color característicos de las hojas en el otoño y de algunas flores. Funcionan como antioxidantes, atrapadores de radicales libres, modulan actividad enzimática, son quelantes de cationes y presentan actividad antialérgica, antiinflamatoria, antiproliferativa, antiviral y anticarcinogénica (van Acker *et al.*, 1995). La fracción flavonoide del extracto, es la que proporciona la actividad antioxidante y atrapadora de radicales libres (Joyeux *et al.*, 1995). Las proantocianidinas o taninos condensados interactúan con proteínas membranales modificando las funciones celulares como la permeabilidad (Auguet *et al.*, 1994).

2.11.1.2. **Terpenoides:** ginkgólidos A, B, C y J, bilobálicos.

Estas sustancias son liposolubles responsables del sabor amargo del EGb 761. Los ginkgólidos son antagonistas del factor de agregación plaquetaria (FAP), regulan la síntesis de glucocorticoides (Amri *et al.*, 1996) y tienen actividad antioxidante (Pietri *et al.*, 1997). Los bilobálicos preservan la función mitocondrial (Narasimhan *et al.*, 1989).

2.11.1.3. **Ácidos orgánicos:** ascórbico, kinurénico, vanílico, hidroxibenzóico, acético.

El extracto es de carácter ácido por lo que se incrementa su solubilidad en agua y posiblemente la biodisponibilidad de los constituyentes flavonoides y terpenoides que no son solubles en agua (Drieu, 1988).

2.11.2. Farmacocinética

La farmacocinética del EGb 761 involucra la absorción, distribución, metabolismo y excreción de sus múltiples constituyentes que es esencial en la biodisponibilidad de los mismos pues es un factor importante en la concentración de la droga en el sitio de acción. Sin embargo, es extraordinariamente difícil evaluar las propiedades farmacocinéticas del EGb 761 debido a sus numerosos constituyentes activos y las posibles interacciones (aditivas, sinérgicas o antagonistas) que pueden ocurrir entre dichas sustancias. Las diferentes tasas de metabolismo de los constituyentes del EGb 761 así como sus diferentes sitios de acción entre los organismos complica el problema, por lo que no existe una evaluación sistemática de la farmacocinética del extracto sino las propiedades de algunas de las fracciones del extracto que lo conforman y puedan ser estudiadas independientemente (DeFeudis, 1998)

2.11.2.1. En modelos animales

Después de la administración oral de EGb 761 en ratas, se observó que la vida media es de 4-5 horas, los sitios con mayor absorción son el estómago y el intestino delgado. En el sistema nervioso central las estructuras con mayor distribución de EGb 761 marcado radioactivamente son el hipotálamo, cuerpo estriado e hipocampo. Se detectó la excreción del 17%, 3 horas posteriores a la administración y 60% después de las 72 horas. El perfil de excreción urinaria muestra un máximo aproximado de 5 horas posterior a la administración. La disposición biológica de los flavonoides del extracto es rápida; 20 horas después de la ingesta, la excreción urinaria está prácticamente finalizada (Moreau *et al.*, 1986). En la fracción terpenoide la vida media de los ginkgólidos A y B es de 2 horas; con respecto a los bilobálidos es de 3 horas aproximadamente. Cuando se administra el EGb 761 se tiene una vida media de los terpenoides en general de 2-3 horas (Biber y Chatterjee, 1995).

2.11.2.2. Estudios en humanos

En humanos se determinó la absorción de glucósidos flavónicos después de su administración oral con un extracto especial denominado LI 1370 que contiene 24% de glucósidos flavónicos (Nieder, 1991), tiene un pico de 2-3 horas después de la administración. La absorción intestinal de la fracción flavonoide del EGb 761 es de un 60%. Estos compuestos se eliminan después de 24 horas y la vida media es entre 3 y 4 horas. Con respecto a los ginkgólidos A y B hay una biodisponibilidad completa; en el caso del ginkgólido C es muy baja con una vida media de 1 a 2 horas. Sin embargo, en el caso de los bilobálidos, es difícil determinar las propiedades farmacocinéticas porque son muy inestables, su biodisponibilidad absoluta es de 72% y su vida media es de 3 horas después de la administración oral del EGb 761 en humanos sanos (Fourtillan *et al.*, 1995)

El EGb 761 se administra oralmente a humanos en un medicamento denominado Tebonin 761 que contiene 40 mg del extracto estandarizado ajustado a 9.6 mg de glucósidos flavónicos y 2.4 mg de terpenoides (ginkgólidos y bilobálicos), así como Tebonin forte con 80 mg del extracto estandarizado ajustado a 19.2 mg de glucósidos flavónicos calculados como quercetina y kaempferol. Se ha demostrado que el EGb 761 es un fármaco seguro a dosis terapéutica, sin producir daño en la mucosa gástrica, ni alteraciones cardiovasculares en el ritmo cardíaco o hipotensión (BGA-Kommission E, 1994).

Las drogas utilizadas para el tratamiento de funciones cerebrales o arteriopatías periféricas no poseen actividades farmacológicas inmediatas que se puedan observar con una sola dosis, el EGb 761 no se utiliza en dosis masivas sencillas para tratamiento de demencia o enfermedades arteriales, sino en administraciones repetidas que producen efectos benéficos por un periodo más prolongado (DeFeudis, 1998).

2.11.3. Propiedades del EGb 761

2.11.3.1. Efecto multifactorial del EGb 761

El EGb 761 en diversos estudios, tanto de laboratorio como clínicos, ha demostrado tener un efecto multifactorial, ya que presenta un triple mecanismo de acción polivalente (DeFeudis, 1991).

1. Vascular: Regula el tono arterial, capilar y venoso normalizando la irrigación tisular y la microcirculación.
2. Reológico: Inhibe el FAP (Smith *et al.*, 1996), disminuyendo el riesgo trombótico microcirculatorio.
3. Metabólico: Estimula el metabolismo energético celular, aumenta la tolerancia tisular a la hipoxia y es captador de radicales libres, lo que disminuye el riesgo de lesiones en la membrana celular.

Se ha demostrado que el EGb 761 atenúa el estrés oxidativo en macrófagos, en células endoteliales (Rong *et al.*, 1996) y cardiomiocitos; previene la apoptosis inducida por radicales hidroxilo (Wejt *et al.*, 1996); preserva la función mitocondrial protegiendo contra el estrés oxidativo asociado al envejecimiento en la mitocondria (Sastre *et al.*, 1998); inhibe la síntesis de glucocorticoides (Amri *et al.*, 1996) y preserva la fluidez de la membrana (Stoll *et al.*, 1996). Sin embargo, las evidencias más sólidas del papel protector del EGb 761 se han experimentado en el sistema nervioso, como se mencionará posteriormente.

2.11.3.2. Acción antioxidante y atrapadora de radicales libres del EGb 761

El extracto de *G. biloba*, el EGb 761, tiene propiedades como agente antioxidante (Ni *et al.*, 1996), potente atrapador de radicales libres (Pincemail y Deby, 1986), como los radicales superóxido (Pincemail *et al.*, 1989), hidroxilo (Pincemail *et al.*, 1987; Gardes-Albert *et al.*, 1993) y peroxil (Maitra *et al.*, 1995; Kobuchi *et al.*, 1997); protege a las neuronas expuestas a peróxido de hidrógeno (Oyama *et al.*, 1996); inhibe la actividad enzimática de la sintasa del óxido nítrico inducible (Kobuchi *et al.*, 1997), tiene la capacidad de interactuar con el óxido nítrico (Mancocci *et al.*, 1994), desempeña una función similar a la de la enzima superóxido dismutasa en presencia de radicales libres (Pincemail *et al.*, 1989) y disminuye la actividad de la enzima MAO, (Wu y Zhu, 1999) entre otras propiedades.

2.11 3.3. Funciones del EGb 761 en el sistema nervioso

- Sistema nervioso central: El EGb 761 tiene efectos neuroprotectores ya que mejora el metabolismo energético del cerebro (Karcher *et al.*, 1984); protege contra hipoxia, isquemia (Chatterjee y Gabard, 1981; Zalewska *et al.*, 1996) y edema cerebral (Chatterjee y Gabard, 1984); disminuye la actividad de la enzima MAO (Auguet *et al.*, 1982); reduce la pérdida de los neurotransmisores como consecuencia del envejecimiento; preserva los sistemas de recaptura de

neurotransmisores en sinaptosomas (Taylor *et al.*, 1991; Ramassamy *et al.*, 1990), y previene la neurodegeneración inducida por estrés oxidativo (Ni *et al.*, 1996)

- Conducta, aprendizaje y memoria: El EGb 761 tiene efectos benéficos en la adquisición, mejoramiento y retención en los procesos de memoria y aprendizaje (Winter, 1991), especialmente en animales de edad avanzada (Continella y Drago, 1985). En el modelo experimental de encefalopatía inducida por radiación con pruebas posteriores de conducta, Lamproglou *et al.*, (1997) encontraron que el EGb 761 mejoró el déficit cognitivo y les facilitó su desempeño en pruebas conductuales.
- Plasticidad y recuperación traumática: El EGb 761 protege contra el daño en estructuras cerebrales por su participación en la plasticidad neuronal en estudios de lobotomía frontal bilateral (Atella *et al.*, 1989), hemiplegia cortical (Brailowsky y Montiel, 1997) y daño septohipocampal (Kelche *et al.*, 1996). Protege las vías visuales que se dañan en el desarrollo postnatal estimulando el metabolismo neuronal teniendo efectos en la actividad de la citocromo oxidasa considerada como un marcador de maduración neuronal (Ruiz y Droy-Lefaix, 1992). Otra función sumamente importante del extracto es la influencia en el incremento de la expresión de factores tróficos implicados en la sinaptogénesis que producen un aumento en procesos de reinervación (Shifman *et al.*, 1996). Los bilobálicos parecen ser los responsables de la regeneración e inervación en nervios periféricos, de estimular astrocitos y proteger la mielina (Bombardelli, 1991).
- Adaptación neuropsicológica y efectos en el estrés. El EGb 761 protege de las respuestas dañinas del estrés como la ansiedad y la depresión. Facilita la adaptación conductual bajo condiciones de estrés en pruebas de aprendizaje y discriminación (Rapin *et al.*, 1994), reduce la respuesta hormonal del estrés de cirugías agudas (Oliver *et al.*, 1994), mejora la adaptabilidad al estrés que

produce daño cerebral inducido por hipoxia y exposición al calor o al frío (Sharma *et al.*, 1994; Ramachandran *et al.*, 1990). En pacientes geriátricos progresaron los déficits cognitivos y la capacidad de adaptarse a las demandas de estrés de la vida cotidiana (Israel *et al.*, 1987). La capacidad ansiolítica del extracto se le atribuye a los bilobálicos (Nöldner y Chaterjee, 1994); y los ginkgólidos pueden estar involucrados en mantener bajos los niveles de glucocorticoides (Amri *et al.*, 1996)

- Sistemas neurosensoriales: En el sistema visual se ha observado que el tratamiento con EGb 761 puede proteger del daño de los radicales libres por su acción antioxidante y de atrapador de radicales libres; disminuye los daños funcionales inducidos por isquemia-reperfusión, fotodegeneración (Droy-Lefaix *et al.*, 1991) y retinopatía diabética (Doly *et al.*, 1986). También es útil en el tratamiento de retinopatías asociados con desajustes en el metabolismo de la glucosa (Doly *et al.*, 1994) y disminuye el edema retinal que sucede durante la perfusión en retina de rata (Szabo *et al.*, 1991). En el sistema vestibular y auditivo, el EGb 761 influye en la síntesis de proteínas cerebrales y vestibulares después de una laberintotomía en rata (Bustany *et al.*, 1992), los flavonoides del extracto son los responsables de la recuperación en modelos de neurectomía vestibular unilateral (Tighilet y Lacour, 1995), teniendo efectos benéficos en la compensación de déficits vestibulares o síndrome vertiginoso. En el sistema olfatorio el EGb 761 protege contra la axotomía que induce muerte en el epitelio olfatorio (Jourdan *et al.*, 1994)

2.11.3.4. Efectos del EGb 761 en el metabolismo de la dopamina (DA)

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado los efectos del EGb 761 en el metabolismo de la DA. Ramassamy *et al.*, (1990) confirmaron que a concentraciones altas (mg/ml), el EGb 761 es capaz de inhibir la recaptura de la noradrenalina, DA y serotonina de manera dosis dependiente. Sin embargo, estas concentraciones del extracto (o sus componentes) son muy altas para producir

dichos efectos y nunca se alcanzan a acumular en el cerebro después de una administración en dosis terapéutica en humanos (120 mg/día). Con estos resultados Ramassamy decidió estudiar la actividad del EGb 761 pero a concentraciones mas bajas. Los efectos fueron muy diferentes teniendo que, el EGb 761 a dosis de (2-16 µg/ml) preserva la recaptura de la DA.

Cuando se administra EGb 761 a ratones en dosis repetidas (~100 mg/kg/día) durante 17 días, protege contra la neurotoxicidad inducida por la administración de la MPTP en infusiones continuas de una semana. En este estudio se monitoreó la recaptura de la DA en sinaptosomas estriatales (Ramassamy *et al.*, 1990; Ramassamy *et al.*, 1992). La acción protectora del extracto no depende de la inhibición de la recaptura neural del MPP⁺; sino de las concentraciones del EGb 761 requeridas para inhibir la recaptura de la DA (>250 µg/ml) que son mayores a las que se alcanzan *in vivo* (Ramassamy *et al.*, 1992).

En otros estudios, se observó que la incubación prolongada (60 minutos) de sinaptosomas estriatales en un medio oxigenado que contiene concentraciones de ácido ascórbico 0.01-1.0 mM produjo un decremento en la concentración de la DA dosis-dependiente. Esta reducción de la cantidad de la DA fue revertida por el EGb 761 (10 µg/ml) o por trolox C, un antioxidante (0.1 mM) (Ramassamy *et al.*, 1992).

2.11.4. Usos terapéuticos del EGb 761

El EGb 761 se utiliza actualmente en el tratamiento de desórdenes cerebrales causados por hipoxia e isquemia durante la insuficiencia cerebral, en donde se presentan síntomas como confusión, dificultades en la concentración y memoria (Halama *et al.*, 1988); enfermedades neurodegenerativas en donde procesos peroxidativos pueden operar (DeFeudis, 1991; Karcher *et al.*, 1984); en enfermedades donde los radicales libres estén implicados; desórdenes psíquicos y conductuales de la edad avanzada; demencia degenerativa, demencia vascular (Kanowski *et al.*, 1996) y demencia tipo Alzheimer de leve a moderada (Maurer *et al.*, 1997), deficiencia vascular periférica (Bauer, 1984; Clissold *et al.*, 1987);

deficiencia retinal de origen isquémico (DeFeudis, 1991) y en desórdenes neurosensoriales como son el vértigo, el zumbido en los oídos y la pérdida del equilibrio (Baschek y Steinert, 1988).

