



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

EFFECTO NEUROPROTECTOR DEL EGb761 EN UN  
MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE  
PARKINSON

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

**NORMA SERRANO GARCÍA**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA ROJAS CASTAÑEDA

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a las autoridades del Posgrado en Ciencias Biológicas por permitir la realización de mis estudios de la maestría.

Al apoyo económico de la beca de CONACyT con número 189744 que me permitió realizar mis estudios de posgrado.

Agradezco a mi jurado por sus comentarios constructivos para la realización de la tesis, integrado por:

Dr. Mariano Martínez Vázquez  
Dra. Patricia Rivas Manzano  
Dra. Patricia Rojas Castañeda  
Dra. Diana Barrera Oviedo  
Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

**La bendición de Jehová es  
lo que enriquece... Por eso daré  
gracias oh Jehová entre las naciones.  
(Proverbio 10:22, 2 Samuel 22:50)**

## **DEDICÓ ESTA TESIS:**

A mi padre Sergio y hermano Edmundo por su ayuda incondicional para cuidar a mis hijos mientras yo le dedicaba tiempo a la maestría.

A mis hijos Febe Irma y Sergio Adriel por su comprensión y cariño para permitirme realizar mi maestría.

## **AGRADEZCO**

A José Juan Mares Sámano por su apoyo técnico y enseñanza durante la realización del trabajo y su amistad también.

A los colegas y compañeros por su amistad Verónica Custodio, Edith Gonzales, Javier Franco, Mónica Padilla y Carmen Rubio.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> -----	5
<b>SUMMARY</b> -----	6
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 <b>Sistema nervioso y su importancia</b> -----	7
1.2 <b>Ganglios basales</b> -----	7
1.3 <b>Enfermedad de Parkinson</b> -----	10
1.3.1 <b>Dopamina</b> -----	11
1.3.2 <b>Receptores de dopamina</b> -----	11
1.3.3 <b>Signos y síntomas</b> -----	12
1.3.4 <b>Etiología de la enfermedad de Parkinson</b> -----	13
1.4 <b>Patogénesis</b> -----	14
1.4.1 <b>Estrés oxidativo</b> -----	15
1.4.2 <b>Radicales libres</b> -----	15
1.4.3 <b>Apoptosis</b> -----	18
1.4.4 <b>Exitotoxicidad</b> -----	18
1.4.5 <b>Disfunción mitocondrial</b> -----	19
1.5 <b>Estrés oxidativo y Parkinson</b> -----	19
1.6 <b>Tratamiento de la Enfermedad de Parkinson</b> -----	19
1.6.1 <b>Tratamiento farmacológico</b> -----	20
1.6.1.1 <i>Levodopa</i> -----	20
1.6.1.2 <i>Levodopa/carbidopa</i> -----	20
1.6.1.3 <i>Inhibidores de la COMT</i> -----	22
1.6.1.4 <i>Agonistas dopaminérgicos</i> -----	22
1.6.1.5 <i>Inhibidores de la monoamina oxidasa</i> -----	23
1.6.1.6 <i>Amantadina</i> -----	23
1.6.1.7 <i>Anticolinérgicos</i> -----	23
1.6.2 <b>Tratamiento quirúrgico</b> -----	24
1.6.2.1 <i>Palidotomía</i> -----	24
1.6.2.2 <i>Talamotomía</i> -----	24
1.6.2.3 <i>Estimulación del globo pálido</i> -----	24

1.6.2.4 <i>Estimulación de los núcleos subtalámicos</i> -----	25
<b>1.7 Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson</b> -----	<b>25</b>
1.7.1 <b>6-Hidroxidopamina</b> -----	25
1.7.2 <b>Paracuato</b> -----	26
1.7.3 <b>Rotenona</b> -----	26
1.7.4 <b>1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina</b> -----	27
<b>1.8 Metabolismo de la MPTP</b> -----	<b>27</b>
<b>1.9 Enzimas y proteínas antioxidantes</b> -----	<b>28</b>
1.9.1 <b>Glutación peroxidasa</b> -----	30
1.9.2 <b>Superóxido dismutasa</b> -----	30
1.9.3 <b>Catalasa</b> -----	30
1.9.4 <b>Transferrina y lactoferrina</b> -----	31
1.9.5 <b>Ferritina</b> -----	32
1.9.6 <b>Ceruloplasmina</b> -----	32
1.9.7 <b>Albúmina</b> -----	32
1.9.8 <b>Metalotioneina</b> -----	32
1.9.9 <b>Vitamina E, C y betacarotenos</b> -----	33
<b>1.10 Ginkgo biloba</b> -----	<b>33</b>
1.10.1 <b>EGb761</b> -----	34
1.10.2 <b>Composición química del EGb761</b> -----	34
1.10.2.1 <i>Flavonoides</i> -----	34
1.10.2.2 <i>Terpenoides</i> -----	35
1.10.2.3 <i>Ácidos grasos</i> -----	35
1.10.3 <b>Farmacocinética</b> -----	36
1.10.4 <b>Propiedades del EGb761</b> -----	37
1.10.4.1 <i>Vasomodulador</i> -----	37
1.10.4.2 <i>Efectos metabólicos</i> -----	37
1.10.4.3 <i>Inhibición de la agregación plaquetario</i> -----	38
1.10.4.4 <i>Acción antioxidante</i> -----	38
1.10.5 <b>Efectos del EGb761 en el SNC</b> -----	39
1.10.5.1 <i>Flujo sanguíneo cerebral y metabólico</i> -----	39
1.10.5.2 <i>Efecto cognitivo, neurológico y actividad motora</i> -----	39

1.10.5.3 <i>Efectos sobre receptores</i> -----	40
1.10.5.4 <i>Efectos en inflamación</i> -----	41
1.10.5.5 <i>Efectos de plasticidad y neurogénesis</i> -----	41
1.10.6 <b><i>Efectos adversos del EGb761</i></b> -----	41
<b>2 JUSTIFICACIÓN</b> -----	43
<b>3 HIPÓTESIS</b> -----	44
<b>4 OBJETIVOS</b> -----	44
4.1 <b><i>Objetivo general</i></b> -----	44
4.2 <b><i>Objetivos específicos</i></b> -----	44
<b>5 MATERIAL Y MÉTODOS</b> -----	45
5.1 <b><i>Animales</i></b> -----	45
5.2 <b><i>Formación de grupos</i></b> -----	45
5.3 <b><i>Análisis de dopamina</i></b> -----	45
5.4 <b><i>Cuantificación neuronal</i></b> -----	46
5.4.1 <i>Procedimiento histológico</i> -----	46
5.4.2 <i>Cuantificación estereológico</i> -----	46
5.4.3 <i>Densitometría</i> -----	47
5.5 <b><i>Evaluación conductual</i></b> -----	47
5.6 <b><i>Evaluación de la peroxidación de lípidos</i></b> -----	48
5.7 <b><i>Análisis estadísticamente</i></b> -----	49
<b>6 RESULTADOS</b> -----	50
<b>7 DISCUSIÓN</b> -----	58
<b>8 CONCLUSIÓN</b> -----	63
<b>9 REFERENCIAS</b> -----	64

## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad crónica neurodegenerativa, caracterizada por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc) y disminución del neurotransmisor de dopamina (DA) en el cuerpo estriado (CE). La neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) es referido como el mejor modelo experimental de la EP. El estrés oxidativo es considerado como el principal mecanismo que conduce a la neurodegeneración, producida durante la EP y la neurotoxicidad de la MPTP. Por otro lado, el EGb761 es una mezcla patentada de compuestos activos, extraídos de las hojas del árbol de *Ginkgo biloba*. Se ha propuesto que el EGb761 tiene efectos neuroprotectores, probablemente como atrapador de radicales libres ó acción antioxidante. Varios estudios demuestran el efecto protector del EGb761 en el metabolismo neuronal de la DA. En este estudio se analizó el papel neuroprotector del EGb761 en la neurodegeneración dopaminérgica inducida por la MPTP, usado como un modelo experimental de la EP. Se utilizaron ratones machos de la cepa C-57 black, a los cuales se les administró MPTP (30 mg/kg) durante 5 días. Posteriormente se administraron con EGb761 a diferentes dosis (10, 40, 80, 120, 160, 180 ó 200 mg/kg) por 18 días. Se analizó el contenido de DA en el CE por HPLC, el número de neuronas dopaminérgicas por medio de la técnica inmunohistoquímica de la tirosina hidroxilasa, aplicando el método estereológico para su cuantificación en la SNpc. El análisis densitométrico en CE de la inmunoreactividad de la tirosina hidroxilasa se realizó con un sistema de análisis de imágenes Metamorph. La actividad locomotora fue medida con un sistema de detección infrarroja sensible al movimiento. Los niveles de peroxidación de lípidos en CE se midieron por el método de productos fluorescentes lipídicos. La pérdida de las neuronas dopaminérgicas, inducida por la MPTP fue significativamente atenuada en los ratones administrados con EGb761 (10 y 40 mg/kg i.p.), después de inducirles el parkinsonismo con la MPTP. El efecto neuroprotector del EGb761 esta asociado con el bloqueo de la peroxidación de lípidos. La disminución locomotora inducida por la MPTP fue recuperada con EGb761 (26 y 36%, respectivamente), correlacionando con los niveles aumentados de la DA estriatal (36 y 75%). Los resultados de este estudio, indican que el EGb761 atenua la neurodegeneración dopaminérgica generada por la MPTP, posiblemente al inhibir el estrés oxidativo producido por la neurotoxina.