Otras posibles indicaciones terapéuticas del EGb 761 que derivan de sus estudios clínicos podrían ser; su uso en cirugías a corazón abierto, en embolias, en la polineuropatía diabética, en el tratamiento del estrés oxidativo inducido por luz ultravioleta, en el edema cíclico idiopático, en la enfermedad de montaña aguda y en el síndrome de Raynaud (DeFeudis, 1998). Los estudios de Emerit (1995 a,b) proveen de un fuerte sustento para utilizar el EGb 761 como agente anticarcinogénico por la capacidad su alta efectividad en atrapar radicales libres y tener actividad antioxidante.

3. JUSTIFICACIÓN

El estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de la EP y en la neurotoxicidad inducida por el MPP⁺. Los compuestos que tengan actividad antioxidante y de atrapadores de radicales libres pueden proponerse como tratamientos potenciales en la prevención del daño celular

El EGb 761 es un agente antioxidante, atrapador de radicales libres y tiene efectos en el metabolismo de la DA.

En este trabajo se evaluó la capacidad del EGb 761 para proveer neuroprotección en la PL inducida por el MPP⁺ y evitar la disminución de la DA en las neuronas del CE.

4. HIPÓTESIS

Si el EGb 761 es un potente agente antioxidante, atrapador de radicales libres, reduce la pérdida de DA, restablece el metabolismo energético y la función mitocondrial, entonces tendrá un efecto protector al administrar la neurotoxina, ya que los mecanismos de daño celular del MPP⁺ descritos previamente son la formación excesiva de radicales libres, el bloqueo de la respiración mitocondrial y la disminución de ATP al atacar a la mitocondria. De esta manera, se sugiere encontrar neuroprotección tanto en la PL como en la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por el MPP⁺.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto del EGb 761 en el daño neurotóxico producido por la administración del MPP⁺.

Objetivos particulares

La evaluación experimental de esta tesis está enfocada hacia los siguientes puntos:

- Evaluar el efecto dosis respuesta del EGb 761 en la PL, como un índice del daño producido por el estrés oxidativo, inducido por la administración del MPP⁺
- Evaluar el efecto del EGb 761 a diferentes tiempos de administración de la neurotoxina por medio de la PL.
- Determinar el efecto del EGb 761 a diferentes dosis de MPP⁺ para relacionar la acción del extracto con la extensión del daño, mediante la PL como un índice del efecto biológico de los radicales libres.
- Analizar la acción del EGb 761 en la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por el MPP⁺, evaluando el contenido de DA estriatal a diferentes tiempos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Animales

Para los experimentos se utilizaron ratones macho de la cepa C-57 black (25-30 g) de 11 a 13 semanas de edad provenientes del bioterio local. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar (ciclo de 12:12h luz /oscuridad, 21-22 °C) con alimento y agua a libre acceso.

6.2. Drogas y Reactivos

El yoduro de MPP⁺ se obtuvo de Research Biochemicals Incorporated (Wayland, MA). El EGb 761 fue donado por la compañía farmacéutica Farmasa Schwabe de México. Este extracto se disolvió en solución salina y el pH se ajustó a 7.4. El octil sulfato de sodio se obtuvo de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El metanol para HPLC de Baker (México). Los otros reactivos usados en este estudio fueron obtenidos de Merck, México.

6.3. Pretratamiento con EGb 761 y administración de MPP⁺

Se utilizaron cuatro grupos experimentales para cada objetivo (Tabla 2). Terminado el pretratamiento de 17 días para cada uno de los grupos, se anestesió a los animales por exposición a éter y se inyectó 3 µl en el ventrículo lateral derecho (icv) con el tratamiento correspondiente. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical a los tiempos indicados en la Tabla 2. Los cerebros fueron removidos inmediatamente y se obtuvo el CE para procesarlo y medir la PL por formación de productos fluorescentes lipídicos (PFL), así como el análisis del contenido de DA en el CE.

Tabla 2. Grupos experimentales

	Pretratamiento (ip) durante 17 días	Tratamiento (icv)	Tiempos (h)	Evaluación en CE
Dosis Respuesta del EGb 761	Salina	Salina	2	PL
	EGb 761 (0.63, 1.25, 2.5, 5, y 10 mg/kg)	Salina	2	PL
	Salina	MPP ⁺ (0.72 mg/kg)	2	PL
	EGb 761 (0.63, 1.25, 2.5, 5, y 10 mg/kg)	MPP ⁺ (0.72 mg/kg)	2	PL
Tiempos de administración de MPP ⁺	Salina	Salina	0.5, 1, 2 y 24	PL
	EGb 761 (10 mg/kg)	Salina	0.5, 1, 2 y 24	PL
	Salina	MPP ⁺ (0.72 mg/kg)	0.5, 1, 2 y 24	PL
	EGb 761 (10 mg/kg)	MPP ⁺ (0.72 mg/kg)	0.5, 1, 2 y 24	PL
Dosis Respuesta de MPP ⁺	Salina	Salina	2	PL
	EGb 761 (10 mg/kg)	Salina	2	PL
	Salina	MPP ⁺ (0.18, 0.36 y 0.72 mg/kg)	2	PL
	EGb 761 (10 mg/kg)	MPP ⁺ (0.18, 0.36 y 0.72 mg/kg)	2	PL
Contenido de DA en el CE	Salina	Salina	2, 24 y 168	DA
	EGb 761 (10 mg/kg)	Salina	2, 24 y 168	DA
	Salina	MPP ⁺ (0.72 mg/kg)	2, 24 y 168	DA
	EGb 761 (10 mg/kg)	MPP ⁺ (0.72 mg/kg)	2, 24 y 168	DA

CE, cuerpo estriado, DA, dopamina, h, horas, icv, intracerebroventricular, ip, intraperitoneal, PL, peroxidación de lípidos, MPP⁺ ion 1-metil-4-fenilpiridino

6.4. Evaluación de la PL

La PL se evaluó con la técnica de formación de productos fluorescentes lipídicos (PFL) (Rojas y Ríos, 1993).

Después de obtener el CE y pesar el tejido se homogeneizó en 2.5 ml de buffer de fosfatos (pH 7.0). Se tomaron alícuotas de 1 ml del homogenado y se colocaron en tubos de vidrio con tapa. Se adicionó 3 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v). Los tubos se taparon, se agitaron suavemente y se mantuvieron en hielo durante 30 min para la separación de las fases. La fase acuosa se descartó y 1 ml de la fase clorofórmica se transfirió a celdas de cuarzo, en las cuales se adicionó 0.1 ml de metanol.

Se midió la fluorescencia en un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS50B con una longitud de onda de excitación de 370 nm y 430 nm de emisión. Previamente a la medición de las muestras, la sensibilidad del espectrofotómetro de fluorescencia se ajustó a 140 unidades de fluorescencia con un estándar de quinina (0.1 µg/ml) preparado en ácido sulfúrico 0.05 M. Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia/gramo de tejido húmedo/ml de extracto leído. Las muestras fueron medidas por duplicado.

6.5. Análisis del Contenido de DA Estriatal

Después de obtener y pesar el CE el tejido se almacenó a -70°C hasta su análisis. Se homogeneizó el tejido en 500 µl de solución antioxidante (metabisulfito de sodio 0.5 mM y ácido perclórico 0.1% p/v) utilizando un sonicador Lab-line ultratip labsonic system (Lab-line instruments, Melrose Park, IL) La muestras se centrifugaron a 4000 g durante 15 minutos en una centrifuga Beckman J-21C a 4°C , el sobrenadante se filtró en Millipore 0 22 µm antes de la inyección en el cromatógrafo. Para determinar el contenido de DA en cada muestra de CE se empleó el cromatógrafo de líquidos LC 250 Perkin Elmer con un asa de 20 µl y detector electroquímico Metrohm 656. Los picos se integraron automáticamente en el integrador Hewlett-Packard 3396-II. La curva de calibración se construyó para la

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación del efecto dosis respuesta del EGb 761 en la PL inducida por MPP⁺

La administración del EGb 761 a diferentes dosis, no tiene efectos sobre la PL como se observa en la figura 5.

Por el contrario, la administración de MPP⁺ (0.72 mg/kg) incrementó la PL 2 horas después (72% de aumento comparado con el grupo control, $p < 0.01$) como previamente lo reportaron Rojas y Ríos (1993) (Figura 6).

En los grupos pretratados con EGb 761 a las dosis empleadas (0.63, 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/kg) se observó una reducción significativa en los niveles de PL inducidos por el MPP⁺ con un patrón de dosis dependencia (Figura 6). La disminución de los valores de PL fue de 65%, 93% y 100% para las dosis de 2.5, 5 y 10 mg/kg de EGb 761, respectivamente, cuando se comparan con el grupo "salina + MPP⁺".

El grupo que recibió pretratamiento con la dosis más alta de EGb 761 (10 mg/kg) logró reducir completamente la PL inducida por el MPP⁺ (la formación de PFL de este grupo no fue estadísticamente diferente al grupo "salina+ salina").

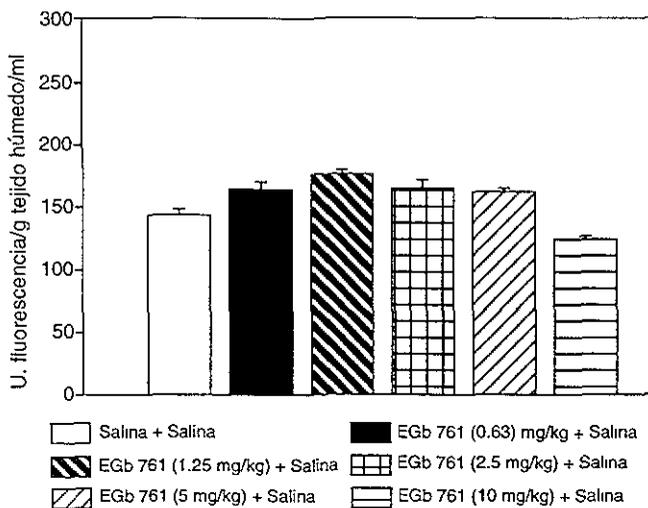


Figura 5. Formación de productos fluorescentes lipídicos en el cuerpo estriado 2 h después de la administración intracerebroventricular de solución salina en animales previamente tratados con EGb 761 a diferentes dosis (0.63, 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/kg, i.p.) durante 17 días. Los resultados se expresan como el promedio \pm ES, n=6 experimentos independientes. No hubo diferencias significativas ANOVA $F=10.620$, $p>0.05$

7.2. Efectos del EGb 761 en la PL a diferentes tiempos de administración del MPP⁺

Después de 30 y 60 minutos de la administración del MPP⁺ (0.72 mg/kg) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la formación de PFL con respecto al grupo control "salina + salina" (Tabla 3).

En contraste, 2 y 24 horas posteriores a la administración del MPP⁺ se observó un incremento en la PL de 72% y 25% comparadas con el control, respectivamente.

El pretratamiento con EGb 761 (10 mg/kg) no tiene efectos en la formación de PFL a 30 y 60 minutos después de la administración de MPP⁺. A 2 y 24 horas el EGb 761 (10 mg/kg) disminuyó la PL, se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo "salina + MPP⁺". Los grupos pretratados con EGb 761 no fueron diferentes al grupo control "salina + salina".

7.3 Efectos del EGb 761 en la PL a diferentes dosis de MPP⁺

Se utilizaron diferentes dosis de MPP⁺ (0.18, 0.36 y 0.72 mg/kg) para relacionar la dependencia en la formación de PFL 2 horas después de su administración.

Como se observa en la figura 7, hay un claro patrón dosis respuesta como previamente reportaron Rojas y Ríos (1993).

A la dosis más baja de MPP⁺ (0.18 mg/kg) no se encontró un incremento en la formación de PFL comparado con el grupo control. A la dosis de 0.36 mg/kg, los niveles de PFL incrementaron 22% con respecto a los valores del control. A la dosis más alta de MPP⁺ (0.72 mg/kg) la formación de PFL incrementó un 72% con respecto al grupo control.

El pretratamiento con EGb 761 (10 mg/kg) disminuyó significativamente la PL sólo a la dosis más alta MPP⁺ (0.72 mg/kg) pero no a dosis menores (0.18 y 0.36 mg/kg) de MPP⁺ (Figura 7).

Tabla 3. Efecto protector del EGb 761 en la neurotoxicidad inducida por MPP⁺

Tratamiento	U Fluorescencia/g de tej/ml Promedio ± ES
0.5 horas	
Salina + Salina	123.28 ± 8.65
EGb 761 + Salina	124.33 ± 12.06
Salina + MPP ⁺	144.92 ± 13.38
EGb 761 + MPP ⁺	149.71 ± 12.06
1 hora	
Salina + Salina	123.17 ± 7.17
EGb 761 + Salina	130.57 ± 3.03
Salina + MPP ⁺	148.42 ± 6.53
EGb 761 + MPP ⁺	148.38 ± 9.88
2 horas	
Salina + Salina	134.06 ± 5.87
EGb 761 + Salina	115.92 ± 5.68
Salina + MPP ⁺	231.15 ± 9.30 **
EGb 761 + MPP ⁺	129.84 ± 14.92 ++
24 horas	
Salina + Salina	136.96 ± 5.28
EGb 761 + Salina	136.29 ± 3.18
Salina + MPP ⁺	171.38 ± 11.89 *
EGb 761 + MPP ⁺	145.58 ± 1.95 +

Tabla 3 Formación de productos fluorescentes lipídicos a (0.5, 1, 2 y 24 h) después de la administración de MPP⁺ (0.72 mg/kg) a ratones pretratados con solución salina o EGb 761 (10 mg/kg, i.p.) durante 17 días. Los resultados se expresan como el promedio ± ES, n=6-8 experimentos independientes. ANOVA F=8.044, p<0.05. * p<0.05 respecto al control ("salina + salina") ** p<0.01 respecto al control ("salina + salina"), prueba de Tukey. + p<0.05 respecto al grupo con MPP⁺ ("salina + MPP⁺"), prueba de Tukey. ++ p<0.01 respecto al grupo tratado con MPP⁺ ("salina + MPP⁺"), prueba de Tukey.