## SUMMARY

The Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative chronic disease, characterized by the loss of the dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and reduction of striatal dopamine content. The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is referred like the best experimental model of the PD. Oxidative stress is considered the main mechanism that leads to the neurodegeneration, produced during the PD and the neurotoxicity of the MPTP. On the other hand, the EGb761 is a patented and well-defined mixture of active compounds extracted of the leaves of the tree of *Ginkgo biloba*. It has been proposed that EGb761 has neuroprotective effects, probably via scavenging of free radicals or antioxidant action. Several studies demonstrate the protective effect of the EGb761 in the neuronal metabolism of dopamine. In this study was investigated the neuroprotective effect of the EGb761 in the dopaminergic neurotoxicity induced by the MPTP, used like an experimental model of the EP. C-57 black mice were administered MPTP (30 mg/kg) during 5 days. Followed they were administered with EGb761 to different doses (10, 40, 80, 120, 160, 180 or 200 mg/kg) by 18 days. Striatal dopamine content was analyzed by HPLC, the number of dopaminergic neurons by the immunostaining technique of the tyrosine hydroxylase, using the stereological techniques for its quantification in the substantia nigra pars compacta. The striatal density of tyrosine hydroxylase immunoreactivity was determined by Metamorph Imaging System. The locomotor activity was measured with system sensors of sensible infrared detection to movement. The levels of lipid peroxidation in striatum were analyzed by the lipid fluorescent products method. The decrease of the dopaminergic neurons, induced by the MPTP was attenuated by administered with EGb761 (10 and 40 mg/kg i.p.), after inducing the parkinsonism with the MPTP. The neuroprotective effect of the EGb761 could be associate with the blocks of the lipid peroxidation. The locomotive diminution induced by the MPTP was recovered with EGb761 (26 and 36%, respectively), correlating with the levels recovered of striatal dopamine (36 and 75%). The results this study to denote that the EGb761 attenuates MPTP-induced neurodegeneration dopaminergic, possibly at inhibit oxidative stress produced by neurotoxin.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Sistema nervioso y su importancia

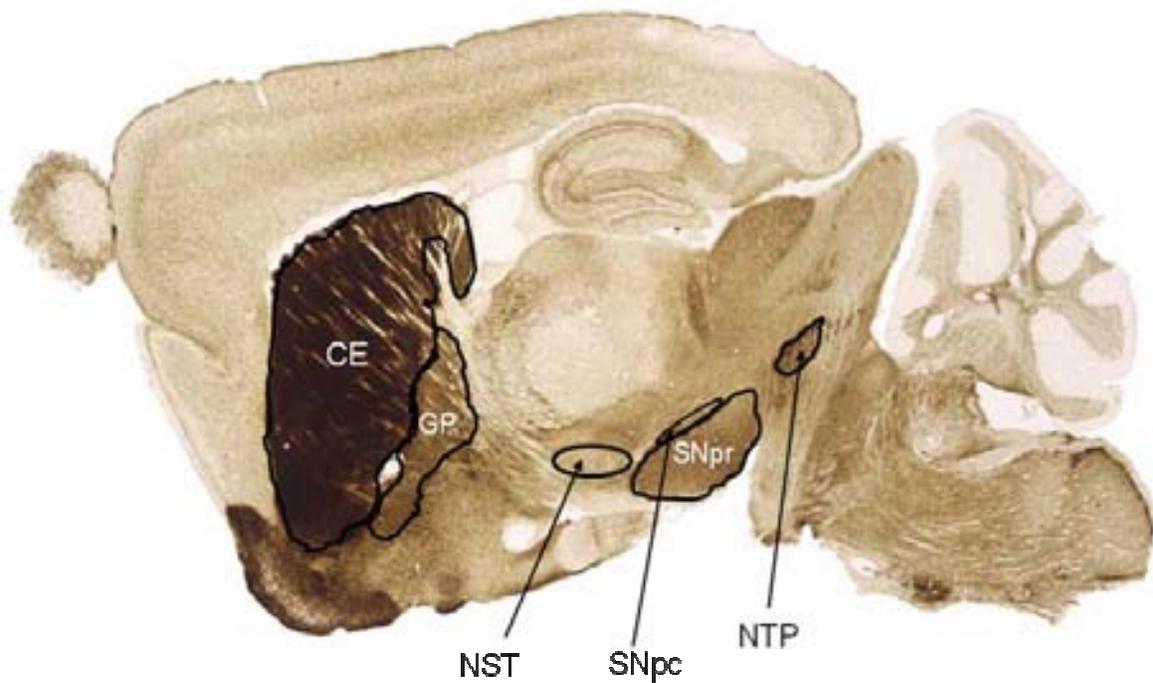
Las funciones principales del Sistema Nervioso (SN) son: detectar, transmitir, analizar y utilizar la información generada por los estímulos sensoriales internos y externos para organizar y coordinar directa o indirectamente las funciones del organismo. Así, el SN asegura la regulación de todos los procesos vitales de los organismos y su correlación con el medio ambiente (Chusid, 1977).

El Sistema Nervioso Central (SNC) o encéfalo es la porción anterior modificada y agrandada que esta cubierta por tres membranas protectoras (meninges) y encerrada dentro de la cavidad craneana. Se divide en corteza cerebral, ganglios basales, tálamo e hipotálamo, mesencéfalo, tallo cerebral y cerebelo. Esta división encefálica nos provee una base para estudiar las diferentes afecciones del cerebro (Chusid, 1977).

## 1.2 Ganglios basales

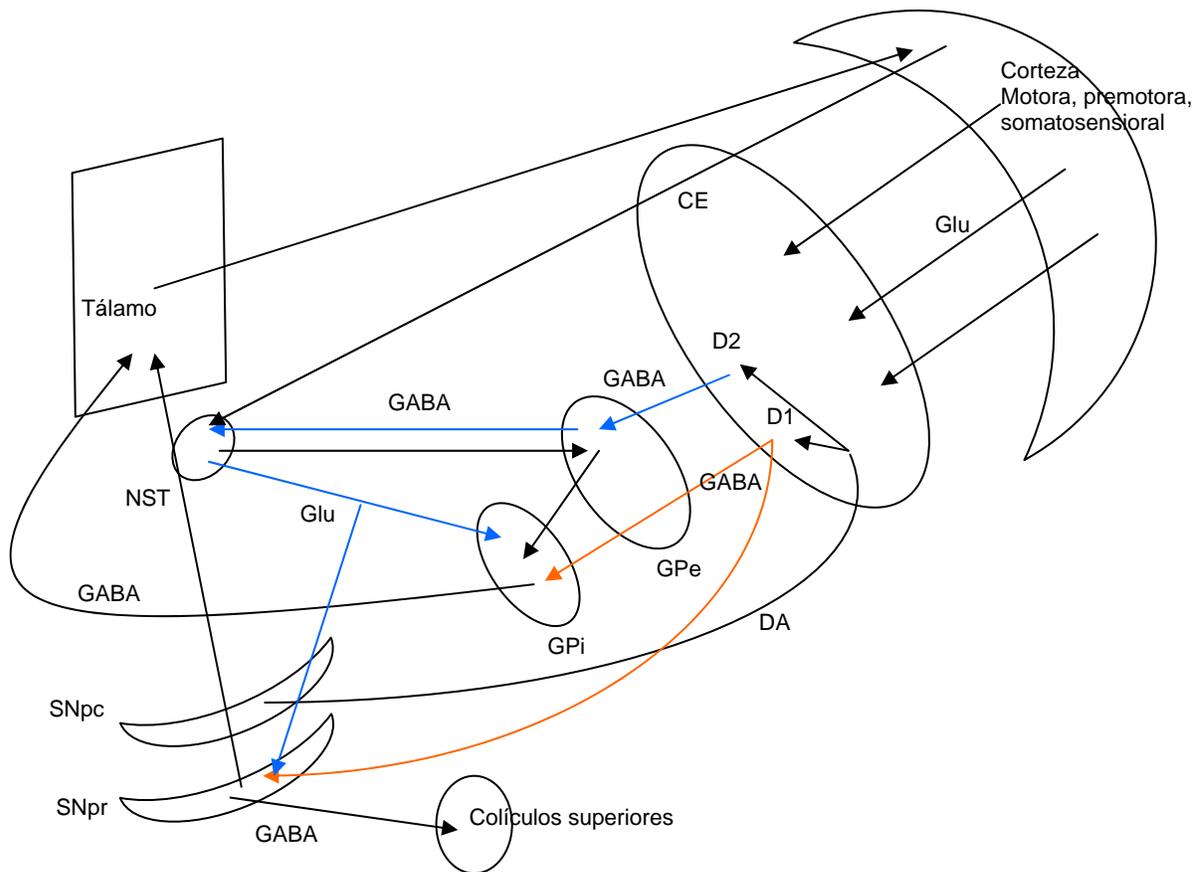
Los ganglios basales (GB) o núcleos de la base, son un conjunto de estructuras localizadas subtalámicamente, insertados en un circuito que se inicia en la corteza cerebral y cuya salida es a través del tálamo, para dirigirse de vuelta a la corteza cerebral (Côte y Crutcher, 1991). Los GB no se limitan a una sola estructura anatómica, lo conforman el cuerpo estriado (CE), globo pálido (GP), núcleos subcorticales como los núcleos subtalámicos (NST), sustancia *nigra pars compacta* (SNpc) y la *pars reticulata* (SNpr) y más recientemente los núcleos tegmentales pedunculopontinos. (Utter y Basso, 2008; Obeso y col., 2002), los cuales participan en la regulación de los movimientos y la cognición (figura 1).

El circuito motor de los ganglios basales (figura 2), inicia en las áreas de la corteza que controlan el movimiento (área motora suplementaria, corteza premotora, corteza motora, corteza somatosensorial y el lóbulo parietal superior) y SNpc envían sus proyecciones hacia el CE, siendo la primera excitatoria glutamatérgica y la segunda dopaminérgica. Las eferencias del CE son GABAérgicas y proyectan predominantemente a SNpr, éste a su vez proyecta sus axones a los colículos



**Figura 1.** Estructuras que integran los ganglios basales en un corte sagital de cerebro de ratón. La mayoría de los componentes se hallan en el telencéfalo, aunque la sustancia *nigra* se encuentra en el mesencéfalo y el núcleo subtalámico está en el diencéfalo. CE: cuerpo estriado, GP: globo pálido, NST: núcleos subtalámicos, SNpc: sustancia nigra pars compacta, SNpr: sustancia nigra pars reticulata, NTP: núcleos tegmentales pedunculopontino.

superiores. Otra de las eferencias del CE son enviadas al GP, tanto externo como interno, siendo estas vías GABAérgicas para inhibir al tálamo y los núcleos subtalámicos, donde éstos envían sus proyecciones hacia la corteza dando término al circuito de los GB (Côte y Crutcher, 1991; Utter y Basso, 2008). Entre el núcleo de entrada y las estructuras de salida existen dos sistemas paralelos de proyección denominado como “vía directa” y “vía indirecta”. En la “vía directa” las neuronas gabaérgicas y peptidérgicas estriatales proyectan directamente al GP interno y a la



**Figura 2.** Esquema del circuito de los ganglios basales. Las líneas rojas son la vía directa, las azules son la vía indirecta. SNpc: sustancia *nigra pars compacta*. SNpr. Sustancia *nigra pars reticulata*, NST: núcleo subtalámico, GPe: globo pálido externo, GPi: globo pálido interno, Glu: glutamato, GABA: ácido gammaminobutírico, D1 y D2: receptores de dopamina tipo 1 y 2 (Tomado de Utter y Basso, 2008).

SNpr. La “vía indirecta” originada en poblaciones gabaérgicas y encefalinérgicas estriales, terminan en el GP interno y en la SNpr a través de conexiones que involucran al GP externo y al NST (Obeso y cols., 2002). La activación cortical de la “vía directa” facilitaría los movimientos deseados, mientras que la estimulación glutamatérgica cortical de las neuronas estriales de la “vía indirecta” provocaría una inhibición de los movimientos no deseados. La dopamina (DA) tiene un carácter dual sobre las neuronas estriales, la vía directa es excitatoria y la vía indirecta inhibitoria (Albin y cols., 1989).

Existen muchos desórdenes del movimiento, atribuidos a la disfunción de los GB, uno de éstos es la enfermedad de Parkinson (EP). La cual es bien conocida su patología y en ésta participan ciertas estructuras de los GB.

### **1.3 Enfermedad de Parkinson**

La EP fue descrita por James Parkinson en su monografía de 1817 “Ensayo de la parálisis temblorosa”. Es una enfermedad neurodegenerativa progresiva con características patológicas y clínicas bien definidas (Dauer y Przedborski, 2003). La enfermedad tiene una incidencia de 160 por 100,000 personas mayores de 50 años, afectando a hombres y mujeres por igual (Waters, 2002). Se caracteriza por alteraciones motoras: dificultad para iniciar movimientos (acinesia), lentitud en los mismos (bradicinesia), temblor en las extremidades durante el reposo (tremor) y rigidez muscular (Utter y Basso, 2008). Los pacientes con la EP presentan degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, que constituyen uno de los principales grupos de neuronas productoras de la DA. En estudios postmortem se demuestra que la vía dopaminérgica es especialmente vulnerable a los efectos de la edad (Stark y Pakkenberg, 2004).

La DA es un mensajero químico responsable de transmitir las señales entre la SNpc y el CE, para producir actividad muscular con fluidéz. La pérdida de DA hace que las células nerviosas del CE actúen sin control, dejando a los pacientes incapaces de dirigir o controlar sus movimientos de forma normal (Orr y cols., 2002). Se ha encontrado que los síntomas motores aparecen cuando la pérdida de DA en el CE es mayor al 80% (Homykiewicz y Kish, 1986), aunque en la SNpc la pérdida neuronal sea solo del 50% (Marsden, 1992).

La degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, es un problema fundamental de la EP. Esta degeneración se extiende a varios núcleos del tallo cerebral y otras áreas del cerebro donde hay células dopaminérgicas. Además, del déficit de DA en el CE, se presentan alteraciones en otros neurotransmisores como: noradrenalina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), acetilcolina y ácido gammaaminobutírico (GABA) (Arias-Carrión, 2007). El papel de 5-HT, junto con noradrenalina en el SNC, es el de regular la vigilia, el proceso activo del sueño, la atención, los procesos

motivacionales y en la regulación de los estados de ánimo. Muchos de los pacientes con la EP presentan alteraciones en el sueño, como también en la motivación (Happe, 2005).

La disminución de DA en núcleo caudado y putamen es del 80-90%. En el núcleo acumbes, corteza cerebral e hipotálamo es del 50-60%, indicando que la vía nigroestriatal es la más dañada en la enfermedad. Sin embargo, se ha observado neurodegeneración en el sistema noradrenérgico (*locus cerolius*), serotoninérgico (rafe) y colinérgico (núcleos basales de Meynert) (Schulz y Falkenburger, 2004). La degeneración del sistema colinérgico y las estructuras del hipocampo explican la alta incidencia de demencia que acompaña la EP, particularmente en los pacientes de edad avanzada (Schulz y Falkenburger, 2004).

### 1.3.1 **Dopamina**

La DA es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del SNC de los mamíferos y participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad, la afectividad y la comunicación neuroendócrina (Bahena-Trujillo y cols., 2000). La DA se sintetiza a partir del aminoácido L-tirosina y existen mecanismos que regulan de manera muy precisa su síntesis y liberación. Los receptores dopaminérgicos se encuentran ampliamente distribuidos en diversas áreas del SNC (aunque de manera diferencial de acuerdo al subtipo), donde son responsables de las diversas acciones fisiológicas de la DA (Bahena-Trujillo y cols., 2000; Klockgether, 2004).

### 1.3.2 **Receptores de DA**

Los efectos de la DA están mediados a través de la interacción con sus receptores. Existen seis diferentes formas de receptores conocidos, categorizados bajo dos tipos principales: D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>. Los receptores del tipo D<sub>1</sub> incluyen los D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>, éstos son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G que incrementan la actividad de la enzima adenilato ciclasa y fosfolipasa C. La adenilato ciclasa se convierte a adenosin monofosfatasa ciclasa (AMPc). El AMP cíclico activa otra enzima llamada proteín cinasa A, la cual hidroliza los fosfolípidos de la membrana celular para formar otro segundo mensajero. Éste causa la liberación de Ca<sup>2+</sup> dentro de la célula, el cual puede

regular la respuesta de la neurona. Estos receptores tienen una alta afinidad por las benzodiazepinas y una baja afinidad por las benzamidas (Blows, 2000).

Los D<sub>2</sub> incluyen los D<sub>2</sub> largos, D<sub>2</sub> cortos, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>. Los receptores de tipo D<sub>2</sub> también se encuentran acoplados a proteínas G inhibiendo la actividad de la adenilato ciclasa. El D<sub>3</sub> tiene una alta afinidad por los neurolépticos atípicos y por los inhibidores de los autorreceptores de DA. El D<sub>4</sub> tiene afinidad por el neuroléptico atípico clozapina (Blows, 2000).

La distribución de los receptores en el cerebro es diferente; los D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> se expresan predominantemente en las neuronas estriatonigrales y estriatopalidales. Los D<sub>3</sub> se encuentran en áreas límbicas, así como en el núcleo acumbes, D<sub>4</sub> se ha detectado en la corteza frontal, cerebro medio, amígdala, médula y en niveles bajos en los GB (Waters, 2002; Blows, 2000).

### 1.3.3 **Signos y síntomas de la EP**

El temblor es el síntoma característico del 70% de los casos, afectando principalmente en manos cuando éstas están en reposo, y éste puede aumentar en presencia de un problema emocional o cansancio. Tiende a desaparecer durante el sueño. En pacientes jóvenes dicho temblor es unilateral, en el grupo de edad avanzada es invariablemente bilateral y puede afectar otras partes del cuerpo incluyendo cabeza y cuello (Findley y cols., 1981).

Rigidez muscular, es una de las principales causas de inmovilidad en la enfermedad, se debe a una hipertonía generalizada, aumento del tono muscular, lo cual ocasiona una forma de resistencia al movimiento. En varios casos, hay un desbalance en el tono muscular conduciendo a la postura flexionada anormal caracterizada en la enfermedad (Obeso y cols., 2002).

En los pacientes parkinsonianos los movimientos son considerablemente lentos (bradicinecia) y los espontáneos están disminuidos o han desaparecido (acinesia). La expresión facial se pierde, se les dificulta iniciar y parar los movimientos, cuando caminan tienden los pacientes a congelarse y se les dificulta iniciar por si mismos el paso. La combinación de rigidez y bradicinecia afecta el habla y escritura, en el habla se reduce su volumen de voz y pierde su variación rítmica (Utter y Basso, 2008).

El daño cognitivo en la EP es comúnmente variable. Las áreas afectadas específicamente son: memoria libre de información previamente aprendida, visión espacial y funciones ejecutoras tales como, resolver problemas y planear. (Hung y Lang, 2005).

#### 1.3.4 ***Etiología de la EP***

Actualmente se desconocen las causas que generan la EP. Sin embargo, se postula que el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, toxinas exógenas, acumulación intracelular de metabolitos tóxicos, infecciones virales, excitotoxicidad y deficiencias en el sistema inmune, pueden ser factores que favorecen la aparición de la enfermedad (Langston y cols., 1987). La hipótesis de las toxinas medio ambientales fue dominante durante el siglo veinte, sin embargo, el descubrimiento de los genes de la enfermedad cambio el interés, enfocándose ahora en los factores de susceptibilidad hereditaria. Aunque probablemente ambos factores juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Dauer y Przedborski, 2003).

La hipótesis medio ambiental propone que la neurodegeneración de la EP resulta de la exposición de neurotoxinas dopaminérgicas. Teóricamente, la neurodegeneración de la enfermedad pudiera producirse por la exposición crónica de alguna neurotoxina ó por la pequeña exposición de eventos dañinos endógenos. El hallazgo de la intoxicación en un grupo de adictos a la heroína con la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la cual, desarrolla los síntomas de la EP, es un ejemplo de cómo las toxinas exógenas pueden mimetizar las características clínicas y patológicas de la enfermedad. Otras toxinas medio ambientales son el paracuato y la rotenona, usadas como insecticidas; las cuales junto con la MPTP son envenenadores mitocondriales y están en el ambiente.

La exposición ocupacional es otro factor de riesgo, trabajadores de la industria siderúrgica mostraron asociación con el desarrollo de la EP (Tanner y Goldman, 1996). También, se ha observado una alta frecuencia de desarrollo de la enfermedad en trabajadores de hospitales, de la construcción, carpinteros y empleados de la limpieza (Fall y cols., 1999). La exposición al paracuato, la rotenona y los metales se consideran un alto riesgo para desarrollar la enfermedad, aunque no existe una

evidencia convincente que ésta sea la causa de la EP esporádica (Korrel y Tonner, 2005).

El parkinsonismo causado genéticamente permanece inusual. El parkinsonismo genético se encuentra principalmente en las edades jóvenes, antes de los cincuenta años. Las mutaciones que causan el parkinsonismo son tres, las cuales están bien identificadas:  $\alpha$ -sinucleína (Kruger y cols., 1998), parkina (Kitada y cols., 1998) y DJ-1 (Bonifati y cols., 2003). El gen de la proteína  $\alpha$ -sinucleína en el cromosoma 4 (Polymeoropoulos y cols., 1997), asociada a la EP esta presente en familias con transmisión autosómica dominante, se inicia precozmente en la segunda década de la vida y con rápida progresión. Se han identificado mutaciones en el gen parkina, que codifica una proteína semejante a la ubiquitina, localizada en el cromosoma 6 en familias con parkinsonismo juvenil autosómico recesivo en Japón (Kitada y cols., 1998) y más recientemente, en el cromosoma 1 en Italia (Valente y cols., 2002). Otras mutaciones asociadas con EP familiar son la localizada en el cromosoma 2 (parkina 3) y en el cromosoma 4 (parkina 4) también en familias con EP autosómica dominante (Gasser y cols., 1998; Farrer y cols 1999).

El factor genético no es la causa principal de la EP esporádica, investigando los mecanismos fundamentales del parkinsonismo, puede proveer importantes pistas en la patogénesis del parkinson. La falta de evidencias que apoyen la causa de la típica EP se investiga más por el lado del riesgo medio ambiental (Korell y Tanner, 2005).

## 1.4 Patogénesis

Las causas de la destrucción de las neuronas dopaminérgicas en la EP aún no son bien conocidas, estudios postmortem en la SNpc de pacientes con la enfermedad se identificaron cuatro principales alteraciones: 1) evidencia del estrés oxidativo, 2) disminución de glutatión reducido, 3) niveles altos de hierro con ferritina reducida y 4) deficiencia en el complejo I de la mitocondria (Jenner y Olanow, 1998a).

### 1.4.1 *Estrés oxidativo*

El estrés oxidativo es un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la homeostasis de la óxido-reducción intracelular, es decir el balance entre prooxidantes y

antioxidantes. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes. Las EROs se forman a partir del oxígeno, entre estos se encuentran, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), óxido nítrico (ON), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Reilly y Bulkley, 1990).