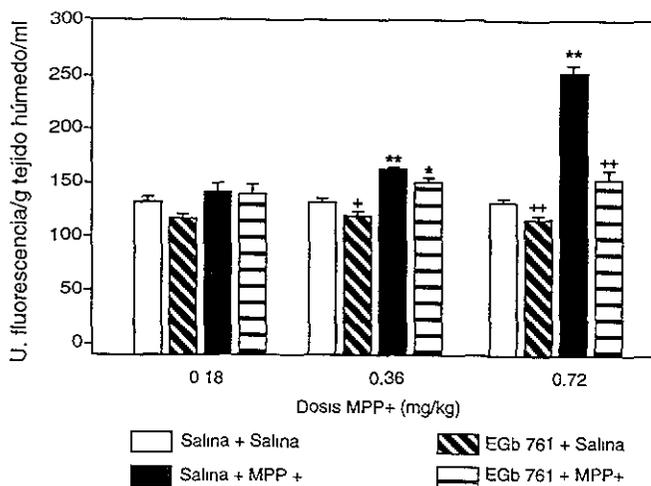


Figura 7. Formación de productos fluorescentes lipídicos en el cuerpo estriado 2h después de la administración intracerebroventricular a diferentes dosis de MPP⁺ (0.18, 0.36 y 0.72 mg/kg) a ratones previamente tratados con EGb 761 (10 mg/kg, i.p.). Los resultados están expresados como promedio \pm ES, n=6-8 experimentos independientes. ANOVA F=28.447, p<0.05. * p<0.05 respecto al control ("salina + salina"), prueba de Tukey. ** p<0.01 respecto al control ("salina + salina"), prueba de Tukey. + p<0.05 respecto al grupo con MPP⁺ ("salina + MPP⁺"), prueba de Tukey. ++ p<0.01 respecto al grupo con MPP⁺ ("salina + MPP⁺"), prueba de Tukey.

7.4. Efectos del EGb 761 en el contenido de DA en el CE después de la administración del MPP⁺

En la figura 8, se observa que el pretratamiento de EGb 761 (10 mg/kg) a los tiempos evaluados no causó efectos en el contenido de DA en el CE con respecto al control.

La administración de MPP⁺ a 2 horas no provocó efectos en la concentración de DA en el CE, a las 24 horas se observó una disminución significativa del 40% de DA y de 37% a los 7 días cuando se comparó con el grupo control (Figura 8).

En los grupos pretratados con EGb 761 (10 mg/kg) se observó un incremento del 32% en el contenido de DA con respecto al grupo "salina + MPP⁺" sólo 24 horas después. A los 7 días el EGb 761 no tuvo efectos en los niveles de DA después de la administración de MPP⁺.

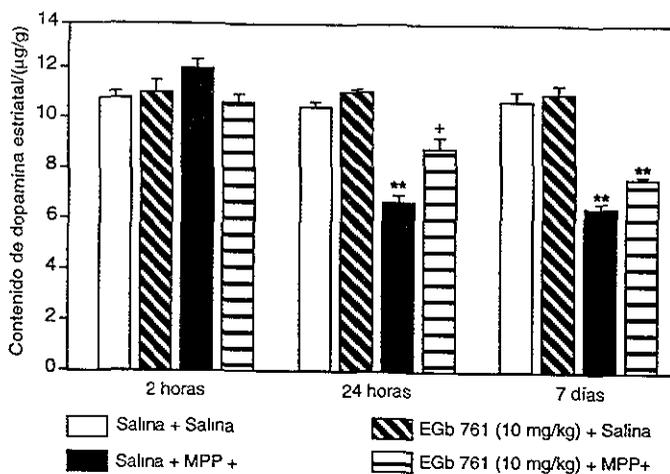


Figura 8 Contenido de dopamina en cuerpo estriado a diferentes tiempos (2h, 24h y 7 días) después de la administración de MPP⁺ (0.72 mg/kg) a ratones previamente tratados con EGb 761 (10 mg/kg). Los resultados están expresados como el promedio \pm ES, n=6-8 experimentos independientes. ANOVA F=11.9036, p<0.05 * p<0.05 respecto al control ("salina + salina"), prueba de Tukey. ** p<0.01 respecto al control ("salina + salina"), prueba de Tukey. + p<0.05 respecto al grupo con MPP⁺ ("salina + MPP⁺"), prueba de Tukey.

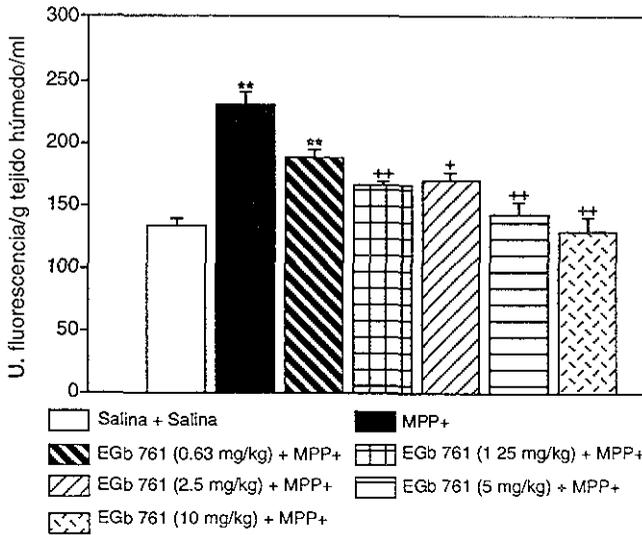


Figura 6. Formación de productos fluorescentes lipídicos en el cuerpo estriado 2h después de la administración de MPP⁺ (0.72 mg/kg) a ratones previamente tratados con diferentes dosis de EGb 761 (0.63, 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/kg, i.p) durante 17 días. Los resultados se expresan como el promedio ± ES, n=6-8 experimentos independientes. ANOVA F=10.620, p<0.05. ** p<0.01 respecto al control ("salina + salina"), prueba de Tukey † p<0.05 respecto al grupo con MPP⁺ ("salina + MPP⁺"), prueba de Tukey †† p<0.01 respecto al grupo con MPP⁺ ("salina + MPP⁺"), prueba de Tukey

8. DISCUSIÓN

Se encontró que el pretratamiento con EGb 761 a las dosis probadas no produjo cambios en los índices de PL (Figura 5), esto significa que el uso del fármaco no produce estrés oxidativo en el modelo experimental empleado.

La dosis más efectiva en evitar la PL inducida por el MPP⁺ fue la de 10 mg/kg (Figura 6), esto se considera como protección contra los efectos neurotóxicos del MPP⁺ teniendo un comportamiento dosis dependiente.

Esta dosis (10 mg/kg) se utilizó para analizar la formación de PFL a diferentes tiempos, a diferentes dosis de MPP⁺ y para evaluar el contenido de DA en el CE

La PL fue máxima a las 2 horas luego de la administración del MPP⁺ como reportaron Rojas y Ríos (1993) a tiempos menores no hubo efectos en la formación de PFL (Tabla 3), esto indica que los efectos neurotóxicos del MPP⁺ no se desencadenan inmediatamente, este proceso tarda varios minutos en alcanzar su máximo nivel, sin embargo después de 24 horas los valores de PL descienden dado que en este modelo experimental hay recuperación

El pretratamiento con EGb 761 protegió completamente a 2 y 24 horas contra la neurotoxicidad inducida por el MPP⁺ (Tabla 3), contrarrestando el incremento en la PL inducida por la neurotoxina.

Los datos sugieren que la formación de PFL es dependiente de la concentración de MPP⁺ (Figura 7) Es decir, a dosis bajas (0.18 mg/kg) de neurotoxina el daño fue imperceptible por lo tanto no se esperó que hubiera protección por parte del extracto al no haber incremento en la formación de PFL. A la dosis intermedia de MPP⁺ (0.36 mg/kg) se encontró un incremento del 22% en los niveles de PFL, sin embargo el extracto no fue capaz de contrarrestar el daño

producido. Con la dosis mayor (0.72 mg/kg) la PL incrementó el 72% con respecto al grupo control, en este caso el pretratamiento con el EGb 761 logró evitar completamente el daño producido por la neurotoxina. Lo anterior nos puede indicar que, el EGb 761 sólo protegió al CE cuando el daño fue mayor, parece ser que la intensidad del estrés oxidativo en el sistema influye en la efectividad del EGb 761.

Los posibles mecanismos por los que el EGb 761 protege del incremento en la PL en el CE podrían ser, la capacidad de los componentes del extracto para atrapar radicales hidroxilo, superóxido y peroxil que participan en la PL, así como de tener actividad antioxidante (Maitra *et al.*, 1995), ya que se conoce bien que el MPP⁺ provoca una sobreproducción de radicales libres (Wu *et al.*, 1993) y PL (Rojas y Ríos, 1993) en roedores.

El extracto posee un gran potencial para la protección neuronal contra el daño oxidativo, sin embargo no se determinó cual de las especies reactivas del oxígeno estuvo involucrada en este modelo.

Como apoyo a los resultados de este trabajo, existen numerosas evidencias que muestran el papel neuroprotector del EGb 761. El extracto protege a las neuronas contra el estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (Oyama *et al.*, 1996), se ha asociado con la reducción de edema y PL en el cerebro (Dorman *et al.*, 1992), reduce la PL en sistemas productores de radicales libres, previene la apoptosis inducida por el daño de los radicales hidroxilo y protege del estrés oxidativo en la mitocondria (Stoley *et al.*, 2000; Ni *et al.*, 1996; Ramassamy *et al.*, 1993; Pincemail *et al.*, 1985).

El EGb 761 es una mezcla estandarizada de diferentes compuestos activos y principalmente contiene 3 grupos: flavonoides, terpenoides y ácidos orgánicos. El EGb 761 muestra un perfil farmacológico heterogéneo, con diversos efectos sobre

los comportamientos, reológicos, metabólicos y neuroquímicos (DeFeudis, 1991). La fracción flavonoide ha demostrado ser muy efectiva como atrapadora de radicales superóxido (Ni *et al.*, 1996) e hidroxilo (Bors *et al.*, 1990) así como ser inhibidora de la PL (Afanas'ev *et al.*, 1989). Sin embargo, el diseño de los experimentos no permitió conocer cual componente del extracto es responsable del efecto neuroprotector contra la PL al haberlo utilizado en conjunto

La efectividad del EGb 761 en la neuroprotección podría deberse a un compuesto en particular, o bien, a la interacción de dos o más de ellos. Los flavonoides en su estructura química presentan anillos aromáticos y dobles enlaces en su estructura química por lo que reaccionan fácilmente con radicales hidroxilo y forman un producto de adición, atrapando directamente a los radicales hidroxilo. Los grupos hidroxil fenólico pueden quelar Fe^{2+} e indirectamente inhibir la formación de radicales hidroxilo (Havsteen, 1983); la presencia de dos a tres dobles enlaces en el anillo pirano central y dos grupos hidroxilo libres en la posición *ortho* del anillo B son esenciales en la efectividad contra los radicales libres e indirectamente participan en la inhibición de la PL.

Con respecto al contenido de DA en el CE se observó que el pretratamiento con EGb 761 (10 mg/kg) no causó cambios en la concentración del neurotransmisor con respecto al control (Figura 8), esto implica que el extracto no tiene efectos en la síntesis de la DA al no encontrar una variación en los niveles del neurotransmisor en el grupo "EGb 761 + salina". En contraste, se corroboró que la administración del MPP⁺ es capaz de disminuir hasta en un 40% los niveles de DA a las 24 horas y 37% a los 7 días.

La protección contra la neurotoxicidad dopaminérgica por parte del extracto sólo se observó a las 24 horas evitando la reducción de la DA en un 32%, sin

embargo a los 7 días, a pesar de encontrar todavía los niveles de DA disminuidos con respecto al control como consecuencia de la neurotoxicidad dopaminérgica del MPP⁺, no hubo protección por parte del extracto aunque se observó una ligera tendencia al incremento en la concentración de la DA.

Una posible explicación para entender lo anterior podría ser que al administrar EGb 761 durante 17 días se logra una acumulación y efectividad terapéutica máxima en el roedor, sin embargo al producir la lesión dopaminérgica con el MPP⁺ y hasta el día del sacrificio (7 días después) no se administró el EGb 761, debido a que el objetivo de este trabajo fue observar el efecto preventivo del extracto como tratamiento previo al daño y no así el resultado curativo o restaurador. Siendo factible que al transcurrir una semana el fármaco se haya eliminado por completo perdiendo así su efectividad en proteger a las neuronas en los índices medidos. Se sugiere realizar experimentos para observar que sucede cuando se continúa el tratamiento de EGb 761 posterior a la administración del MPP⁺ hasta el momento del sacrificio

Los resultados muestran que la PL sucede antes que el decremento de DA por efecto del MPP⁺ como reportaron previamente Rojas y Ríos (1993).

Ramassamy *et al.* (1992), han observado que el EGb 761 es capaz de prevenir el decremento en la recaptura de la DA en sinaptosomas bajo condiciones peroxidativas. Se ha reportado que los radicales libres pueden alterar la síntesis de la DA (Zaleska *et al.*, 1989), inducir la PL de las membranas y alterar los sistemas de recaptura de la DA (Rafalowska *et al.*, 1989). Posiblemente uno o más de estos mecanismos sea el responsable de la neurotoxicidad del MPP⁺ debido a que se producen radicales libres en exceso durante su administración

Existen dos reportes donde el EGb 761 puede proteger contra la neurotoxicidad de la MPTP (protoxina de la MPP⁺) evaluando el contenido de DA en CE. En este proceso se ha propuesto que esté involucrada la inhibición de la actividad de la enzima MAO (Ramassamy *et al.*, 1990; Wu y Zhu, 1999) La MAO-B es requerida para la biotransformación de la MPTP al metabolito tóxico estable el MPP⁺. Sin embargo en este trabajo el efecto protector del EGb 761 no está relacionado con el bloqueo de esta enzima en la biotransformación de MPTP a MPP⁺, ya que se administró directamente el MPP⁺ en el ventrículo lateral derecho, la neurotoxina que produce el daño celular.

Por otra parte, se ha demostrado que el EGb 761 tiene alta afinidad por el CE (Moreau *et al.*, 1986), esto lo hace una droga candidato para proteger contra la neurotoxicidad del MPP⁺ y posiblemente en un futuro utilizarla en la clínica para el tratamiento de la EP idiopática.

Con esto, se aportará más al conocimiento del papel del EGb 761 en un modelo experimental de la EP. Este trabajo muestra que el EGb 761 protege al CE de la PL inducida por MPP⁺ y protege parcialmente de la disminución de la DA, posiblemente actuando como un potente agente antioxidante o atrapador de radicales libres.

El EGb 761 al ser un fitofármaco no produce efectos colaterales graves (Hanzel y Trunzler, 1989) como en el caso de la L-DOPA, el fármaco tradicional para el tratamiento sintomático de la EP que sólo disminuye la sintomatología temporalmente. Este extracto ha sido extensamente estudiado en los últimos 40 años en Francia y Alemania principalmente. Actualmente se utiliza en humanos para el tratamiento de la demencia degenerativa primaria, vascular o tipo Alzheimer,

enfermedad vascular cerebral, pérdida de la memoria, vértigo y tinnitus; algunas de estas asociadas con la producción de radicales libres como es el caso de la EP.