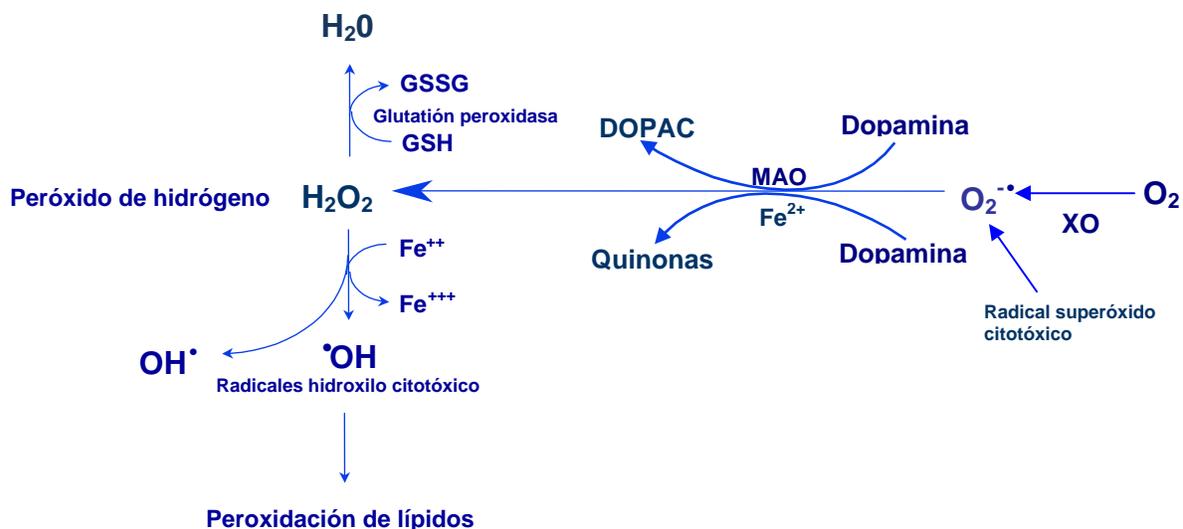
El SNC es el blanco propicio para los compuestos prooxidantes, debido a su alto consumo de oxígeno, al alto contenido de sustrato oxidativo, tales como los ácidos grasos poliinsaturados y catecolaminas. También, por los niveles bajos de enzimas antioxidantes como: glutatión, vitamina E, catalasa y superóxido dismutasa; la generación endógena de las EROs y el elevado contenido de hierro en áreas específicas del cerebro (globo pálido y SNpc) (Dauer y Przedborski, 2003; Sian y cols., 1994).

Al elevarse o disminuir las concentraciones fisiológicas de las EROs puede acarrear importantes alteraciones funcionales. La aterosclerosis, el envejecimiento, el cáncer, la EP por citar algunos ejemplos, de la enorme lista de problemas fisiológicos y padecimientos que de alguna forma se encuentran asociados con un elevado nivel de las EROs (Freeman y Crapo, 1982; Basaga, 1989).

#### 1.4.2 **Radicales libres**

Los radicales libres son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal del oxígeno en la célula, e inactivados por mecanismos enzimáticos y de atrapamiento. Son componentes normales de células y tejidos. Los principales radicales son: el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot HO$ ), oxígeno singulete ( $\cdot O_2$ ), y el radical hidroperóxido ( $HOO\cdot$ ) (Reilly y Bulkley, 1990; revisión Nakazawa y cols., 1996).

El  $O_2^{\cdot-}$  es una molécula con un electrón desapareado (Buechter, 1988), sufre una reacción espontánea de dismutación (proceso de óxido-reducción entre moléculas de la misma naturaleza), con formación de oxígeno y  $H_2O_2$ . En presencia del  $H_2O_2$  el radical  $O_2^{\cdot-}$  puede ser precursor del radical  $\cdot HO$  (Martin y cols., 1998) (figura 3).



**Figura 3.** Iniciación de la peroxidación de lípidos a través de la reacción de Fenton en el cerebro de ratón formando el radical hidroxilo. GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, MAO: monoamina oxidasa, XO: xantina oxidasa,  $O_2$ : oxígeno (Tomado de Gerlach y cols., 2008)

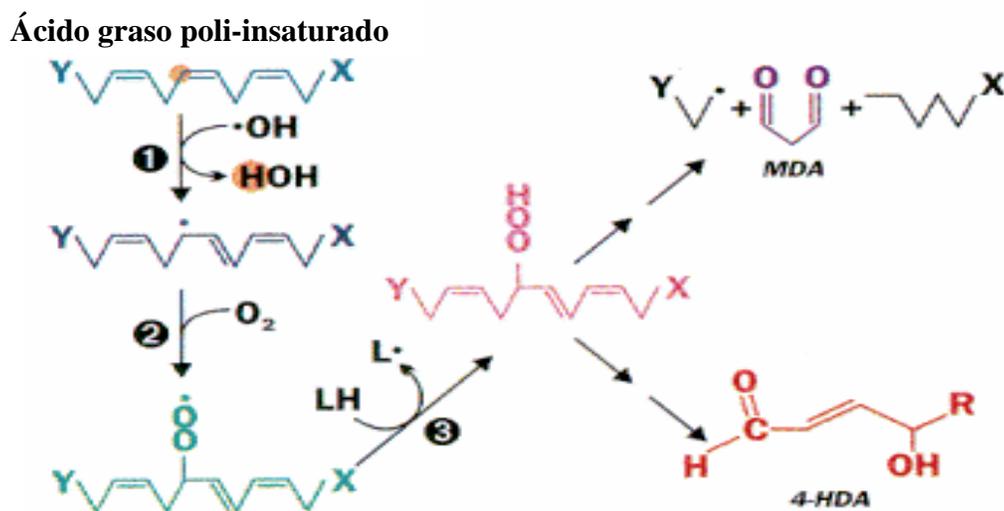
Por otra parte, el  $H_2O_2$  puede reaccionar con metales divalentes (libres o unidos a proteínas) y producir  $^{\bullet}HO$ , por medio de la reacción de Fenton (figura 3). Por la alta inestabilidad del radical  $^{\bullet}HO$ , colisiona con una biomolécula, ésta se oxida al sustraerle un electrón, perdiendo de esta manera su función específica en la célula. El  $^{\bullet}HO$  es capaz de oxidar macromoléculas biológicas, tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Berlett y Stadtman, 1997). Si se trata de los lípidos se dañan las estructuras ricas en ellas como las membranas celulares y las lipoproteínas. En la membrana se altera la permeabilidad conduciendo al edema y la muerte celular, en la otra, la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, que participan en la génesis de la placa ateromatosa (Rodríguez Perón y cols., 2001).

Esta oxidación lipídica por los radicales libres es conocida como peroxidación de lípidos (PL), en este tipo de reacciones de hidroxilación y la abstracción de un hidrógeno son las modificaciones más comunes que sufre el sustrato orgánico involucrado y se generan otros radicales libres orgánicos tales como: los radicales alcoxilos ( $RO^{\bullet}$ ), peroxilos ( $ROO^{\bullet}$ ) y sulfoderivados (figura 4).

En el caso de las proteínas se oxidan preferentemente los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina) y como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de

grupos carbonilos que impiden el desarrollo normal de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc) (Pollack y Leeuwenburgh, 1999).

La otra molécula dañada por este radical libre es el ADN; el daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, lo que genera consecuencias en parte importantes en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis, o la pérdida total del gen dañando su expresión específica (Nakazawa y cols., 1996).



**Figura 4.** Peroxidación de lípidos insaturados. La variedad de lípidos y la naturaleza aleatoria de las reacciones de los radicales libres conducen a muchos productos. Estos incluyen los 4-hidroxi alquenes (4-HDA) y cuando hay tres o más enlaces insaturados, malonaldehídos (MDA). Estos pueden servir como dianas para la medida de la peroxidación de ácidos grasos (Tomado de San Miguel y cols., 2006).

Existen muchos otros sistemas que generan las EROs y los radicales libres, como es el caso de la xantina oxidasa, aldehído oxidasa, flavín deshidrogenasas, peroxidasas, etc. Además de la reducción univalente del oxígeno, hay también sistemas no enzimáticos que participan en dicho proceso como por ejemplo: el par hidroquinona/semiquinona, así como, durante las reacciones de autooxidación, que incluyen a las que están relacionadas con las catecolaminas y las ferredoxinas (Zentella de Piña y cols., 1994; Nakazawa y cols., 1996) (Figura 3).

### 1.4.3 *Apoptosis*

La muerte celular programada (apoptosis) también se ha considerado como causa de la muerte neuronal de la EP. Existe evidencia de que la muerte celular programada ocurre en las células dopaminérgicas, en roedores, en la etapa embrionaria a partir del día 20 en forma continua hasta el día 8 postnatal y se reinicia brevemente en el día 14 postnatal (Jenner y Olanow, 1998a). El mecanismo de la apoptosis es diferente del que ocurre en la necrosis; en ésta la muerte celular se debe a causas físicas, térmicas o isquémicas graves que producen tumefacción celular y mitocondrial, ruptura de la membrana y de los organelos y destrucción del citoesqueleto y finalmente del núcleo. La apoptosis, en cambio, se inicia con condensación de la cromatina, la membrana celular se muestra indentada y vesiculada. El núcleo y el citoplasma se dividen en cuerpos apoptóticos, (esférulas rodeadas de membrana) que destruyen el cuerpo celular y finalmente hay degradación del ADN nuclear y subsecuentemente fagocitosis de los detritos celulares. Curiosamente en el fenómeno de la apoptosis las mitocondrias mantienen morfología normal (Escobar, 2003). La detección de la actividad de las caspasas 3 y 8, marcadores moleculares de la muerte celular apoptótica, apoyan la hipótesis que la apoptosis es un mediador de la muerte celular en la EP (Hartmann y cols., 2000 y 2001).

### 1.4.4 *Excitotoxicidad*

A pesar de que no se sabe cual es el origen de la EP, se tiene la hipótesis que la excitotoxicidad juega un papel muy importante. El glutamato es el principal transmisor de las afluencias corticales que reciben el estriado y NST, la disminución de la función dopaminérgica desinhibe al NST, aumentando el flujo glutamatérgico hacia el GB medial y a la SNpr, lo que puede desempeñar un papel crítico en el desarrollo de los síntomas parkinsónicos (Greenamyre y Brien, 1991). Los receptores a glutamato son importantes en el control de la liberación presináptica de DA y en la excitación de las neuronas dopaminérgicas. El glutamato y la DA pueden interactuar a través de la fosfoproteína DARPP-32, presente en las neuronas del CE. Esta proteína es inhibida por la acción de los receptores de glutamato, mientras que es fosforilada y activada por los receptores D<sub>1</sub>, facilitando la transmisión dopaminérgica (Marco-Igual, 1995).

#### **1.4.5 *Disfunción mitocondrial***

Varios estudios identifican alteraciones en la actividad del complejo I de la cadena respiratoria en la mitocondria en la EP (ver revisión Greenamyre y cols., 2001). Los estudios *in vitro* han indicado que una alteración en el complejo I ocasiona estrés oxidativo en la célula y con ello disminución de la energía. Ésta alteración identificada en la EP no solo se ha observado en el cerebro (Schapira y cols., 1990), también en las plaquetas de los pacientes con la EP (Parker y cols., 1989).