Finalmente, aunque en México, la prevalencia de la EP es baja (40-50/100,000 habitantes) es muy importante poner especial atención y destinar investigación científica hacia el conocimiento, manejo y tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas como la EP, debido a que la esperanza de vida ha aumentado en las últimas décadas. Actualmente la población de individuos mayores de 65 años o más de edad asciende al 12 o 13% de la población mexicana, por lo que en unos años se espera que las enfermedades neurodegenerativas se incrementen sorprendentemente.

9. CONCLUSIONES

- El pretratamiento con EGb 761 no produce efectos en la PL ni en la concentración de DA en el CE.
- La dosis más efectiva en producir neuroprotección evaluada como PL y contenido de DA en CE es de 10 mg/kg/día.
- El EGb 761 protege a las neuronas del CE contra la PL inducida por el MPP⁺ posiblemente actuando como un potente agente antioxidante o atrapador de radicales libres.
- La PL más elevada sucede a las 2 horas después de la administración de MPP⁺ siendo completamente inhibida por el pretratamiento con EGb 761.
- La formación de PFL es dependiente de la dosis de MPP⁺, el EGb 761 sólo protege cuando la intensidad del daño es mayor.
- Los compuestos del EGb 761 previenen parcialmente el daño celular a las neuronas dopaminérgicas evitando la reducción en la cantidad de DA estriatal asociado a la administración de MPP⁺.
- Con más investigación el EGb 761 se puede proponer como una alternativa de terapia de apoyo en el tratamiento de pacientes con EP por su acción neuroprotectora.

10. APÉNDICES

A.1. Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson

A.1.1. Modelo colinérgico

Las drogas colinérgicas inducen síntomas parkinsonianos como el temblor, la rigidez, la catalepsia y la acinesia, los agentes colinérgicos principalmente son la tremorina y la oxotremorina (Brimblecome y Pinder, 1972). Sin embargo, el temblor inducido por agonistas colinérgicos semeja más una condición de intoxicación colinérgica (Duvoisin, 1976).

A.1.2. Lesiones neuronales no selectivas

En los modelos quirúrgicos se realizan lesiones estereotáxicas en la vía nigroestriatal de monos, dañando las terminales dopaminérgicas, produciendo temblor, bradicinesia y rigidez, asociados con la disminución de DA en el caudado y el putamen (Poirier *et al.*, 1966). Sin embargo, este modelo no es selectivo porque es muy difícil dañar una sola vía sin afectar el tejido cerebral circundante (Zigmond y Stricker, 1984).

A.1.3. Modelo del envejecimiento

Con el envejecimiento se ha propuesto que las neuronas de la vía nigroestriatal pueden producir toxinas específicas del metabolismo dopaminérgico (radicales libres, quinonas, toxinas endógenas y exógenas), contribuyendo a la patogénesis de la EP (Shoulson, 1989).

A.1.4 Modelos químicos

El empleo de diversas drogas, químicos o neurotoxinas específicas han mostrado inducir síndromes parkinsonianos alterando la transmisión dopaminérgica en el sistema nervioso central por diversos mecanismos: afectando la síntesis, el almacenaje o la secreción de neurotransmisores, o bien, dañando los sitios

receptores. Estos efectos pueden ser permanentes o transitorios. Las toxinas como la 6-OH-DA, el manganeso y la MPTP destruyen neuronas selectivamente similar a lo que sucede en la EP.

A.1.4.1. Reserpina

Uno de los primeros modelos experimentales de la EP fue la administración de reserpina al ratón (Carlsson *et al.* 1957), observando hipocinesia y disminución de las monoaminas siendo estas reversibles al utilizar la L-DOPA. La reserpina interfiere con el almacenamiento de la DA, la noradrenalina y la serotonina en los gránulos intracelulares conduciendo a la reducción principalmente de la DA en las terminales nerviosas. Los síntomas que produce son sedación, hipocinesia, rigidez, catalepsia y con frecuencia temblor (Hornykiewicz, 1966), siendo reversibles y no selectivos.

A 1.4.2. 6-hidroxi dopamina (6-OH-DA)

La 6-hidroxi dopamina (6-OH-DA) destruye selectivamente sistemas catecolaminérgicos por su similitud estructural con las catecolaminas, siendo capaz de concentrarse en las terminales de estas neuronas por el sistema de transporte de alta afinidad que existe en sus membranas (Sachs y Jonsson, 1975) La 6-OH-DA se administra en los ventrículos laterales del cerebro de la rata 30 min después de la inyección sistémica de desmetilimipramina (un inhibidor de alta afinidad del transporte de la norepinefrina) bloqueando así los efectos tóxicos de la 6-OH-DA en las neuronas que contienen esta catecolamina, resultando una pérdida de DA permanente y específica en el sistema nervioso central. Este modelo también degenera los axones de la vía nigroestriatal con la pérdida permanente de más del 95% de las terminales dopaminérgicas en el CE (Ungerstedt, 1971a, Bloom *et al.*, 1969).

Los síntomas observados son acinesia y catalepsia que pueden ser reversibles al administrar agonistas de la DA como la L-DOPA, la bromocriptina y la apomorfina. Cuando se administra bilateralmente en la sustancia negra de roedores, los animales presentan hipocinesia, afagia y adipsia, con la inyección unilateral se produce afagia y adipsia (Ungerstedt, 1971b)

A.2. Radicales libres y especies reactivas del oxígeno

Un radical libre es aquella especie química que posee uno o más electrones desapareados. Los radicales libres se generan por excitación electromagnética del oxígeno molecular (Figura 9), la degradación de especies reactivas del oxígeno y durante reacciones bioquímicas normales en el tejido. Los electrones no apareados hacen a estos compuestos altamente reactivos y pueden iniciar reacciones de peroxidación en varios sustratos importantes para la actividad celular como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (para una revisión ver Halliwell y Gutteridge, 1984).

A.2.1. Oxígeno singulete

Es una forma reactiva del oxígeno que no tiene electrones desapareados y por lo tanto no es un radical, tiene una vida media de 1×10^{-6} s y es un agente oxidante muy poderoso (Ross y Moldeus, 1991). La formación del oxígeno singulete ocurre *in vivo* en cloroplastos iluminados (Halliwell, 1981), en el cristalino y en la retina de los mamíferos (Landthaler, *et al.*, 1993). El oxígeno singulete es capaz de iniciar la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados dañando las membranas (Jamieson, 1986).

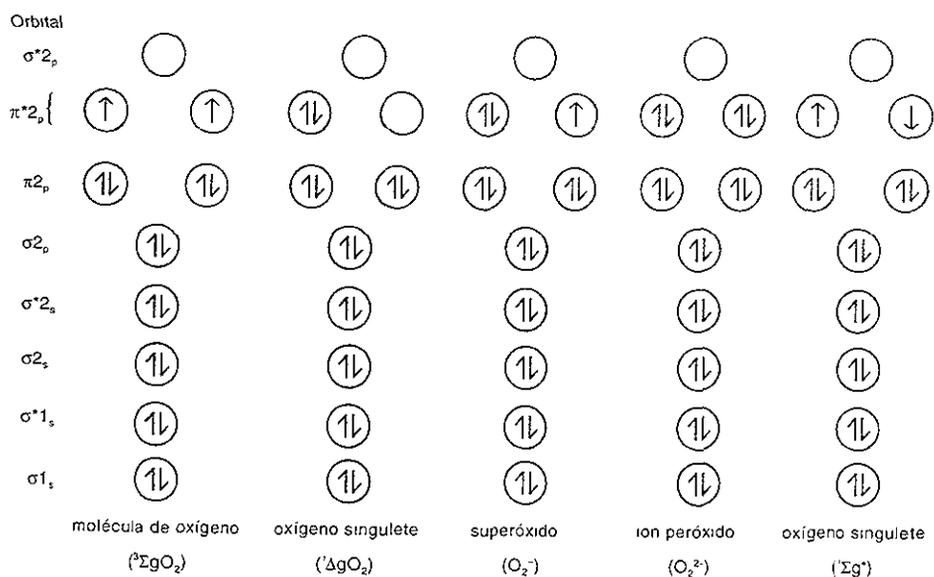


Figura 9 Representación esquemática de la formación de especies reactivas de la molécula diatómica de oxígeno O-orbital, I I electrones (tomado de Halliwell y Gutteridge, 1984)

A 2.2. Superóxido

El radical superóxido se obtiene cuando el oxígeno molecular se reduce por un electrón. El superóxido es una molécula con un electrón desapareado sorprendentemente inerte, tiene una vida media de 1×10^{-6} s, es un buen agente reductor (Ross y Moldeus, 1991), su principal reacción es la dismutación en la que reacciona con el mismo para formar peróxido de hidrógeno y oxígeno (Fridovich, 1995) por lo tanto es precursor de los agentes más reactivos.

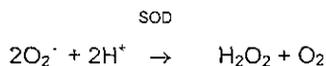
Este radical se forma *in vivo* en una gran variedad de células aeróbicas (Halliwell, 1981), debido a la actividad producida por la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, así como el retículo endoplásmico, que son sus principales fuentes. Otras células que producen superóxido son las fagocíticas, los monocitos, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos de varios tipos incluyendo las

células microgliales del cerebro (Colton y Gilbert, 1987), como una protección contra organismos que intentan infectar el sistema nervioso central (Curnutte y Babor, 1987).

El radical superóxido puede inactivar directamente algunas enzimas (Zhang *et al.*, 1990), junto con el radical óxido nítrico pueden reaccionar con el peroxinitrito determinando su reactividad en mediar reacciones oxidativas (Miles *et al.*, 1995) En presencia de peróxido de hidrógeno el radical superóxido puede ser precursor del radical hidroxilo (Buechter, 1988); y estar implicado en el daño tisular y la neurodegeneración (Jiang *et al.*, 1999).

A.2.3. Peróxido de hidrógeno

La adición de un segundo electrón al radical superóxido produce el ión peróxido, que no tiene electrones desapareados y por lo tanto no es un radical. Una vez formado el ion peróxido a pH fisiológico, se protona de inmediato y produce el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La dismutación del superóxido (O₂⁻) es la mayor fuente de H₂O₂, esta reacción la realiza la enzima superóxido dismutasa (SOD) para remover el superóxido.



El peróxido de hidrógeno es un agente oxidante, no muy reactivo pero penetra fácilmente las membranas celulares por difusión, al reaccionar con sustratos orgánicos es muy lento (Ross y Moldeus, 1991). En presencia del ión ferroso (Fe²⁺), se descompone en ion hidroxilo y en radical hidroxilo, el más citotóxico de todos los radicales capaz de atacar las estructuras orgánicas más estables (Halliwell y Gutteridge, 1984). El peróxido de hidrógeno puede ser removido de las células humanas por dos enzimas: la catalasa y la glutatión peroxidasa (Jain *et al.*, 1991)

Existen otras enzimas que producen peróxido de hidrógeno en los tejidos humanos, como la L-amino oxidasa y la monoamino oxidasa (MAO). La desaminación oxidativa de la DA por la MAO es la vía catabólica más importante en las terminales dopaminérgicas. En la EP hay un recambio acelerado de la DA que produce un incremento en la formación de peróxido de hidrógeno que puede

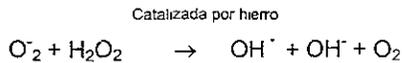
provocar una fuerza oxidante en las terminales dopaminérgicas que restan y así acelerar su destrucción (Cohen, 1988).

A.2.4. Radical hidroxilo

El peróxido de hidrógeno a su vez forma dos radicales hidroxilo (OH^\cdot), debido a la ruptura homolítica de enlace O-O de la molécula. Si el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se combina con los iones Fe^{2+} se forma el radical OH^\cdot por la reacción de Fenton:



Otra reacción conduce a la formación de radicales hidroxilo denominada reacción de Haber-Weiss:



El radical hidroxilo es el más dañino de todos los radicales libres producidos en las células, es extremadamente reactivo puede adicionar, abstraer y transferr electrones con casi cualquier biomolécula a pesar de que su distancia de difusión es muy pequeña y sólo existe por una pequeña fracción de segundo (1×10^{-9} s) (Yu, 1994).

Destruye enzimas, carbohidratos, altera el DNA (causando cambios químicos a las bases púricas y pirimídicas), daña los lípidos produciendo PL al remover o adicionar hidrógeno en las insaturaciones y altera la permeabilidad membranai hasta conducir a la muerte celular (Aruoma *et al.*, 1991).

A.2.5. Óxido nítrico

El óxido nítrico es un radical gaseoso que reacciona con el radical superóxido para formar un producto no radical conocido como peroxinitrito (Huie y Padmaja, 1993) que al descomponerse produce radicales hidroxilo (Beckman y Crow, 1993).

El peroxinitrito es citotóxico, es un agente muy oxidante capaz de causar daño celular, inactivación mitocondrial y dañar el DNA por desaminación (Beckman, 1991)

El óxido nítrico es liberado por varios tipos celulares, principalmente las células endoteliales y los fagocitos. (Moncada *et al.*, 1991), puede inactivar enzimas, inhibir la cadena de transporte de electrones y dañar la función mitocondrial (Richter *et al.*, 1994)

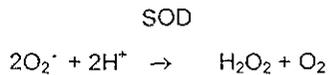
A.3. Protección contra los radicales libres

Existen varios mecanismos de defensa en la célula contra el ataque de los radicales libres, estos pueden ser enzimáticos, compuestos antioxidantes no específicos, atrapadores o inactivadores de radicales libres. A continuación se menciona algunos brevemente:

A.3.1. Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) es la enzima que atrapa al radical superóxido en las células descubierta por McCord y Fridovich (1969).

La SOD cataliza la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno. Existen dos isoenzimas SOD: la Cu-Zn-SOD en el citoplasma y la Mn-SOD en la mitocondria.



Las formas mutantes de las isoformas de la SOD son importantes en el origen de las enfermedades neurológicas como la esclerosis lateral amiotrófica (Hosler y Brown, 1995)

A.3.2. Catalasa

La catalasa (CAT) cataliza la transformación de peróxido de hidrógeno en agua.



En la célula comparte función con la glutatión peroxidasa, aproximadamente la mitad del peróxido de hidrógeno producido en la célula es destruido por la CAT. La CAT está distribuida en diversos tejidos, su actividad varía entre células y tejidos, por ejemplo en el cerebro hay poca actividad. La deficiencia de CAT existe, sin embargo es relativamente inocua (Babior, 1997).

A.3.3. Glutatión peroxidasa

La glutatión peroxidasa forma parte de un sistema donde operan dos enzimas, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa en un ciclo entre formas oxidadas y reducidas (Burk, 1990).

La glutatión peroxidasa se localiza en el citoplasma y en la matriz mitocondrial, esta enzima cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno para transformar el glutatión reducido a glutatión oxidado. Existen dos tipos de glutatión peroxidasa, la dependiente de selenio y la independiente de selenio (Yu, 1994).

La deficiencia de glutatión peroxidasa y glutatión reductasa produce anemia hemolítica severa que empeora cuando se emplean drogas oxidantes como la nitrofurantoina y ciertas sulfonamidas (Cohen *et al.*, 1985).