Cerca del 100% del oxígeno es consumido por la respiración mitocondrial, y los oxidantes fuertes son normalmente producidos como bioproductos. La inhibición del complejo I incrementa la producción de las EROs, las cuales tienen como blanco la cadena transportadora de electrones (Cohen, 2000), generando un daño mitocondrial y la producción de nuevas EROs.

#### **1.5 Estrés oxidativo y Parkinson**

El SNC es muy susceptible al estrés oxidativo, debido a su alto consumo de oxígeno y contenido de ácidos grasos, la baja cantidad de enzimas antioxidantes, y el elevado nivel de metales. Dentro de las evidencias del estrés oxidativo en la EP se encuentran: cambios en la forma de la SNpc, incremento en la PL, reducción de los niveles de la glutatión y altas concentraciones de hierro y EROs (Ciechanover y Schwartz, 1998; Jha y cols., 2000; Merad-Boudia y cols., 1998). Éstas evidencias del estrés oxidativo en la EP son localizadas en la SNpc, el déficit inicial de la DA conduce a un aumento compensatorio en la síntesis dopaminérgica en las neuronas remanentes, reflejado en el incremento del recambio de ácido homovanílico/DA. Paralelamente, el metabolismo de la DA genera EROs, lo cual, unido a la reducción en la SNpc de varias enzimas antioxidantes, provoca un aumento en el estrés oxidativo y un exceso en la producción de radicales libres (Olanow y Tatton, 1999).

#### **1.6 Tratamiento de la enfermedad de Parkinson**

El tratamiento farmacológico de la EP se divide en dos categorías: 1) sintomáticos, para mejorar los signos y síntomas de la enfermedad, 2) protector, interferir con los mecanismos patofisiológicos de la enfermedad. En el tratamiento

quirúrgico, se practica la talamotomía, palidotomía y estimulación de lo NST y GPi. (Waters, 2002). No existe ningún tratamiento preventivo definitivo capaz de interferir con los mecanismos fisiopatológicos que originan la enfermedad.

### 1.6.1 **Tratamiento farmacológico**

#### 1.6.1.1 *Levodopa*

El tratamiento farmacológico sigue siendo por excelencia la levodopa, aunque todavía existe controversia con respecto a cuando y como iniciar el tratamiento (figura 5). Como la DA, no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, se administra su precursor, la levo-dihidroxifenilalanina ó levodopa, que será entonces sustrato de la DOPA descarboxilasa (IDDC) para convertirse en DA. La Levodopa puede ser metabolizada antes de pasar al SNC, por lo que requiere ir acompañada de inhibidores de las reacciones involucradas en su metabolismo: la primera es la conversión de DA, que puede evitarse con inhibidores periféricos de la IDDC; la segunda conversión es a 3-O-metildopa, que puede evitarse con la administración de inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) (Arpa y Vivancos, 2004).

#### 1.6.1.2 *Levodopa/carbidopa*

La L-DOPA con IDDC es la mejor opción terapéutica efectiva para el control de los síntomas parkinsonianos y prácticamente todos los pacientes responden satisfactoriamente. Mejora la discapacidad originada por la enfermedad y mantiene la independencia para las actividades normales de la vida (Waters, 2002). Muchos de los pacientes tratados con levodopa/carbidopa, desarrollan efectos adversos en forma de discinesias coreiformes y distonias, así como fluctuaciones motoras (Goudreau, 2005). Puede provocar sedación, pesadillas durante el sueño y problemas neuropsiquiátricos como alucinaciones, psicosis, manía e hipersexualidad. No mejora algunos síntomas como: congelación, inestabilidad postural, disfunción autonómica y demencia. No detiene la progresión de la enfermedad y los metabolitos oxidativos derivados del catabolismo podrían acelerar la EP (Arpa y Vivancos, 2004).

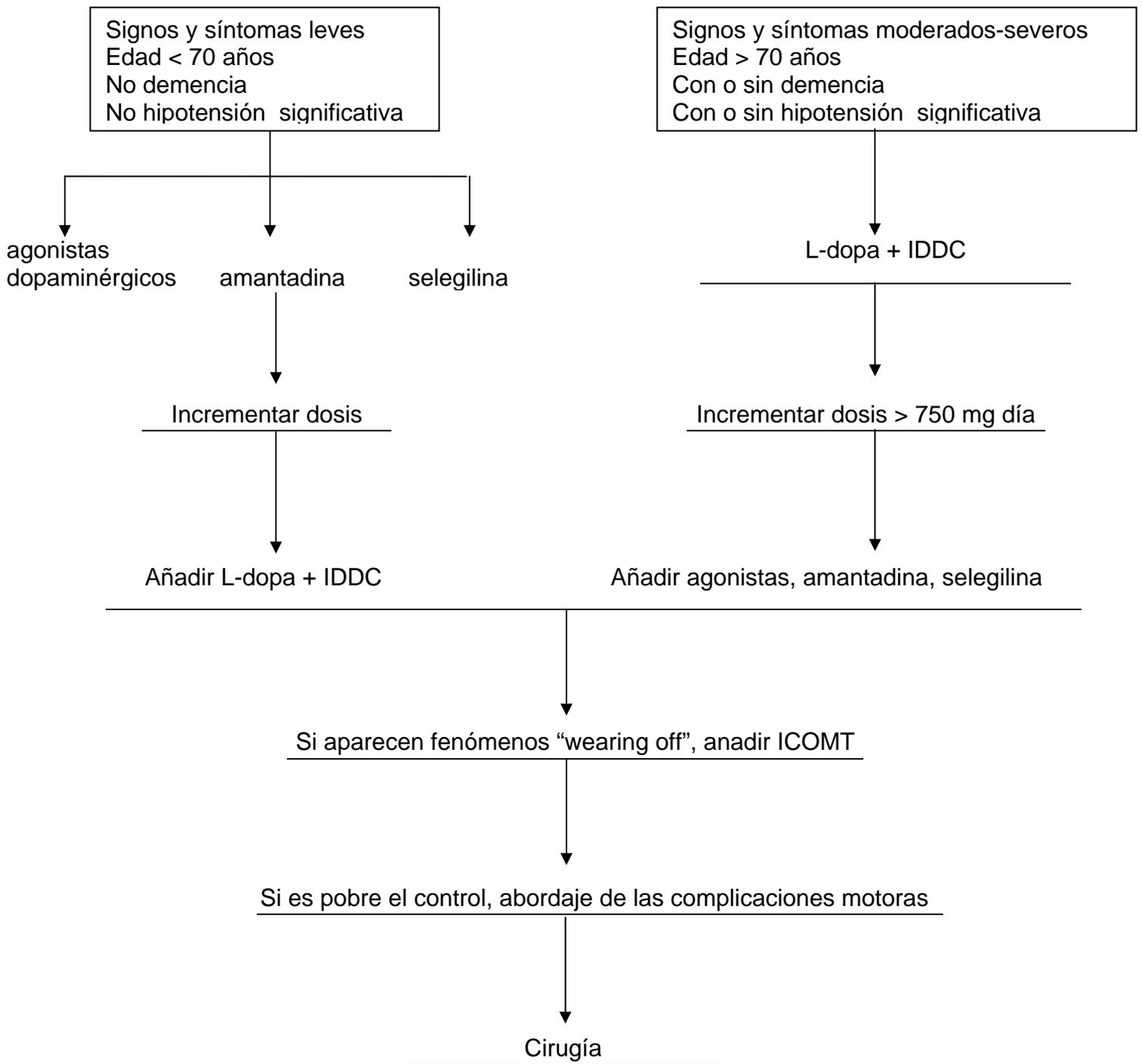


Figura 5. Esquema del tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Arpa y Vivancos, 2004).

### 1.6.1.3 *Inhibidores de la COMT*

En los últimos años han surgido dos fármacos inhibidores de la COMT: a nivel periférico (entacapone) y a nivel central y periférico (tolcapone). Estos fármacos se administran junto con la L-DOPA, consiguiendo que los niveles en el plasma sean más estables, reduciendo la estimulación pulsátil de los receptores dopaminérgicos (Arpa y Vivancos, 2004). El entacapone es un inhibidor de baja liposolubilidad, por lo que no cruza con facilidad la barrera hematoencefálica, a diferencia del tolcapone, que no solo es más liposoluble, sino que también es un inhibidor más potente y de mayor vida media. Se ha comprobado que el uso de estos fármacos permite reducir la dosis de levodopa/carbidopa administrada continuamente. Dado que se ha reportado la posibilidad de insuficiencia hepática aguda con tolcapone, no se recomienda su uso en pacientes que no respondan bien al tratamiento con levodopa. Los trastornos hepáticos son menos frecuentes e intensos con entacapone, pero debe monitorearse la función hepática con cualquiera de estos agentes. Aparte de los efectos secundarios mencionados anteriormente, los pacientes tratados con inhibidores de la COMT pueden presentar diarrea y coloración amarillo-brillante en la orina (Wahba y cols, 2005).

### 1.6.1.4 *Agonistas dopaminérgicos*

Los agonistas dopaminérgicos son fármacos que actúan directamente sobre los receptores de DA (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>). Estos agentes no se metabolizan por una vía oxidativa, de esta forma no se genera la producción de radicales libres propios del metabolismo de la DA. Su eficacia terapéutica no depende del número de neuronas dopaminérgicas funcionales, a diferencia de lo que sucede con fármacos como la levodopa o los inhibidores del metabolismo de la DA. Por esta razón, el uso en conjunto de los agonistas con levodopa permite reducir la dosis de la misma, disminuyendo la frecuencia de respuesta motora fluctuante y discinética (Kuniyoshi y Jankovic, 2005).

Los representantes básicos de agonistas dopaminérgicos son: bromocriptina, pergolide, cabergolina, pramipexol, ropinirol, apomorfina, lisuride y piribedil. Dentro de los efectos adversos del uso de estos fármacos son: náuseas, vómitos, hipotensión ortostática, alucinaciones, vasoespasmo, eritromelalgia fibrosis pleural-pulmonar y somnolencia (Kuniyoshi y Jankovic, 2005).

#### 1.6.1.5 *Inhibidores de monoamino oxidasa (MAO)*

La selegilina es el agente prototipo de este grupo, es un inhibidor selectivo de la MAO B. Mejora el aspecto psicomotor con su uso, además sus propiedades inhibitorias pueden también contribuir a su efecto terapéutico. Las reacciones adversas incluyen cefalea, sudoración profusa e insomnio, así como manifestaciones propias de la activación dopaminérgica: alucinaciones, náuseas, vómito e hipotensión (Bertoni, 2005).

#### 1.6.1.6 *Amantadina*

Se sabe del efecto antiparkinsoniano de la amantadina desde los años sesenta, cuando se usaba para la profilaxis de la influenza. La farmacología de la amantadina es compleja, ya que puede: aumentar la liberación de DA, inhibe la recaptura de la DA, bloquea los receptores muscarínicos y bloquea los receptores glutamatérgicos. La amantadina es útil para el control de las discinesias. Los efectos secundarios más frecuentes son: edemas, nerviosismo, cefalea, insomnio, sequedad de boca, alopecia, anorexia, alucinaciones, ideas paranoicas y ocasionalmente somnolencia (Arpas y Vivancos, 2004; Lyons y Pahwa, 2005).

#### 1.6.1.7 *Anticolinérgicos*

Las primeras drogas usadas para tratar la enfermedad de Parkinson fueron los anticolinérgicos. Estos agentes se consideran como coadyuvantes, presentan un buen sinergismo con la levodopa permitiendo reducir la dosis de levodopa y mejora los síntomas del temblor. Algunos representantes de este grupo de fármacos son el trihexifenidilo, la benztropina, el biperideno, la prococlidina, la etopropazina, la difenhidramina y la orfenadrina. Todos estos agentes son antagonistas muscarínicos competitivos. Aunque no se contraindican de manera absoluta, estos agentes son poco tolerados en los pacientes ancianos debido a sus efectos colaterales: retención urinaria, visión borrosa, constipación, xerostomía, taquicardia y confusión mental (Jabbari y Pazdan, 2005).

## 1.6.2 *Tratamiento quirúrgico*

### 1.6.2.1 *Palidotomía*

En los años 50's se utilizó la palidotomía con la finalidad de aliviar el temblor. Inicialmente se realizaban en la región anterodorsal en el segmento interno del GPi. Sin embargo, las lesiones en esta región no proporcionaron resultados satisfactorios (Baba y cols., 2005).

Leitinen y sus colaboradores realizaron la palidotomía posteroventral encontrando un marcado mejoramiento del parkinsonismo. La palidotomía posteroventral unilateral puede mejorar el parkinsonismo (temblor en reposo, rigidez y la acinesia/bradicinesia), de los efectos colaterales inducidos por la levodopa y las deshabilidades axiales (inestabilidad de la postura y alteraciones del paso) en pacientes tempranos y avanzados con la EP (Leitinen y cols., 1992).

### 1.6.2.2 *Talamotomía*

La talamotomía fue introducida en los años 50s realizando las lesiones con químicos, calentando ó congelando (Waters, 2002) para el tratamiento del temblor. Posteriormente, los estudios de electrofisiología ayudaron a determinar que los núcleos intermedios ventrales del tálamo son las estructuras cerebrales para el tratamiento del temblor en la EP. Esta técnica fue realizada en los años 50s y 60s (Ohye y Narabayashi, 1979).

La talamotomía de los núcleos intermedios ventrales, permite también el tratamiento de temblor que no pueden ser controlado con medicamento, como son: el temblor esencial, cerebelar, post-traumático, temblor ocasionado por un golpe y desórdenes hiperkinéticos como: distonia, hemibalismo y discinecias (Baba y cols., 2005).

### 1.6.2.3 *Estimulación del GPi*

La estimulación del pálido tiene efectos clínicos semejantes a la palidotomía, estudios de eficacia realizados entre la palidotomía y la estimulación del pálido concluyen que estas son comparables (Pahwa y col., 1997). La estimulación mejora todas las formas de parkinsonismo y las discinecias inducidas por la levodopa. Esto

depende de la localización de la estimulación del pálido, si la estimulación se da en la zona dorsal del GPi mejora la rigidez, ascinecia y alteraciones en el paso y puede generar el estado de "off". Por otro lado, si la estimulación se da en la zona posteroventral del GPi mejora la discinecia inducida por la levodopa, el paso y la ascinecia. La estimulación en la zona ventral del GPi mejora la rigidez y alivia por completo la discinecia inducida por la levodopa pero produce severa ascinecia. En la región dorsal se da una mejora moderada de la ascinecia y las discinecias inducidas por los fármacos (Baba y cols., 2005).

#### *1.6.2.4 Estimulación de los NST*

La estimulación subtalámica no solo mejora los signos y síntomas parkinsonicos, también ayuda en reducir la dosis de levodopa diaria. En una estimulación bilateral se mejora la inestabilidad axial. No todos los enfermos de parkinson son candidatos a la estimulación subtalámica o del pálido, solo aquellos que responden al tratamiento con levodopa. En pacientes con parkinson vascular no responden a la levodopa por lo que no van a responder a la estimulación. La edad, la duración de la enfermedad y la severidad de las alteraciones motoras debido a la levodopa, son factores para considerar para la estimulación subtalámica (Waters, 2002; Baba y cols., 2005).

### **1.7 Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson**

La pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc, junto con la disminución del contenido de DA estriatal, representan las alteraciones histológicas y neuroquímicas al inducir destrucción de las neuronas del sistema nigroestriatal y con ello la disminución de la DA en el CE. Esto se ha podido lograr utilizando neurotoxinas que destruyen selectivamente estas células (Dauer y Przedborski, 2003).

#### **1.7.1 6-Hidroxidopamina (6-OHDA)**

La 6-OHDA es el primer modelo animal de la EP asociado a la muerte neuronal dopaminérgica de SNpc. Fue introducido hace más de 30 años (Ungerstedt, 1968). La toxicidad de la 6-OHDA es relativamente selectiva para las neuronas dopaminérgicas, resultado de la recaptura preferencial por DA y los transportadores noradrenérgicos

(Luthman y cols., 1989). En el modelo, hay sensibilidad a 6-OHDA entre los grupos neuronales dopaminérgicos del mesencéfalo ventral; la pérdida más grande se observa en la SNpc (Jonsson, 1980). La 6-OHDA se acumula en el citosol de las neuronas, formando las EROs e inactivando las macromoléculas biológicas generando las quinonas que atacan a grupos nucleofílicos (Cohen y Werner, 1994).

La 6-OHDA no puede atravesar la barrera hematoencefálica, debe ser administrada por inyección estereotáxica local en la SNpc o el CE para afectar la vía dopaminérgica nigrostriatal (Javoy y cols., 1976; Jonsson, 1983). Hasta ahora, ninguna de las formas de intoxicación con 6-OHDA ha conducido a la formación de cuerpos de Lewy (Ungerstedt, 1971; Bjorklund y cols., 2002).

### 1.7.2 *Paracuato*

El herbicida paracuato (N,N'- dimetil-4,4'-bipiridinio) también induce toxicidad y se usa como modelo de la EP. La exposición al paracuato es factor de riesgo para la EP (Liou y cols., 1997). Sin embargo, el paracuato no atraviesa la barrera hematoencefálica fácilmente (Shimizu y cols., 2001) y su distribución en el SNC no es uniforme a la distribución enzimática y neuroanatómica (Widdowson y cols., 1996a; 1996b.). El paracuato actúa mediante la formación de radicales superóxido (Day y cols., 1999). La administración sistémica del paracuato en ratones degenera a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc acompañada de inclusiones que contienen  $\alpha$ -sinucleína, así como el aumento de ésta en las inmunotinciones en la corteza frontal (Manning-Bog y cols., 2002; McCormack y cols., 2002). Se debe ver si la toxicidad en las neuronas dopaminérgicas es selectiva o afecta a otros tipos celulares.

### 1.7.3 *Rotenona*

Es el más potente miembro de los rotenoides, una familia de compuestos citotóxicos naturales extraídos de plantas tropicales, es usada extensamente en insecticidas y se encuentra en peces venenosos. La rotenona es altamente lipofílica y es fácilmente absorbida a todos los órganos (Talpade y cols., 2000). La rotenona ataca e inhibe el complejo I de la cadena respiratoria en la mitocondria. La exposición a este pesticida es un factor de riesgo. Se ha reportado que la administración intravenosa de

dosis pequeñas de rotenona en ratas produce degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales acompañadas por inclusiones con  $\alpha$ -sinucleína (Betarbet y cols., 2000). La rotenona se puede incorporar libremente a todas las células, las neuronas dopaminérgicas son más sensibles a la inhibición del complejo I. Este fue el primer modelo que sirvió para relacionar una toxina ambiental con la EP, con la característica patológica de la agregación del  $\alpha$ -sinucleína.

#### **1.7.4 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)**

La neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) es un derivado meperidínico, es capaz de producir parkinsonismo en el hombre, (Langston y cols., 1983), primates (Burns y cols., 1983) y roedores (Heikkila y cols., 1984). La MPTP tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y destruir las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de manera selectiva, logrando así un modelo que reproduce los aspectos sintomatológicos, neuropatológicos y bioquímicos de la EP (Kopin, 1987; Kopin, 1988).

Su capacidad para inducir un síndrome parkinsoniano fue descubierta de forma accidental a principios de los años ochentas, en un grupo de adictos a la heroína que se inyectaron una meperidina sintética (polvo de ángel). Estos pacientes presentaron un síndrome parkinsoniano permanente, con destrucción selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Langston y cols., 1984). Posteriormente se comprobó que su administración en animales de laboratorio producía un síndrome parkinsoniano asociado a una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Rose y cols., 1993; Irwin y cols., 1993; Ovidia y cols., 1995). Actualmente la administración de la neurotoxina MPTP es el mejor modelo experimental de esta enfermedad, produciendo disminución de la DA en el CE y degeneración celular de la vía nigroestriatal semejante a los déficits en la enfermedad idiopática (Gerlach y cols., 1991).

#### **1.8 Metabolismo de la MPTP**

La MPTP es un compuesto lipofílico que atraviesa la barrera hematoencefálica en minutos. En el cerebro, la MPTP es oxidada a 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio

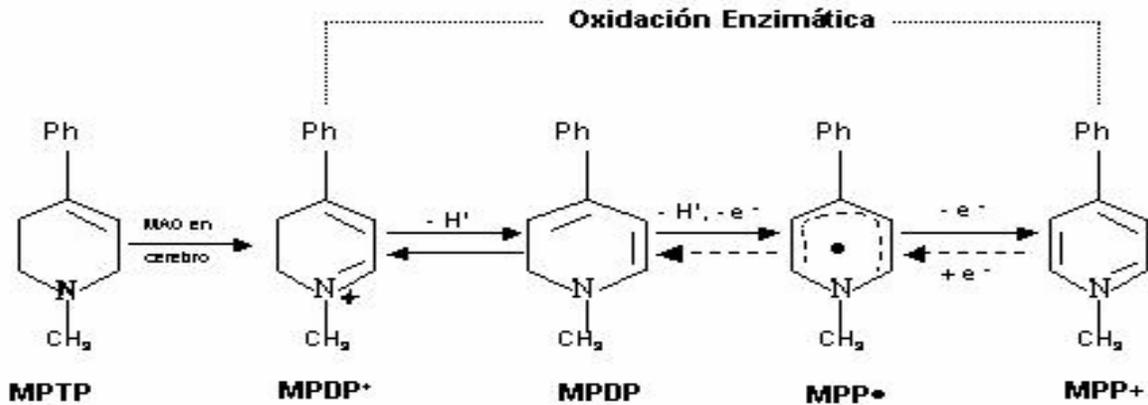
(MPDP+) por la monoamina oxidasa B (MAO-B) localizada en astrogliá. Éste compuesto es oxidado a 1-metil-4-fenilpiridino (MPP<sup>+</sup>), probablemente por oxidación espontánea la molécula tóxica activa es liberada por un mecanismo desconocido al espacio extracelular (figura 6). El MPP<sup>+</sup> depende de acarreadores en la membrana plasmática para penetrar a la neuronas dopaminérgicas, éste tiene gran afinidad al transportador de DA (figura 7A) (Dauer y Przedborski, 2003). Dentro de la célula el MPP<sup>+</sup> puede seguir la ruta de unirse al transportador vesicular de DA, el cual une el MPP<sup>+</sup> a la vesícula sinaptosomal; puede permanecer en el citosol interactuando con enzimas citosólicas, especialmente con aquellas que tengan carga negativa (figura 7B) (Dauer y Przedborski, 2003).