Estas dos últimas enzimas no actúan directamente sobre un radical libre, ya que el peróxido de hidrógeno no tiene electrones desapareados, sin embargo evitan que se forme el radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton. Por esta razón, las enzimas que inactivan al peróxido de hidrógeno previenen la formación de radicales libres y la PL.

A.3.4. Ceruloplasmina.

La ceruloplasmina es un transportador del cobre en el plasma sanguíneo (Linder y Hazegh-Azam, 1996), es considerado como el principal transportador de cobre del sistema nervioso central (Lee *et al.*, 1993, Crowe y Morgan, 1996)

El cobre es muy importante en el metabolismo de varios tejidos incluyendo el cerebro, la disminución del cobre en el tejido cerebral, trae como consecuencia una reducción en el funcionamiento de los complejos dependientes de cobre como son el complejo de cobre unido a metalotioneína (Cu-MT), la cual induce una mayor

tolerancia al daño provocado por radiaciones ionizantes (Sorenson *et al.*, 1995) y la superóxido dependiente de cobre. La ceruloplasmina tiene una actividad enzimática de ferroxidasa, es decir, que cataliza el paso del Fe^{2+} a Fe^{3+} , reduciendo el contenido tisular de Fe^{2+} disponible para la reacción de Fenton (Da Silva y Aust, 1993), por lo tanto disminuye los niveles del radical hidroxilo generado en dicha reacción. La capacidad de la ceruloplasmina en el secuestro y dismutación de especies reactivas del oxígeno como el radical superóxido, ha sido señalada como la responsable de sus efectos inhibidores de la PL (Goldstein, 1979).

A.3.5. Metalotioneínas

Las metalotioneínas (MTs) son proteínas de bajo peso molecular, ricas en cisteínas, captadoras de metales. Existen cuatro isoformas denominadas MT-I, MT-II (Kägi y Schaffer, 1988), MT-III (Uchida *et al.*, 1991; Masters *et al.*, 1994) y MT-IV (Quaife *et al.*, 1994). Son atrapadoras de radicales libres, aunque no se sabe el mecanismo exacto, se sugiere que los grupos tiol de la proteína sirven para unir las especies reactivas del oxígeno y en particular los radicales hidroxilo. *In vitro* se ha demostrado la capacidad de la MT de captar radicales hidroxilo (Thornalley y Vasak, 1985). También regula el metabolismo de los metales traza de importancia fisiológica como son el cobre y el zinc, destoxifica de metales dañinos y tiene actividad tanto antioxidante como atrapadora de radicales libres (Sato y Bremner, 1993).

A.3.6. Antioxidantes

Los agentes antioxidantes actúan dejando que los radicales libres sustraigan un átomo de hidrógeno de la molécula antioxidante y no de los ácidos grasos poliinsaturados, rompiendo la cadena de reacciones de los radicales libres para producir un radical antioxidante que es una especie no reactiva. Los principales antioxidantes reportados son la vitamina E (Mattill, 1947); pigmentos carotenoides capaces de atrapar al radical superóxido (Mathews, 1964); el ácido ascórbico (Fairhurst, 1983) y los compuestos que contengan flavonoides como es el caso del EGb 761 entre otros (Joyeux *et al.*, 1995; Pietri *et al.*, 1997)

A.4. Fitofármacos

Los fitofármacos forman parte de la terapéutica en la medicina científica y son utilizados para el tratamiento de enfermedades o padecimientos definidos. Las sustancias activas de las preparaciones vegetales, esencialmente extractos estandarizados, se elaboran en diversas presentaciones igual que los fármacos provenientes de la química sintética como: cápsulas, tabletas, grageas, ampollitas, pastas, ungüentos, geles, polvos, gránulos, gotas, soluciones, jugos e infusiones; empleados en el campo de la medicina científica, cuyos efectos farmacológicos se prueban en experimentos y cuya eficacia terapéutica se comprueba en estudios clínicos y por medio de la práctica médica (Hänsel, 1987).

Un fitofármaco se puede preparar a partir de.

- a) las partes vegetales cortadas o pulverizadas
- b) los jugos de la planta
- c) las tinturas, las maceraciones en aceite y los destilados
- d) los extractos de las partes de la planta, obtenidos por diferentes procedimientos, con solventes (Lozoya y Gómez, 1997).

En general, los fitofármacos, no son medicamentos para el tratamiento agudo o de urgencia sino en padecimientos crónicos en las vías respiratorias, en enfermedades gastrointestinales, problemas de circulación, dermatología, urología y trastornos cerebrales, pues se requiere de un uso prolongado para obtener los efectos deseados.

A diferencia de los fármacos sintéticos, la mayoría de los fitofármacos no producen efectos secundarios por lo que se caracterizan por un rango terapéutico amplio, lo cual permite una terapia con pocos efectos colaterales en general. (Hänsel y Trunzler, 1989).

A.5. Características de *Ginkgo biloba*

Reino Plantae

División: Ginkgophyta

Clase: Ginkgopsida

Orden: Ginkgoales

Familia: Ginkgoaceae

Género: *Ginkgo*

Especie: *Ginkgo biloba*

El *Ginkgo biloba* es la especie de árbol más vieja de las existentes y es el único descendiente vivo de un grupo de plantas que durante el Mesozoico se hallaba mucho más extendido. Los fósiles del *G. biloba* datan de 250 millones de años. De Asia fue introducido en las regiones templadas de Europa y América del Norte aproximadamente en el siglo XVII (Del Tredici, 1991). Pertenece a la clase Ginkgopsida, se categoriza en su propia división Ginkgophyta y representa a la única especie viva del orden Ginkgoales

Es sorprendentemente resistente a virus, bacterias, hongos e insectos y tiene un alto nivel de adaptabilidad al ambiente. Posee una gran longevidad, llegan a vivir mas de 1000 años. Sus frutas son parecidas a las nueces, pero despíden un olor desagradable a mantequilla rancia. De sus frutas y hojas se destilan diferentes extractos. Las raíces tienen una gran concentración del ingrediente activo de uno de los extractos (ginkgólidos) pero debido al lento crecimiento del árbol no es conveniente recolectarlas (Itil, 1995).

A.5.1. Descripción

El *Ginkgo biloba* es un árbol dioico (ejemplares masculinos y femeninos), con flores diclinas (cada árbol produce flores de un solo género), caducifolio (pierde sus hojas en otoño) que alcanza una altura máxima de 30-40 metros. A continuación se presenta una descripción breve de las características del *Ginkgo biloba* (Gifford y Foster, 1989; Bold *et al.*, 1987).

- Dosel: cilíndrico y de porte amplio
- Corteza: en un árbol joven es de color marrón grisáceo, mientras que en los ejemplares viejos suele ser marrón oscuro con hendiduras profundas.
- Hojas: tienen nervaciones dicotómicas que parten de la base, tienen forma de abanico y son carnosas, se agrupan en los tallos cortos en forma de ramilletes de dos a seis mientras que en los tallos largos aparecen dispuestas de forma alterna; son de color verde intenso, lisas en ambas caras cubiertas por una fina capa de cera. La lámina sale de un peciolo de 2 a 9 centímetros de longitud, con lo que las hojas pueden llegar a medir hasta 14 centímetros de largo y 13 de ancho. Las hojas más grandes, se hallan cerca del tronco y suelen producir retoños en los ejemplares de mayor edad. En otoño las hojas, antes de caerse, adquieren un color amarillo intenso
- Flores. Las flores brotan de ejes de hojas escamosas. Las inflorescencias masculinas tienen numerosos estambres, cada filamento presenta dos sacos de polen. Las flores femeninas dispuestas en largos pedúnculos, suelen portar dos cápsulas, aunque en ocasiones pueden contener tres o más. En las zonas de plantación la época de floración es en mayo encargándose el viento de la polinización.
- Semillas: Las semillas presentan dos hojas embrionarias por lo que es una planta dicotiledonea.

A.6. Estandarización del EGb 761

Aproximadamente de 100 kg de hojas de *G. biloba* se obtienen 2.5 kg de extracto que contiene según la Autoridad Alemana en Salud Federal. 22-27% glucósidos flavónicos; 5-7% terpenoides de los cuales 2.8-3.4% son ginkgólidos A, B, C, J y 2.6-3.2% son bilobálicos, menos de 1 ppm de alquilfenol; menos de 5 ppm de ácidos ginkgólicos; 6.5% proantocianidinas y de 5-10% de ácidos orgánicos. La desviación de los rangos incluye fluctuaciones obtenidas durante la producción y el análisis. (BGA-Kommission E, 1994)

Sin embargo, el producto final del EGb 761 controlado analíticamente contiene 24% de glucósidos flavónicos y 6% de terpenoides (3.1% ginkgólidos; 2.9% bilobálicos)(Drieu, 1988).

Otras fracciones del EGb 761 se han utilizado en diversos estudios como son, el LI 1370 que contiene 24% de glucósidos flavónicos; el CP 205 (fracción flavonoide); la fracción terpenoide; el GKA (ginkgólido A) , el GKB (ginkgólido B) y la fracción bilobálica.

A.7. Cultivo, Cosecha, Extracción y del EGb 761

Desde 1982 la farmacéutica Schwabe cuenta con plantaciones de árboles de *G. biloba* establecidas en la región de los Burdeos en Francia y en Carolina del Sur en los Estados Unidos de América que superan los 25 millones de árboles. Podan los árboles en invierno para tener una mayor producción de hojas, manteniéndolos a una altura de 1.80 m aproximadamente (DeFeudis, 1998).

Las hojas se colectan verdes entre agosto y septiembre, se dejan secar hasta que tengan una humedad de menos del 10% y se empacan para su extracción (Del Tredici, 1991). Se realiza un análisis de los constituyentes activos para asegurar la estandarización, pues estos dependen de variaciones estacionales

En la preparación del extracto se utilizan las hojas secas de alta calidad donde se mezclan con agua y acetona. Después de la evaporación de la acetona se realiza una serie de 18 pasos para eliminar sustancias indeseables (ácidos ginkgólicos y biflavonas) y para enriquecer el extracto en sustancias activas consideradas a ser relevantes en eficacia terapéutica (glucósidos flavónicos,

terpenoides). Los procedimientos de extracción y definición química están rigurosamente controlados y estandarizados (Figura 10).

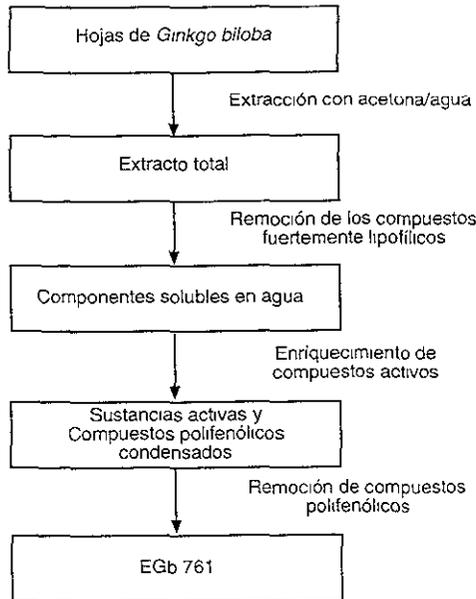


Figura 10. Esquema donde se muestra el procedimiento de extracción utilizado para preparar el EGb 761 de las hojas del *Ginkgo biloba* (Tomado de DeFeudis, 1998)

Los componentes del EGb 761 tienen diferentes actividades farmacológicas y sus proporciones relativas en el extracto están relacionadas con los efectos terapéuticos del extracto total

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J.D. Jr., Klaidman, L. K., Odunze, J. N., Shen H C., and Miller, C. A (1991) Alzheimer's and Parkinson's disease. Brain levels of glutathione, glutathione disulfide, and vitamin E. *Molec. Chem. Neuropath.* 14: 213-226
- Afanas'ev, I. B., Dorozhko, Al., Brodski, A. V., Kostyuk, V. A., and Potapovitch, A.I. (1989) Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38: 1763-1769.
- Aicaraz-Zubeldia, M., Rojas, P., Boll, C., and Ríos, C. (2001) Neuroprotective effect of acute and chronic administration of copper (II) sulfate against MPP+ neurotoxicity in mice. *Neurochem. Res.* (in press).
- Ali, S. F., David, S. N., Newport, G. D., Cadet, J. L., and Slinker, W. Jr. (1994) MPTP-induced oxidative stress and neurotoxicity are age-dependent: evidence from measures of reactive oxygen species and striatal dopamine loss. *Synapse.* 18: 27-34.
- Amri, H., Ogwuegbu, S. O., Boujrad, N., Drieu, K., and Papadopoulos, V. (1996) *In vivo* regulation of the peripheral-type benzodiazepine receptor and glucocorticoid synthesis by the *Ginkgo biloba* extract EGb 761 and isolated ginkgolides *Endocrinology.* 137: 5707-5718
- Appel, S. H. (1981) A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, parkinsonism and Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* 10: 499-505.
- Arai, N., Misugi, K., Goshima, Y., and Misu, Y. (1990) Evaluation of a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated C57 black mouse model for parkinsonism. *Brain Res.* 515: 57-63.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Gajewski., and Dizdarglu, M. (1991) Copper-iron dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 273: 2601-2604.
- Atella, M J., Hoffman, S. W., Stasio, M. J., and Stein, D. J (1989) *Ginkgo biloba* extract facilitates recovery from penetrating brain injury in adult male rats. *Exp Neurol.* 105: 62-71.
- Auguet, M., DeFeudis, F. V., Clostre, F., and Deghenghi, R (1982) Effects of an extract of *Ginkgo biloba* on arterial smooth muscle responses to vasoactive stimuli *Gen Pharmacol.* 13: 169-171.
- Auguet, M., Deiaflotte, S., Chabrier, P. E., and Braquet, P. (1994) *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and the regulation of vascular tone. In: *Advances in Ginkgo biloba Extract Research*, vol. 3. Cardiovascular Effects of *Ginkgo biloba* Extract (EGb 761), pp 19-26. Eds. F. Clostre and F. V. DeFeudis, Elsevier, Paris.
- Babor, B M. (1997) Superoxide. a two-edged sword *Braz J. Med. Biol Res* 30. 141-155.