Los niveles de MPP<sup>+</sup> elevados en el citoplasma generan la liberación y acumulo de glutamato, calcio libre y EROs dentro de las neuronas. Esto conduce a la inhibición del complejo I de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (Cleeter y cols., 1992). El daño a la respiración por el estrés oxidativo a la mitocondria puede afectar la producción del ATP celular y con ello la muerte neuronal (Chan y cols., 1991). La generación de radicales libres en la neurona pueden causar el daño al ADN, lípidos y la estructura de proteínas (Jenner, 1998b) (figura 7b).

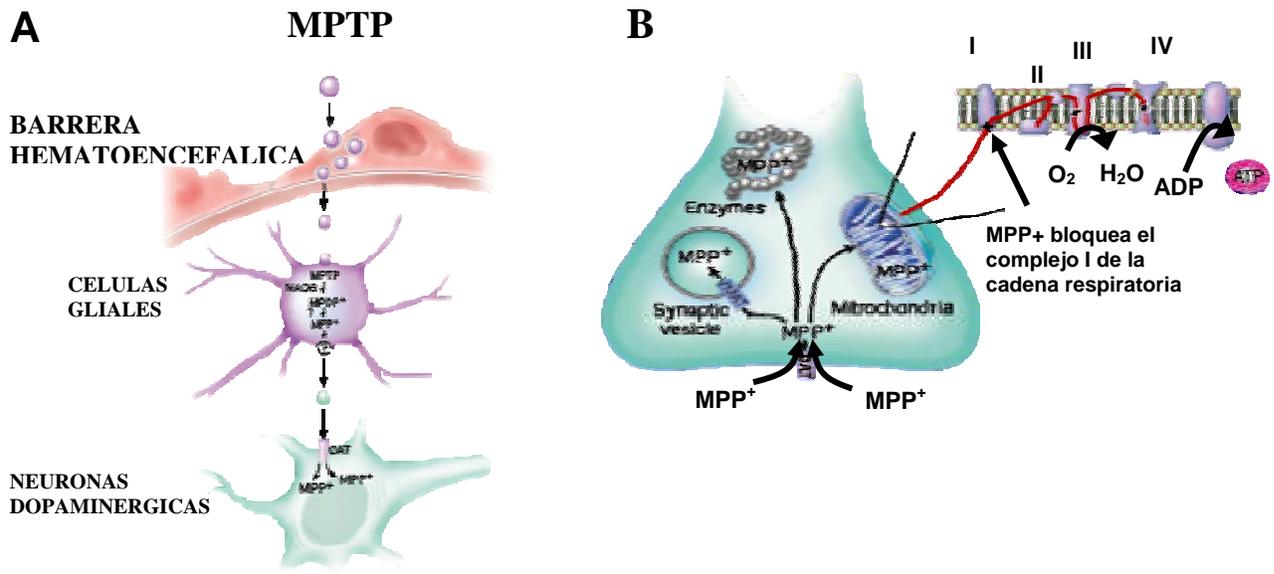
### **1.9 Enzimas y proteínas antioxidantes**

La vida en presencia del oxígeno molecular exige contar con sistema múltiple de defensas contra los diversos radicales libres del oxígeno, que por un lado tienden a impedir su formación y por otro, los neutralicen una vez formados. El antioxidante al entrar en contacto con el radical libre cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un radical débil no tóxico.

Los antioxidantes se dividen en endógenos, que son sintetizados por la célula; y los exógenos o antioxidantes que se integran a través de la alimentación (tabla 1). Cada antioxidante tiene una cierta afinidad por cada radical.



**Figura 6.** Oxidación de la MPTP a el metabolito tóxico MPP+, pasando por los metabolitos intermedios. MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina. MPDP+: ión1-metil-4-fenil-3,4-dihidropiridino. MPP+: ión 1-metil-4-fenilpiridino. (Tomado de Sayre, L.M., 1989)



**Figura 7.** A) Representación esquemática del metabolismo de la MPTP. B) Representación esquemática de las vías que sigue el MPP+ dentro de la célula. MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina. MPP+: ión 1-metil-4-fenilpiridino (Tomado de Dauer y Przedborski, 2003).

### 1.9.1 **Glutación peroxidasa**

Existen varias isoenzimas de la glutación peroxidasa (GSHPx). La forma principal es la citosólica, glutación-S-transferasa (GSH-S-T) y glutación hidroperoxidasa fosfolipídica. GSHPx cataliza la oxidación de la glutación en forma reducida a la oxidada en la presencia del  $H_2O_2$ . La GSHPx se encuentra distribuída en el citoplasma y la matriz de la mitocondria abundantemente en el hígado, con actividad moderada en el pulmón, corazón y cerebro.

La GSH-S-T realiza reacciones de peroxidación usando glutación para catalizar el peróxido lipídico. Se encuentra en el citoplasma y pequeñas cantidades en la membrana de la mitocondria y retículo endoplásmico, de todos los órganos. La glutación hidroperoxidasa actúa sobre los peróxidos fosfolipídicos de la membrana citoplásmica, protegiendo a la membrana de la PL (Nakazawa y cols., 1996).

### 1.9.2 **Superóxido dismutasa (SOD)**

La SOD acelera la dismutación del  $O_2^{\cdot -}$  a  $H_2O_2$ . Existen tres tipos de SOD en humanos que se han purificado: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y la SOD extracelular (EC-SOD) (Marklund, 1984). La Cu/Zn-SOD tiene sitios activos para el ión de Cu y uno para el ión Zn, el ión Cu sirve como sitio activo del redox y el Zn para mantener la estructura de la proteína (Fridovich, 1975). Se encuentra abundantemente en el citoplasma y en el núcleo. La Mn-SOD se localiza en la matriz de la mitocondria y la EC-SOD está presente en el plasma unido al sulfato de heparina en la superficie de las células endoteliales (ver revisión Nakazawa, y cols., 1996).

### 1.9.3 **Catalasa**

Enzima localizada en el interior de los peroxisomas (organelos celulares que participan de forma importante en la desintoxicación), su función es la de catalizar la dismutación de peróxido de hidrógeno en agua y en oxígeno molecular. La actividad de esta enzima esta limitada por su localización exclusiva en los peroxisomas (Roche y Romero-Alvira, 1997).

Tabla 1. Enzimas atrapadoras del oxígeno y radicales libres y antioxidantes (Tomado de Nakazawa y cols, 1996)

ANTIOXIDANTE	LOCALIZACIÓN	AFINIDAD
<b>ENDÓGENOS</b>		
Glutación reducido	Citoplasma, mitocondria	Atrapa el $\cdot\text{HO}$ y $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$
GSHPx	Citoplasma, mitocondria	Degradación de $\text{H}_2\text{O}_2$ y peróxido lipídico.
GSH-S-T	Membrana celular, citoplasma, mitocondria, retículo endoplásmico	Degradación de $\text{H}_2\text{O}_2$ y peróxido lipídico.
Mn-SOD	Mitocondria	Atrapa el $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$
Cu/Zn-SOD	Eritrocitos, citoplasma	Atrapa el $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$
EC-SOD	Plasma de la sangre	Atrapa el $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$
Catalasa	Peroxisomas	Atrapa el $\text{H}_2\text{O}_2$
Ferritina	Citoplasma	Quelante de $\text{Fe}^{2+}$
Transferrina	Fluido extracelular	Quelante de $\text{Fe}^{2+}$
Lactoferrina	Fluido extracelular	Quelante de $\text{Fe}^{2+}$
Ceruloplasmina	Fluido extracelular	Quelante de $\text{Cu}^{2+}$ , oxidación de $\text{Fe}^{2+}$ , atrapa $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$
Albúmina	Fluido extracelular	Quelante de $\text{Cu}^{2+}$ , atrapa $\cdot\text{HO}$ , peróxido lipídico
Metalotioneina	Cerebro, epitelio escamoso estratificado	Atrapa el $\cdot\text{HO}$ , $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$ , peroxinitrito
<b>EXÓGENOS</b>		
Vitamina E	Biomembrana	Atrapa $\cdot\text{HO}$ , etc
Vitamina C	Citoplasma	Atrapa $\cdot\text{HO}$ y $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$
Betacarotenos	Biomembrana	Atrapa $\cdot\text{HO}$ , etc

#### 1.9.4 *Transferrina y lactoferrina*

La transferrina y la lactoferrina son proteínas acarreadoras de Fe. La transferrina solamente se encuentra en el espacio intersticial, pero la lactoferrina se encuentra tanto en el espacio intersticial como en el citoplasma (Nakazawa y cols., 1996). El átomo de  $\text{Fe}^{2+}$  que se libera en la conversión del hemo a biliverdina, se transporta a la médula

ósea por medio de una b-globina, llamada transferrina, por lo que la mayor parte de este  $\text{Fe}^{2+}$  se recupera en lugar de excretarse. Es evidente que la cantidad de hierro libre en la célula es muy baja, constituyendo las proteínas (la ferritina y la transferrina) un importante mecanismo de defensa antioxidante, ya que al secuestrar al hierro impiden que participe en la reacción de Fenton y se inicie la reacción en cadena de la formación de radicales libres comentada anteriormente (Ríos de Molina, 2003).

#### 1.9.5 **Ferritina**

La ferritina es una proteína que almacena el Fe en el citosol, protege contra la reacción de Fenton (Waters, 2002).

#### 1.9.6 **Ceruloplasmina**

Es una glucoproteína grande, que puede tener de 6-7 iones de cobre por molécula y se encuentra en el plasma humano. La ceruloplasmina inhibe la peroxidación lipídica. Sin embargo, una característica antioxidante más importante de la ceruloplasmina dependiendo de la actividad de la ferroxidasa, es la oxidación del  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  con la reducción simultánea del  $\text{O}_2^{\cdot -}$  a  $\text{H}_2\text{O}$  (Nakazawa y cols., 1996).

#### 1.9.7 **Albúmina**

La albúmina se encuentra en el plasma en altas concentraciones, unida fuertemente a Cu y débilmente a Fe. La unión a Cu permite que participe en las reacciones oxidantes, eliminando cualquier radical  $\cdot\text{HO}$  que se forme en la superficie de la albúmina, capturándolo con los grupos funcionales sulfidrilos de la albúmina. La albúmina no permite que se escape ningún radical en su medio, a menos que la generación de los radicales esté más allá de su capacidad (Nakazawa y cols., 1996).