- Barbeau, A., and Porcher, E. (1982) New data on the genetics of Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* 9: 53-60.
- Barden, H., and Levine, S. (1983) Histochemical observations on rodent brain melanin. *Brain Res. Bull.* 10: 847-851.
- Baschek, V., and Steinert, W. (1988) Differential diagnosis of sudden deafness and therapy with high dose infusions of *Ginkgo biloba* extract. In: *Vertigo, Nausea, Tinnitus and Hypoacusia in Metabolic Disorders*, pp. 575-582. Eds. C. F. Claussen, M. V. Kirtane and K. Schlitter, Elsevier. Amsterdam.
- Bauer, U. (1984) 6-Month double-blind randomized clinical trial of *Ginkgo biloba* extract versus placebo in two parallel groups in patients suffering from peripheral arterial insufficiency. *Arzneim. Forsch. Drug Res.* 34: 716-720.
- Beckman, J. S. (1991) The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J. Dev. Physiol.* 15: 53-59.
- Beckman, J. S., and Crow, J. P. (1993) Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem. Soc. Trans.* 21: 330-334
- Bezard, E., Boraud, T., Bioulac, B., and Gross, C. E. (1997a) Compensatory effects of glutamatergic inputs to the substantia nigra pars compacta in experimental parkinsonism. *Neuroscience.* 91: 399-404.
- Bezard, E., Imbert, C., Deloire, X., Bioulac, B., and Gross, C. E. (1997b) A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: evolution of motor symptoms in the monkey. *Brain Res.* 766: 107-112.
- BGA-Kommission E. (1994) Monographie: Trockenextrakt (35-67:1) aus *Ginkgo-biloba*-Blättern, extrahiert mit Aceton-Wasser. Bundesanzeiger (Banz), No. 133, p. 7361.
- Biber, A., and Chatterjee, S. S. (1995) Pharmacokinetics of ginkgolides A, B and bilobalide after PO administration of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) in the rat. *Internal Report*, Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co., Karlsruhe.
- Birkmayer, W., and Hornykiewicz, O. (1964) Weitere experimentelle Untersuchungen über L-DOPA beim Parkinson-Syndrom. *Arch. Psych. Neurol.* 206: 376.
- Bloom, F. E., Algeria, S., Groppetti, A., Revuelta, A., and Costa, E. (1969) Lesions of central norepinephrine terminals 6-OH dopamine: Biochemistry and fine structure. *Science* 166. 1284-1286.
- Bold, H. C., Alexopoulos, C. J., and Delevoryas, T. (1987) *Morphology of Plants and Fungi* 5th Ed. Harper Collins. New York.
- Bombardelli, E. (1991) Bilobalide derivatives, their applications and formulations containing them. *European Patent Application*. No EP A1

- Bors, W., Heller, W., Michel, C., and Saran, M. (1990) Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186: 343-355
- Brailowsky, S., and Montiel, T. (1997) Motor Function in Young and Aged Hemiplegic Rats: Effects of a Ginkgo biloba Extract. *Neurobiol. Aging.* 18: 219-227
- Brimblecombe, R. W., and Pinder, R. M. (1972) Tremors and tremorogenic agents *Scientifica.* Bristol.
- Buechter, D. D. (1988) Free radicals and oxygen toxicity. *Pharm. Res.* 5: 253-260.
- Burk, R. F. (1990) Protection against free radical injury by selenoenzymes. *Pharmacol. Ther.* 45: 383-385.
- Burns, R.S., Chiueh, C.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Jacobowitz, D.M., and Kopin, I. J. (1983) A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 4546-4556.
- Bustany, P., Denise, P., Pottier, M., and Moulin, M. (1992) Brain protein synthesis after unilateral labyrinthectomy: Natural one-month evolution and EGb 761 treatment effect. In: *Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) on the Central Nervous System* (Y. Christen, J. Costentin and M. Lacour, eds), pp. 57-74 Elsevier. Paris.
- Buu, N. T. (1993) Uptake of 1-methyl-4-phenylpyridinium and dopamine in the mouse brain cell nuclei. *J. Neurochem* (Rapid communication) 61: 1557-1560
- Calne, D. B., and Langston J. W. (1983) Etiology of Parkinson's disease. *Lancet.* 2: 1457-1459.
- Carlsson, A., Lindqvist, M., and Magnusson, T. (1957) 3,4-dihydroxyphenylamine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists *Nature.* 180: 1200.
- Cassarino, D. S., and Bennett J. P. Jr. (1999) An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration *Brain Research Reviews.* 29: 1-25.
- Clissold, S. P., Lynch, S., and Sorkin, E. M. (1987) Buflomedil: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in peripheral and cerebral vascular diseases *Drugs.* 33: 430-460
- Cohen, G. (1985) Oxidative stress in the nervous system. In *Oxidative Stress*, pp 383-402. Ed. H. Sies).
- Cohen, H. J., Chovaniec, M. E., Mistretta, D., and Baker, S. S. (1985) Selenium repletion and glutathione peroxidase-differential effects on plasma and red blood cell enzyme activity *Am. J. Clin Nutr.* 41: 735-747.

- Cohén, G. (1988) Oxygen radicals and Parkinson's disease. In: *Oxygen Radicals and Tissue Injury* pp. 130-135. Ed. B. Halliwell. FASEB.
- Colton, C. A., and Gilbert, D. L. (1987) Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS LETT.* 223: 284-288.
- Continella, G., and Drago, F. (1985) Behavioral effects of Ginkgo-biloba extract. In: *Effects of Ginkgo biloba Extract on Organic Cerebral Impairment* (A. Agnoli, J. R. Rapin, V. Scapagnini and W. V. Weitbrecht, eds.), pp. 35-42. John Libbey, London, Paris.
- Corsini, G. U., Pintus, S., Chiueh, C. C., Weiss, J. F., and Kopin, I. J. (1985) 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in mice is enhanced by pretreatment with diethyldithiocarbamate. *Eur. J. Pharmacol.* 119: 127-128.
- Crowe, A., and Morgan, E. H. (1996) Iron and copper interact during their uptake and deposition in the brain and other organs of developing rats exposed to dietary excess of the two metals. *J. Nutr.* 126: 183-194.
- Curnutte, J. T., and Babior, B. (1987) Chronic granulomatous disease. *Adv. Hum Genet.* 16: 229-297.
- Chacón, J. N., Chedekel, M. R., Land, E. J., and Truscott, T. G. (1987) Chemically induced Parkinson's disease: intermediates in the oxidation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine to the 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 144: 957-964.
- Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979) Hidroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605
- Chatterjee, S. S., and Gabard, B. (1981) Protective effect of an extract of *Ginkgo biloba* and other hydroxyl radical scavengers against hypoxia. *VIII Int. Congr. Pharmacol.*, Tokyo, p. 483.
- Chatterjee, S. S., and Gabard, B. (1984) Effect of an extract of *Ginkgo biloba* on experimental neurotoxicity. *Arch. Pharmacol.* 325 (Suppl.), Abstr. 327.
- Chiba, K., Peterson, L. A., Castagnoli, K. P., Trevor, A. J., and Castagnoli, N. (1985) Studies on the molecular mechanism of bioactivation of the selective nigrostriatal toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Drug Metab Dispos.* 13: 342-347
- Chiba, K., Trevor, A., and Castagnoli, N. Jr., (1984) Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 574-578.
- D'Amato, R. J., Benham, D. F., and Snyder, S. H. (1987) Characterization of the binding of N-methyl-4-phenylpyridine, the toxic metabolite of the parkinsonian neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, to neuromelanin. *J Neurochem* 48 653-658

Da Silva, D. M., and Aust, S. D. (1993) Ferritin and ceruloplasmin oxidative damage review and recent findings. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71: 715-720.

Davis, G.C., Williams, A.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Caine, E.D., Reichert, C.M., and Kopin, I J (1979) Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogs. *Psychiatry Res* 1: 249-254.

DeFeudis, F. V. (1991) *Ginkgo biloba* Extract (EGb 761): Pharmacological Activities and Clinical Applications, pp. 67-90. Elsevier. Amsterdam.

DeFeudis, F. V. (1998) *Ginkgo biloba* Extract (EGb 761): from Chemistry to the Clinic. pp. 401. Wiesbaden: Ullstein Medical.

Del Tredici, P (1991). Ginkgos and people. A thousand years of interaction. *Arnoldia* 51: 2-15.

Dexter, D. T., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid Y., Wells, F. R., Daniel, S. E., Lees, A. J., Jenner, P., and Marsden, C. D. (1991) Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain.* 114: 1953-1975.

Dexter, D., Carter, C., and Wells, F. (1989) Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 52: 381-389.

Di Monte, D., Ekstrom, G., Shinka, T., Smith, M. T., Trevor, A. J., and Castagnoli N, Jr. (1987). Role of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion formation and accumulation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity to isolated hepatocytes *Chem. Biol. Interact.* 62: 105-116.

Doly, M., Bonhomme, B., Cluzel, J., and Droy-Lefaix, M. T. (1994) Enhancement of retinal tolerance to glucose by administration of a *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 1587 (Abstr. No. 1531-2).

Doly, M., Braquet, P., Droy-Lefaix, M. T, Bonhomme, B, Ruchoux, M. M., and Meyniel, G. (1986) Alteration of electrophysiological function of isolated retina from alloxan-induced diabetic rats. Effect of treatment with *Ginkgo biloba* extract. *Neurochem. Pathol* 8. 15-26

Dorman, D. C., Coté, L. M., and Buck, W. B (1992) Effects of an extract of *Ginkgo biloba* on bromethalin-induced cerebral lipid peroxidation and edema in rats *Am. J. Vet. Res.* 53: 138-142.

Drieu, K. (1988) Preparation and definition of *Ginkgo biloba* extract In *Rökan, Ginkgo biloba: Recent Results in Pharmacology and Clinic*, pp. 32-36 Eds. E. W Füngeld Springer-Verlag Berlin.

Droy-Lefaix, M. T, Bonhomme, B., and Doly, M. (1991) Protective effect of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on free radical-induced changes in the electroretinogram of isolated rat retina *Drugs Exptl Clin Res* 17: 571-574

Drouet, I., Suaudeau, C., Dourmap, N., and Costentin, J. (1997) Mechanism of the hypothermic effect of MPP⁺ administered centrally in mice. *Neuropharmacology*. 36: 993-997.

Duvoisin, R. C (1976) Parkinsonism: animal analogues of the human disorder In: *The basal ganglia*, pp 293-303. Ed.. M. D. Yahr. Raven Press. New York

Eidelberg, E., Brooks, B. A., Morgan, W. W., Walden, J. J., and Kokemoor, R. H. (1986). Variability and functional recovery in the N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of parkinsonism in monkeys. *Neurosci. Lett*. 18: 817-822.

Elizan, T. S., and Casals, J. (1983) The viral hypothesis in Parkinsonism. *J. Neurol. Transm. Suppl.* 19: 75-88.

Elstner, E. F. (1990) *Der Sauerstoff*. Biochemie, Biologie, Medizin, BI Wissenschaftsverlag. Mannheim/Wien/Zürich.

Elsworth, J. D., Deutch, A. Y., Redmond, D. E., Taylor, J. R., Sladek, J. R., and Roth, R. H. (1989) Symptomatic and asymptomatic 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated primates: biochemical changes in striatal regions. *Neuroscience*. 33: 323-331.

Emerit, I., Arutyunyan, R., Oganessian, N., Levy, A., Cernjavsky, L., Sarkisian, T., Pogosian, A., and Asrian, K. (1995a) Radiation-induced clastogenic factors Anticlastogenic effect of *Ginkgo biloba* extract. *Free Rad. Biol. Med.* 18: 985-991.

Emerit, I., Oganessian, N., Sarkisian, T., Arutyunyan, R., Pogosian, A., Asrian, K., Levy, A., and Cernjavsky, L. (1995b) Clastogenic factors in the plasma of Chernobyl accident recovery workers: Anticlastogenic effect of *Ginkgo biloba* extract. *Radiat. Res.* 144: 198-205

Esterbauer, H., Zollner, H., and Schaur, R. J. (1990) Aldehydes formed by lipid peroxidation: mechanisms of formation, occurrence, and determination. In: *Membrane Lipid Oxidation*, edited by C. Vigo-Pelfrey. Boca Raton, FL: CRC. p. 240-268.

Fairhurst, S., Barber, D. J., Clark, B., and Horton, A. A. (1983). Development of the cytosolic defence system against microsomal lipid peroxidation in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 752: 491-496.

Ferraro, T. N., Golden, G. T., De Mattei, M., Hare, T. A., and Fariello, R. G. (1986) Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on levels of glutathione in the extrapyramidal system of the mouse. *Neuropharmacology*. 25: 1071-1074.

Foster, S., and Chongxi, Y. (1992) *Herbal emissaries*. Healing Arts Press. Rochester, Vermont.

Fourtillan, J. B., Brisson, A. M., Girault, J., Ingrand, I., Decourt, J. P., Drieu, K., Jouenne, P., and Biber, A. (1995) Propriétés pharmacocinétiques du bilobalide et

des ginkgolides A et B chez le sujet sain après administrations intraveineuses et orales d'extrait de *Ginkgo biloba* (EGb 761) *Thérapie*. 50: 137-144.

Frei, B., and Richter, C. (1986) N-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) together with 6-hydroxydopamine or dopamine stimulates Ca²⁺ release from mitochondria. *FEBS Lett.* 198. 99-102.

Endovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem* 64: 97-112.

Gardés-Albert, M., Ferradini, C., Sekaki, A., and Droy-Lefaix, M. T (1993) Oxygen-centered free radicals and their interactions with EGb 761 or CP 202. In: *Advances in Ginkgo biloba Extract Research.*), p.p. 1-11. Vol. 2. Ginkgo biloba Extract (EGb 761) as a Free-Radical Scavenger. Eds. Ferradini, C., Droy-Lefaix, M. T and Chrsten, Y. Elsevier. Paris.

Gerlach, M., Riederer, P., Przuntek, H., and Youdim, M. (1991) MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 208: 273-286.

German, D., C., Manaye, K. F., Sonsalla, P. K., and Brooks, B. A. (1992) Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease and MPTP-induced parkinsonism: sparing of calbindin-D28K containing cells. *Ann. NY. Acad. Sci.* 648 42-62

Gifford, E. M., and Foster, A. S. (1989) *Morphology and evolution of vascular plants* 3rd Ed. W. H Freeman and Company. New York.

Goetz, G.G. (1990) Dopaminergic agonists in the treatment of Parkinson's Disease. *Neurology* 46: 50-57.

Golbe, L. I., Di Iorio, G., Bonavita, V., Miller, D. C., and Duvoisin, R. C. (1990) A large Kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 27: 276-282.

Golbe, L. I., and Farrell, T. (1988) Case-control survey of early-adult dietary habits in Parkinson's disease. *Neurology*. 38. 204.

Goldstein, I. M., Kaplan, H. B., Edelson, H. S., and Weissman, G (1979) Ceuroloplasmin a scavenger of superoxide anion radicals *J. Biol. Chem.* 254: 4040-4045

Graham, D. G (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.* 14: 633-643.

Gutteridge, J. M. C., and Halliwell, B (1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 15: 129-134.

Halama, P., Bartsch, G., and Meng, G. (1988) Hirnleistungsstörungen vaskularer Genese Randomisierte Doppelblindstudie zur Wirksamkeit von Ginkgo-biloba-Extrakt *Fortschr. Med.* 106 408-412.

- Halliwell, B. (1981). In: *Age Pigments*, pp. 1-62. Ed. Sohal, R. S. Elsevier/North-Holand, Amsterdam.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1989) Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. *Acta Neurol. Scand.* 126: 23-33.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1984). Oxygen, toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease *Biochem. J.* 219: 1-14
- Hänsel R. (1987) *Terapia con Fitofármacos*. 219-246. Springer, Berlín.
- Hänsel, R., and G. Trunzler. (1989) *Información básica sobre los Fitofármacos*. Farmasa Schwabe. Alemania.
- Hantraye, P., Brouillet, E., and Ferrante, R. (1996) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. *Nat. Med.* 2: 1017-1021.
- Havsteen, B. (1983) Flavonoids, a clas of natural high pharmacological potency *Biochem. Pharmacol.* 32: 1141-1148.
- Heikkila, R.E., Hess, A., and Duvoisin, R.C. (1984) Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 224: 1451-1453
- Hirsch, E., Graybiel, A. M., and Agid, Y. A. (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature.* 334. 345-348.
- Hornykiewicz, O. (1966) Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function *Pharmacol Rev.* 18: 925-964.
- Hornykiewicz, O , and Kish, S. (1986) Biochemical Pathophysiology of Parkinson's Disease, In: *Advances in Neurology.* 45: 19-34. Eds. Yahr, M D., and Bergmann, K.J. Raven Press.
- Hosler, B A., and Brown, Jr. RH (1995) Copper/zinc superoxide dismutase mutations and free radical damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol.* 68: 41-46.
- Hon-Wei, T., and Yuan-Feen, T. (1993) MPTP-induced brain indoleamine changes are age-related and region-dependent in rats. *Neurosci. Res. Com.* 13: 1
- Huie, R. E., and Padmaja, S. (1993) The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Res. Commun.* 18: 195-199.
- Israel, L , Dell'Accio, E., Martin, G., and Hugonot, R. (1987) Extrait de *Ginkgo biloba* et exercices d'entraînement de la mémoire Evaluation comparative chez des personnes âgées ambulatoires *Psychol. Méd.* 19. 1431-1439
- Itil, T (1995) Natural sustances in psychiatry (*Ginkgo biloba* in dementia) *Psychopharmacology Bulletin.* 31: 147-158.

Jain, A., Martensson, J., Stole, E., Auld, P. A. M., and Meister, A. (1991) Inhibition of glutathione synthesis in the newborn rat: a model for endogenously produced oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 1913-1917

Jamieson, D., Chance, B., Cadenas, E., and Boveris, A. (1986) The relation of free radical production to hyperoxia. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 703-719

Javitch, J.A., and S.H. Snyder. (1984). Uptake of MPP+ by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP. *Eur. J. Pharmacol* 106: 455-456.

Javitch, J. A., D'Amato, R. J., Strittmatter, S. M., and Snyder, S. H. (1985) Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 2173-2177.

Jellinger, K. (1986) Pathology of parkinsonism, In: *Recent developments in Parkinson's disease*, p. 33-54. Eds. Fahn, S., et. al., Raven Press.

Jellinger, K., Kienzl, E., Rumpelmair, G., Riederer, P., Stachelberger, H., Ben-Shachar, D., and Youdim, M. B. H. (1992) Iron-melanin complex in substantia nigra of parkinsonian brains: an x-ray microanalysis. *J. Neurochem.* 59: 1168-1171

Jiang, X. R., Wrona, M. Z., and Dryhurst, G (1999) Tryptamine-4,5-dione, a putative endotoxic metabolite of the superoxide-mediated oxidation of serotonin, is a mitochondrial toxin: possible implications in neurodegenerative brain disorders. *Chem. Res. Toxicol.* 12: 429-436.

Jones, D. P., Thor, H., Smith, M. T., Jewell, S. A., and Orrenius, S. (1983) Inhibition of ATP-dependent microsomal Ca²⁺ sequestration during oxidative stress and its prevention by glutathione. *J. Biol. Chem.* 258: 6390-6393.

Jourdan, F., Rouiller, D., Didier, A., Droy-Lefaix, M. T., and Gervais, R. (1994) Effect of the extract of *Ginkgo biloba* on axotomy-induced degeneration of primary olfactory neurons in rats. *Soc. Neurosci. Abstr.* 20, 686 (Abstr. No. 291.10)

Joyeux, M., Lobstein, A., Anton, R., and Mortier, F (1995) Comparative Antilipoperoxidant, Antinecrotic and Scavenging Properties of Terpen and Biflavones from *Ginkgo* and some Flavonoids. *Planta Med.* 61. 126-129.

Kaas, G. E., Wright, J. M., Nicotera, P., and Orrenius, S. (1988) The mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity: role of intracellular calcium. *Arch. Biochem. Biophys.* 260: 789-797.

Kági, J. H. R., and Schaffer, A. (1988) Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* 27: 8509-8515.

Kanowski, S., Hermann, W. M., Stephan, K., Wierich, W., and Horr, R. (1996) Proof of efficacy of the *Ginkgo biloba* special extract EGb 761 in outpatients suffering from

mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia. *Pharmacopsychiat.* 29: 47-56.

Karcher, L., Zagermann, P., and Krieglstein, J. (1984) Effect of an extract of *Ginkgo biloba* on rat brain energy metabolism in hypoxia. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 327: 31-35.

Kelche, C., Roeser, C., Schumm, S., and Will, B. (1996) *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) can promote some behavioral recovery after septohippocampal damage in the rat, but its effects depend upon the degree of hippocampal deafferentation. In: *Advances in Ginkgo biloba Extract Research, vol. 5. Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) on Neuronal Plasticity* (Y. Christen, M. T. Droy-Lefaix and J. F. Macias-Núñez, eds.), pp. 85-100. Elsevier, Paris.

Kobuchi, H., Droy-Lefaix, M. T., Sekaki, A., and Gardes-Albert, M. (1997) *Ginkgo biloba* extract (EGb 761): Inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7. *Biochem Pharmacol.* 53: 897-903.

Kopin, I. J. (1986) MPTP effects on dopamine neurons. *Ann. New York Sci.* 451-461.

Kopin, I.J. (1987) Toxins and Parkinson's disease: MPTP parkinsonism in humans and animal. *Adv. Neurol.* 45: 137-144.(no esta)

Kostic, V., Donovan, D., Yokoyama, R., Przedborski, S., and Uhl, G. (1996) Transgenic mice with increases number of dopamine transporters (DAT) show greater sensitivity to MPTP. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22: 722.

Lamproglou, I., Boisserie, G., Vranck, R., Baillet, F., Bok, B., and Drieu, K (1997) Cognitive dysfunction induced by cranial irradiation: Effect of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) in 4-month-old male rats. In: *Advances in Ginkgo biloba Extract Research, vol 6. Adaptive Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761)* (V. Papadopoulos, K Drieu and Y. Christen, eds.) pp. 73-87. Elsevier, Paris.

Landthaler, M., Ruck, A., Szeimies, R M. (1993) Photodynamic therapy of skin tumors. *Hautarzt.* 44: 69-74.

Langston, J. W., Forno, L. S., Robert, C. S., and Irwin, I. (1984) Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res.* 292. 390-394.

Langston, W.J , Ballard, P., Tetrad, J.W , and Irwin, I (1983) Chronic, parkinsonism in human due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 219 979-980

Lee, S. H., Lancey, R., Montaser, A., Madani, N., and Linder, M. C (1993) Ceruloplasmin and cooper transport during the latter part of gestation in the rat. *Proc. Soc. Exp Biol. Med.* 203: 428-439.

Lees, A.J (1994) Levodopa substitution: the golden standard. *Clin Neuropharmacol* 17 S1-S7.

- Linder, M. C., and Hazegh-Azam, M. (1996) Cooper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 836S-841S.
- Lozoya, X., y Gómez, E. (1997) Fitofármacos. Simposio IMSS Farmasa/Schwabe 1. México.
- Maitra, I., Marcocci, L., Droy-Lefaix, M. T., and Packer, L. (1995) Peroxyl radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Biochem. Pharmacol.* 49: 1649-1655.
- Mann, D. M. A., and Yates, P. O. (1983) Pathological basis for neurotransmitter changes in Parkinson's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 9: 3-19.
- Mann, V. M., Cooper, J. M., Daniel, S. E., Path, F. R. C., Srai, K., Jenner, P., Marsden, C. D., and Schapira, A. H. V. (1994) Complex I, Iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra. *Ann. Neurol.* 36: 876-881.
- Marcocci, L., Maguire, J. J., Droy-Lefaix, M. T., and Packer, L. (1994) The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Biochem Biophys Res. Commun.* 201: 748-755.
- Markey, S. P., and Schmuff, N.R. (1986) The pharmacology of the parkinsonian syndrome producing neurotoxin MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) and structurally related compounds. *Med. Res. Rev.* 6: 389-429.
- Markey, S. P., Castagnoli Jr., N., Trevor, A.J., and Kopin, I.J. Eds. (1986) *MPTP A Neurotoxin Producing a Parkinsonian Syndrome*. Academic Press. New York
- Markey, S. P., Johannessen, J. N., Chiueh, C. C., Burns, R. S., and Herkenham, M. A. (1984) Intranueral generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature.* 311. 464-467.
- Marsden, C. D. (1992) Dopamine and basal ganglia disorders in humans. *Seminars Neurosci.* 4: 171-178.
- Masters, B. A., Kelly, E. J., Quafe, C. J., Brinster, R. L., and Palmiter, R. D. (1994) Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 584-588.
- Mathews, M. M. (1964) Protective effect of β -carotene against lethal photosensitization by haematoporphyrin. *Nature* (London). 203 1092.
- Mattill, H. A. (1947) Antioxidants. *Ann Rev. Biochem.* 16 177-192
- Maurer, K., Ihl, R., Dierks, T., and Frolich, L. (1997) Clinical efficacy of *Ginkgo biloba* special extract EGb 761 in dementia of the Alzheimer type. *J. Psychiat Res.* 31: 645-655.
- McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase and enzymic function for erythrocyte peroxidase. *J Biol Chem* 244: 6049-6055

Miles, A. M., Gibson, M. F., Kirshina, M., Cook, J. C., Paccelli, R., Wink, D., and Grisham, M. B. (1995) Effects of superoxide on nitric oxide-dependent N-nitrosation reactions. *Free Radic. Res.* 23: 379-390.

Moncada, S., Palmer, R. M. J., and Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43. 109-142.

Moreau, J. P., Eck, J., McCabe, J., and Skinner, S. (1986) Absorption, distribution et élimination de l'extrait marqué de *Ginkgo biloba* chez le rat. *Presse Méd* 15: 1458-1463.

Nakamura, S., and Vincent, S. R. (1986) Histochemistry of MPTP oxidation in rat brain: sites of synthesis of the parkinsonism-inducing toxin MPP+. *Neurosci. Lett.* 65: 321-325.

Naoi, M., Takahashi, T., Ichinose, H., and Magatsu, T. (1988) Inhibition of aromatic L-aminoacid decarboxylase in clonal pheochromocytoma PC12h cells by N-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152: 15-21.

Narasimhan, T. R., Kim, H. L., and Safe, S. H., (1989). Effects of sesquiterpene lactones on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Gen. Pharmacol.* 20: 681-687.

Ni, Y., Zhao, B., Hou, J., and Xin, W. (1996) Preventive effect of *Ginkgo biloba* extract on apoptosis in rat cerebellar neuronal cells induced by hydroxyl radicals. *Neurosci. Lett.* 214: 115-118

Nieder, M. (1991) Pharmakokinetik der Ginkgo-Flavonole im Plasma. *Munch Med Wochenschr.* 133 (Suppl. I), S61-S62.

Nöldner, M., and Chatterjee, S. S. (1994) Anxiolytic-like activity of bilobalide. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 349 (Suppl.) R 97 (Abstr. No 388)

Oduze, I. N., and Adams, J. D. (1990) MPTP toxicity in the mouse brain and vitamine E. *Neurosci. Lett.* 108: 346-349.

Olanow, C. W. (1993) A rationale for monoamine oxidase inhibition as a protective therapy for Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* 8: 81-87.

Oliver, C, Guillaume, V, Héry, F., Bourhim, N., Boiteau, K., and Drieu, K (1994) Effect of *Ginkgo biloba* extract on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and plasma catecholamine levels in stress. *Eur. J Endocrinol.* 130 (Suppl. 2). 207 (Abstr. No P3 072)

Oyama, Y, Chikahisa, L., Ueha, T., Kanemaru, K., and Noda K. (1996) *Ginkgo biloba* extract protects brain neurons against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Brain Res.* 712: 349-352

BRUNNEN
Pharmazeutisches Institut
D-34109 Kassel

Ozaki, N., Nakahara, D., Mogi, M., Harada, M., Kiuchi, K., Kaneda, N., Miura, Y., Kasahara, Y., and Nagatsu. (1988) Inactivation of tyrosine hydroxylase in rat striatum by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺). *Neurosci. Lett.* 85: 228-232.

Pietri, S., Maurelli, E., Drieu, K., and Culcasi, M. (1997) Cardioprotective and antioxidant effects of the terpenoid constituents of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29: 733-742.

Pifl, C., Schingnitz, G., and Hornykiewicz, O. (1990) Striatal and non-striatal neurotransmitter changes in MPTP parkinsonism in rhesus monkeys: the symptomatic versus the asymptomatic condition. *Neurochem. Int.* 17. Suppl: 295S-297S.

Pincemail, J., and Deby, C. (1986) Propriétés antiradicalaires de l'extrait de *Ginkgo biloba*. *Presse Méd.* 15: 1475-1480.

Pincemail, J., Deby, C., Lion, Y., Braquet, P., Hans, P., Drieu, K., and Goutier, R. (1985) In: *Flavonoids and Bioflavonoids*, p 243. Eds. L. Farkas, M., Gabor and F. Kallay, Szeged, Hungary.

Pincemail, J., Dupuis, M., Nasr, C., Hans, P., Haag-Berrurier, M., Anton, R., and Deby, C. (1989) Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of *Ginkgo biloba* extract. *Experientia.* 45: 708-712.

Pincemail, J., Thirion, A., Dupuis, M., Braquet, P., Drieu, K., and Deby, C. (1987) *Ginkgo biloba* extract inhibits oxygen species production generated by phorbol myristate acetate stimulated human leukocytes. *Experientia.* 43: 181-184

Poirier, J., Donaldson, J., and Barbeau, A. (1985) The specific vulnerability of the substantia nigra to MPTP is related to the presence of transition metals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129: 25-33.

Poirier, L. J., Sourkes, T. L., Bouvier, G., Boucher, R., and Carabin, S. (1966) Striatal amines, experimental tremor and the effect of harmaline in the monkey. *Brain* 89: 37-52.

Przedborski, S., and V. Jackson-Lewis (1998) Mechanism of MPTP Toxicity *Movement Disorders* 13 suppl. 1: 35-38.

Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., and Yokoyama, R. (1996) Role of neuronal nitric oxide in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)-induced dopaminergic neurotoxicity *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 4565-4571

Przedborski, S., Kostic V., Jackson-Lewis, V., Naini, A. B., Simonetti, S., Fahn, S., Carlson, E., Epstein, C. J., and Cadet, J. L. (1992) Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *J. Neurosci.* 12: 1658-1667.

- Rafalowska, U., Liu, G. J., and Floyd, R. A. (1989) Peroxidation induced changes in synaptosomal transport of dopamine and gamma-amino butyric acid. *Free Radic. Biol. Med* 6: 485-492
- Ramachandran, U., Divekar, H. M., Grover, S. K., and Srivastava, K. K. (1990) New Experimental model for the evaluation of adaptogenic products. *J. Ethnopharmacol.* 29: 275-281.
- Ramassamy, C., Clostre, F., Christen, Y., and Costentin, J. (1990) Prevention by a *Ginkgo biloba* extract (GBE 761) of the dopaminergic neurotoxicity of MPTP. *J. Pharm. Pharmacol.* 42: 785-789.
- Ramassamy, C., Clostre, F., Christen, Y., and Costentin, J. (1992) *In vivo Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects against neurotoxic effects induced by MPTP: Investigations into its mechanism(s) of action. In: *Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) on the Central Nervous System*, pp. 27-36. Eds. Y. Christen, J. Costentin and M. Lacour. Elsevier, Paris.
- Ramassamy, C., Girbe, F., Christen, Y., and Costentin, J. (1993) *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) or trolox C prevents the ascorbic acid/Fe²⁺ induced decrease in synaptosomal membrane fluidity. *Free Radic. Res. Commun.* 19: 341-350.
- Ramsay, R. R., and Singer, T. P., (1986) Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 261: 7585-7587.
- Ramsay, R. R., Kowal, A. T., Johnson, M. K., Salach, J. I., and Singer, T. P. (1987) The inhibition site of MPP⁺, the neurotoxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is near the Q-binding site of NADH dehydrogenase *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 645-649.
- Ramsay, R. R., Salach, J. I., Dadgar, J., and Singer, T. P. (1986) Inhibition of mitochondrial NADH dehydrogenase by pyridine derivatives and its possible relation to experimental and idiopathic parkinsonism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135: 269-275.
- Rapin, J. R., Lamproglou, I., Drieu, K., and DeFeudis, F. V. (1994) Demonstration of the "anti-stress" activity of an extract of *Ginkgo biloba* (EGb 761) using a discrimination learning task. *Gen. Pharmacol.* 25: 1009-1016.
- Riachi, N.J., LaManna, J. C., and Harik, S. I. (1989). Entry of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine into the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 249: 744-748.
- Richardson, J. S., Subbarao, K. V., and Ang, L. C. (1990) Biochemical indices of peroxidation in Alzheimer's and control brains. *Trans. Am. Soc. Neurochem.* 21: 113
- Richter, C., Gogvadze, V., Schlapbach, R., Schweizer, M., and Schlegel, J. (1994) Nitric oxide kills hepatocytes by mobilizing mitochondrial calcium. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 1143-1150.

Riederer, P., Sofic, E., Rausche, W. D., Schmidt, B., Reynolds, G. P., Jallinger, K., and Youdim, M. B. H. (1989) Transition metals, ferritin, glutathione and ascorbic acid in Parkinson brains. *J. Neurochem.* 52: 515-520.

Ríos, C., Alvarez-Vega, R., and Rojas, P. (1995) Depletion of copper and manganese in brain after MPTP treatment of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 76: 348-352

Ríos, C., and Tapia, R. (1987) Changes in lipid peroxidation induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium in mouse brain homogenates *Neurosci. Lett.* 77: 321-326.

Robbins, J. H., Otsuka, F., Tarone, R. E., Polinsky, R. J., Brumback, R. A., Nee, L. E. (1985) Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Hypersensitivity to X-rays in cultures cell lines. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 48: 916-923.

Rojas, P., and Ríos, C. (1993) Increased striatal lipid peroxidation after intracerebroventricular MPP+ administration to mice. *Pharmacol Toxicol.* 72: 364-368.

Rojas, P., and Ríos, C. (1995) Short-term manganese pretreatment partially protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Neurochem. Res.* 20: 1217-1223.

Rojas, P., and Ríos, C. (1997) Metallothionein inducers protect against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in mice. *Neurochem Res.* 22: 17-22

Rojas, P., Hidalgo, J., Ebadi, M., and Ríos, C. (2000b) Changes of metallothionein I + II proteins in the brain after 1-methyl-4-phenylpyridinium administration in mice *Prog Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 24: 143-154

Rojas, P., Rojas-Castañeda, J., Viguera, R. M., Habeebu, S M., Rojas, C., Ríos, C., and Ebadi, M. (2000a) MPTP decreases MT-I mRNA in mouse striatum. *Neurochem. Res.* 25: 503-509.

Rong, Y., Geng, Z., and Lau, B. H. (1996) *Ginkgo biloba* Attenuates Oxidative Stress in Macrophages and Endothelial Cells. *Free Rad. Biol. Med.* 20: 121-127.

Ross, D., and Moldeus, P. (1991) Antioxidant defense systems and oxidative stress In: *Membrane Lipid Oxidation*. Ed. C. Vigo-Pelfrey. Boca Raton, FL: CRC. 2: 151-170.

Ruiz, G., and Droy-Lefaix, M T (1992) Plasticity of visual pathways of the rat during postnatal development: Effect of the *Ginkgo biloba* extract (EGb 761). In. *Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) on the Central Nervous System* (Y Christen, J. Costentin and M. Lacour, eds.), pp. 89-94 Elsevier, Paris

Russ, H., Mihatsch, W., Gerlach, M., Riederer, P., and Przuntek, H (1991) Neurochemical and behavioural features induced by chronic low dose treatment with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the common marmoset implication for Parkinson's disease *Neurosci. Lett* 123: 115-118

- Sachs, C., and Jonsson, G. (1975) Mechanism of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem. Pharmacol.* 24: 1-8.
- Salach, J. I., Singer, T. P., Castagnoli, N. Jr., and Trevor, A. (1984) Oxidation of the neurotoxic amine 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) by monoamine oxidases A and B and suicide inactivation of the enzymes by MPTP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 831-835.
- Sastre, J., Millan, A., de la Asunción, J. G., Plá, R., Juan, G., Pallardó, F., O'Connor, E., Martin, J. A., Droy-Lefaix, M. T., and Viña, J. (1998) A *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 24, 2: 298-304.
- Sato, M., and Bremner, O. (1993) Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Rad. Biol. Med.* 14: 325-337.
- Sayre, L. (1989) Biochemical mechanism of action of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicology LETT.* 48: 121-149
- Schoenberg, B. S., Anderson, D. W., and Hacrer, A. F. (1985) Prevalence of Parkinson's disease in the biracial population of Copiah County, Mississippi. *Neurology.* 39: 841-845.
- Schulz, J. B., Matthews, R. T., Muqit, M. M. K., Browne, S. E., and Beal, M. F. (1995) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J. Neurochem.* 64: 936-939.
- Sahnoun, Z., Jamoussi, K., and Mounir-Zeghal (1997) Radicaux libres et anti-oxidants: physiologie, pathologie humaine et aspects thérapeutiques. *Thérapie* 52: 251-270.
- Sharma, H. S. Westman, J., Nyberg, F., Cervós-Navarro, J., and Dey, P. K. (1994) Neuroprotective effects of an extract of *Ginkgo biloba* (EGb 761) in heat stress induced brain damage in the rat. In: *Thermal Balance in Health and Disease: Advances in Pharmacological Sciences* pp. 461-467. Birkhäuser Verlag, Basel
- Shen, R.S., Abell, C. W., Gessner W., and Bossi, A. (1985) Serotonergic conversion of MPTP and dopaminergic accumulation of MPP⁺. *FEBS Lett.* 189: 225-230.
- Shifman, M. I., Fulop, Z. L., Hashemzadeh-Gargari, H., and Stein, D. G. (1996) Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on behavioral recovery and expression of NGF, GAP-43 and β -actin mRNA after inducing unilateral entorhinal cortex lesions. In: *Advances in Ginkgo biloba Extract Research, vol 5. Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761)* F. Clostre and F. V. DeFeudis, eds) pp. 95-104. Elsevier, Paris
- Siesjö, B. K., (1990) Calcium in the brain under physiological and pathological conditions. *Eur. Neurol. Suppl.* 2: 3-9

- Singer, T. P., and Ramsay, R. R. (1990) Mechanism of the neurotoxicity of MPTP. *FEBS Lett.* 274: 1-8.
- Sirinathsinghi, D. J. S., Heavens, R. P., and McBride, C. S. (1988) Dopamine-releasing action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) in the neostriatum of the rat as demonstrated *in vivo* by the push-pull perfusion technique. dependence on sodium but not calcium ions. *Brain Res.* 443: 101-116.
- Sloley, B. D., Urlichuk, L. J., Morley, P., Durkin, J., Shan, J. J., Pang, P.K.T., and Coutts, R. T. (2000) Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential neuroprotectant in extracts of *Ginkgo biloba* leaves. *J. Pharm. Pharmacol.* 52: 451-459.
- Smith, P. F., MacLennan, K., and Darlington, C. L. (1996) The neuroprotective effects of the *Ginkgo biloba* leaf: A review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). *J. Ethnopharmacol.* 50: 131-139.
- Snyder, S.H., and D'Amato, R. J. (1986) MPTP: a neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neurology.* 36: 250-258.
- Sorenson, J. R. J., Soderberg, L. S. F., and Chang, L. W. (1995). Radiation protection and radiation recovery with essential metalloelement chelates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 210: 191-204.
- Sriram, K., Pai, K. S., Boyd, M. R., and Raivindranath, V. (1997) Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: *In vitro* and *in vivo* studies in mice. *Brain Res.* 749: 44-52.
- Stoll, S., Scheuer, K., Pohl, O., and Muller, W. E. (1996) *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) independently improves changes in passive avoidance learning and brain membrane fluidity in the aging mouse. *Pharmacopsychiatry* 29 144-149.
- Szabo, M. E., Droy-Lefaix, M. T., Doly, M., and Braquet, P. (1991) Free radical-mediated effects in reperfusion injury: A histologic study with superoxide dismutase and EGb 761 in rat retina. *Ophthalm. Res.* 23: 225-234.
- Taylor, J. E., Odell, A., and Bonin, A. (1991) The effect of EGb 761 treatment on *ex vivo* biogenic amine uptake *Biomeasure, Inc.*, Internal Report No. 188-288-4, 12 pp
- Thornalley, P. J., and Vasak, K. (1985) Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta* 827: 36-47.
- Tighilet, B., and Lacour, M (1995) Pharmacological activity of the *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on equilibrium function recovery in the unilateral vestibular neurotomed cat *J. Vestib. Res* 5 187-200
- Triggs, W. J , and Willmore, L J (1984) *In vivo* lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection *J Neurochem.* 42: 976-979.

- Turski, L., Bressler, K., Retting K. J., Löschmann, P. A., and Wachtel, H (1991) Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature*. 349: 414-418.
- Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y., and Tomonaga, Y. (1991) The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*. 7: 337-347.
- Ueki, A., Chong, P. N., Albanese, A., Rose, S., Chivers, J K., Jenner, P., and Marsden C. D. (1989) Further treatment with MPTP does not produce parkinsonism in marmoset showing behavioural recovery from motor deficits induced by an earlier exposure to the toxin. *Neuropharmacology*. 28: 1089-1097.
- Ungerstedt, U. (1971a) Posynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.* 82 (Suppl 367): 69-93.
- Ungerstedt, U. (1971b) Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.* 82 (Suppl. 367): 95-122.
- van Acker, A. B. E., Tromp, N. J. L., Haenen, R. M. M., van der Vijgh. J. F., and Bast, A. (1995) Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 214: 755-759.
- Welt, K., Fitzl, G., and Schaffranietz, L. (1996) Myocardium Protective Effects of *Ginkgo biloba* Extract (EGb 761) in Old Rats Against Acute Isobaric Hypoxia. An Electron Microscopic Morphometric Study. I. Protection of Cardiomyocytes. *Exp Toxicol. Pathol.* 48: 33-39.
- Winter, E. (1991) Effects of an extract of *Ginkgo biloba* flavone glucosides in the context of increased blood viscosity. *Clin. Hemorheol.* 9: 323-326.
- Wu, R., Chihueh, C. C., Pert, A., and Murphy, D. L. (1993) Aparent antioxidant effect of 1-deprenyl on hydroxyl radical formation and nigral injury elicited by MPP+ *in vivo* *Eur. J Pharmacol.* 243. 241-247.
- Wu, Wei-Ran., and Zhu, Xin-Zu. (1999) Involvement of monoamine oxidase inhibition in neuroprotective and restorative effects of *Ginkgo biloba* extract against MPTP-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity in C-57 mice *Life Sciences*. 65: 157-164.
- Yang, L., Matthews, R T., Schulz, J. B., Klockgether, T., Liao, A W., Martinou, J. C., Penney, J. B. Jr., Hyman, B T., and Beal, M. Flint (1998) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. *J. Neurosci.* 18: 8145-8152
- Youdim, M. B. H., Ben-Schachar, D., and Riederer, P. (1989) Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration?. *Acta Neurol. Scand.* 80 (supl 136): 60-65

Youdim, M. B. H. The biology of toxic events in Parkinson's disease. In D. Calne *et al.* (Eds) *Advances in Research on Neurodegeneration*. Vol. I. Birkhäuser, Boston, M. A. (1993), pp. 67-86.

Youngster, S. K., McKeown, K. A., Jin, Y. Z., Ramsay, R. R., Heikkila, R. E., and Singer, T. P. (1989) Oxidation of analogs of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidases A and B and the inhibition of monoamine oxidases by the oxidation products. *J. Neurochem.* 53: 1837-1842.

Yu, B. P. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species *Physiol. Rev.* 74: 139-162

Yu, B. P., Suescun, E. A., and Yang, S. Y. (1992) Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A₂: modulation by dietary restriction *Mech. Ageing. Dev.* 65: 17-33.

Zalewska, M. M., Nagy, K., and Floyd, R. A. (1989) Iron-induced lipid peroxidation and inhibition of dopamine synthesis in striatum synaptosomes *Neurochem. Res.* 14: 597-605.

Zalewska, T., Zablocka, B., and Domanska-Janik, K. (1996) Changes of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II after transient ischemia in gerbil hippocampus. *Acta Neurobiol. Exp.* 56: 41-48.

Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L., and Davies, K. J. A. (1990) *J. Biol. Chem.* 265. 16330-16336.

Zigmond, M. J., and E. M. Stricker. (1984) Parkinson's Disease: Studies with an animal model. *Life Sciences.* 35: 5-18.