#### 1.9.8 **Metalotioneína**

La metalotioneína es una proteína unida a metales que tiene varias características específicas: bajo peso molecular, un alto contenido de metales y cisteínas, aminoácidos no aromáticos y grupos tioles. Existen cuatro isoformas de la metalotioneína, la I y II se expresan en varios tejidos, la III solo en el cerebro y la IV esta

expresada en el epitelio escamoso estratificado (Ebadi y cols., 1995). Empleando la espectroscopía de resonancia de espín electrónico se demostró que la metalotioneína captura el radical  $\cdot\text{HO}$ ,  $\text{O}_2\cdot^-$  (Kumari y cols., 2000) y el peroxinitrito (Ebadi y cols., 2005).

#### 1.9.9 **Vitamina E, C y betacarotenos**

La vitamina E es el principal antioxidante soluble en lípidos; previene la oxidación de grasas, aumenta su acción en presencia de zinc y actúa específicamente con el oxígeno singlete y el radical de ácido graso poliinsaturado. El ácido ascórbico ó vitamina C es un antioxidante del plasma hidrosoluble; es un poderoso inhibidor de la oxidación de lípidos, regenera la vitamina E y es protector de los efectos del tabaco. Es un agente reductor al donar un electrón, captura radicales como  $\text{O}_2\cdot^-$ ,  $\cdot\text{HO}$  y facilita la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . Los carotenoides son provitamina A y se encuentran en la membrana en forma de complejo proteico. Este captura el oxígeno singlete (Velazquez Paniagua y cols., 2004; Nakazawa y cols., 1996).

#### 1.10 **Ginkgo biloba**

Una importante cantidad de productos herbales han despertado el interés dentro de los llamados tratamientos alternativos, siendo el *Ginkgo biloba* uno de los más prominentes. El interés en el árbol del ginkgo tiene ya una larga historia. Considerado un fósil viviente, su presencia en la tierra data de unos 250 millones de años. La palabra ginkgo deriva del chino Yin-kuo, que significa apricot dorado; en tanto biloba hace referencia al aspecto bilobular de las hojas (DeFeudis, 1998).

Se tiene constancia de que ya en el 2800 a.C., en China, sus hojas eran utilizadas como medicinales. Los chinos preparaban infusiones con las hojas del árbol para el tratamiento del asma y bronquitis (Maclennan y cols., 2002).

En la última década se ha acumulado evidencia científica que sugiere que concentrados y extractos purificados de las hojas de *Ginkgo biloba* permiten la protección contra alguna clase de daño neuronal y vascular (Maclennan cols., 2002).

Actualmente se han obtenido numerosos extractos principalmente de las hojas del árbol de *Ginkgo biloba*, uno de ellos es el denominado EGb761, utilizado en este trabajo, el cuál, es una mezcla bien definida y estandarizada que se ha utilizado para el

tratamiento de insuficiencia cerebral, desórdenes cerebrales (incluyendo demencias), problemas neurosensoriales y disturbios en la circulación periférica (De Feudis, 1998).

#### 1.10.1 ***Egb 761***

El Dr. Willmar Schwabe en Alemania caracterizó la actividad farmacológica del extracto de *Ginkgo biloba* registrándolo para su uso terapéutico como EGb761 en 1965. En 1978 sale al mercado con el nombre comercial de Tebonin 761 en preparación oral de 40 mg; para 1982 aparece el Tebonin forte de 80 mg comercializado por Schwabe (De Feudis, 2003).

El EGb761 es un extracto bien definido, mediante un proceso de extracciones se obtienen los compuestos activos de las hojas del árbol de *Ginkgo biloba*. Se han estudiado sus efectos en desórdenes vestibulares, disfunción sexual inducida por antidepresivos, heridas cerebrales traumáticas e hipertensión (Carretero, 2000). Tiene efectos protectores contra la hipoxia, inhibe el factor de agregación plaquetario (FAP), incrementa la reología de la sangre y reduce la permeabilidad capilar (De Feudis, 1998). El efecto terapéutico del EGb761 se atribuye al conjunto de sus constituyentes.

#### 1.10.2 **COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL *Egb761***

La hoja del *Ginkgo biloba* contiene aminoácidos, azúcares sencillos, polisacáridos, ácidos orgánicos, ciclitoles, esteroides, etc. y como principios activos se consideran dos tipos de compuestos de estructura química diferente: flavonoides (aprox. 26%) y terpenoides (aprox. 6-7%) y en menor cantidad ácidos orgánicos (DeFeudis, 1998).

##### 1.10.2.1 *Flavonoides*

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular ampliamente repartidos en la naturaleza, se originan a través de la combinación de la ruta del acetato. En la naturaleza pueden encontrarse tanto en forma libre (geninas) como combinados con azúcares. La mayoría están constituidos por un núcleo bencénico unido a una  $\gamma$ -pirona, incluyendo un segundo anillo bencénico en distintas posiciones del carbono C-1, C-2 o

C-3, dando lugar a los neoflavonoides (llamados propiamente flavonoides) o a los isoflavonoides (De Feudis, 1998; Carretero, 2000).

Los flavonoides son responsables de las coloraciones de muchas flores, frutos y hojas, además de proteger de los efectos nocivos de la radiación UV y ejercer una eficaz actividad antioxidante. Funcionan como captadores de radicales libres, presentan actividad sobre el sistema vascular como factores vitamínicos P (aumento de la permeabilidad y disminución de la resistencia de los capilares sanguíneos), tienen efectos vasodilatadores y actúan inhibiendo distintos sistemas enzimáticos relacionados con la funcionalidad de los vasos (hialuronidasa, catecol-O-metiltransferasa, proteína quinasa C, etc), actividad antiinflamatoria, antiagregante plaquetario, antiviral y anticarcinogénico (DeFeudis, 2003).

El extracto EGb761 contiene un 24-26% de flavonoides, entre los cuales se encuentran principalmente glucósidos flavónicos, kaempferol, quercitina, isoramnetina (con glucosa o ramnosa) y en menor proporción, un 6-7 % de proantocianidinas, principalmente (De Feudis, 1998; Carretero, 2000).

#### *1.10.2.2 Terpenoides*

Los terpenoides son sustancias liposolubles responsables del sabor amargo del EGb761. El extracto EGb761 contiene un 6% de terpenoides. La fracción terpenoide consiste en un grupo de diterpenos (ginkgólidos A, B, C, J y M) y sesquiterpenos (bilobálidos). Los ginkgólidos son antagonistas del FAP, regulan la síntesis de glucocorticoides y tienen actividad antioxidante. Los bilobálidos preservan la función mitocondrial (Eckert y cols., 2003).

#### *1.10.2.3 Ácidos orgánicos*

El EGb761 contiene entre 5-10% de ácidos orgánicos incluyendo el ácido kinurénico, hidrokinurénico, vanílico, ascórbico, que se ha reportado que juega un papel importante aumentando su solubilidad en agua (DeFeudis, 1998).

### 1.10.3 *Farmacocinética*

La farmacocinética comprende los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de todos sus componentes, para determinar su biodisponibilidad, que es un parámetro crucial para determinar la concentración del fármaco en el sitio de acción.

Es extraordinariamente difícil evaluar los parámetros farmacocinéticos del EGb761 debido a sus numerosas sustancias activas y sus posibles interacciones. Además, los índices de los metabolitos de los constituyentes del EGb761 y sus diferentes sitios de acción en el organismo complican el análisis, por lo cual, no existe una evaluación sistemática de la farmacocinética del EGb761, sin embargo las propiedades individuales de algunos de los constituyentes que lo conforman sí han sido estudiadas (DeFeudis, 1998; Biber, 2003).

La absorción de glucósidos flavónicos, después de una administración oral es de al menos el 60% en el intestino delgado, la concentración máxima en plasma se alcanza de 2 a 3 horas, con una vida media de 2 a 4 horas, y se elimina por completo en 24 horas. La biodisponibilidad de los ginkgólidos después de la administración de EGb761 (80 mg) es mayor al 80%, alcanzando una concentración máxima en plasma después de 1 a 2 horas de la ingesta, estos componentes del extracto tienen una vida media de 4 a 6 horas, la principal vía de eliminación es la orina por la cual se pierde el 70%. En el caso de los bilobálidos su biodisponibilidad es del 70% con una vida media de 3 horas, alcanzando la concentración máxima en plasma de 1 a 2 horas, eliminándose en orina el 30% (Kleijnen y Knipschild, 1992).

Los ginkgolidos A, B y los bilobalidos a una dosis de 30mg/kg, adquieren una concentración máxima en el plasma a 1 hora después de su administración, teniendo una vida media de 1.7 horas (ginkgolidos A), 2 horas (ginkgolidos B) y 2.2 horas (bilobalidos) (ver revisión Maclennan y cols., 2002).

En el SNC las estructuras con mayor distribución de EGb761 marcado radiocativamente son hipotálamo, CE e hipocampo. La eliminación de EGb761 se da principalmente por exhalación de CO<sub>2</sub>, orina y heces fecales (DeFeudis, 1998). Después de una administración oral, se encontró que el 17% de la dosis administrada se elimina en las primeras 3 horas en forma de CO<sub>2</sub>, a las 48 horas el 34%, 50% y 13% en forma

de CO<sub>2</sub>, heces y orina respectivamente; y 38% como CO<sub>2</sub>, 30% en heces y 22% en orina después 72 horas. El 60% del EGb761 es absorbido en las 3 primeras horas y sólo el 0.7% a las 48 horas. La concentración máxima en plasma se alcanza después de 1.5 horas de la administración, con un tiempo de vida media de 4.5 horas (Biber, 2003).

#### 1.10.4 **PROPIEDADES DEL EGb761**

##### 1.10.4.1 *Vasomodulador*

El EGb761 ha demostrado ejercer en modelos experimentales, efecto vasoconstrictor o vasodilatador, esto dependiendo de la situación (Auguet Clostre, 1983; Hellegouarch cols.,1985). En contraste con el efecto constrictor, la actividad vasodilatadora parece ser de tipo endotelio-dependiente. Mecanismos alternativos podrían tener ingerencia como: inhibición de la MAO, liberación de PGI<sub>2</sub>, agonismo  $\beta$ -adrenérgico, incremento del secuestro intracelular de Ca<sup>2+</sup>, incremento de la actividad de la oxido-nítrico sintetasa o disminución de la peroxidación lipídica (DeFeudis, 1991; White, 1996). El EGb761 ha demostrado reducir el vasoespasmo, el cual podría tener una amplia aplicación clínica en pacientes con traumatismo cerebral, aterosclerosis sistémica y cerebral, shock cardiogénico y endotóxico, anafilaxia y migraña (Reuse-Blom y Driew, 1988). Esta conducta dual del EGb761 podría responder, de hecho, a la situación previa generada. Es decir, si el sistema requiere dilatación el EGb761 va a dilatar, y si se requiere contracción va a contraer (efecto vasomodulador).

##### 1.10.4.2 *Efectos metabólicos*

El EGb761 ha demostrado incrementar la glucemia y la síntesis de glucógeno en células del músculo liso, de manera dosis-dependiente (Bruel y cols., 1989). En estudios sobre células endoteliales hipóxicas, se pudo comprobar que el EGb761 y los bilobalidos (la fracción terpenóide) pueden retrasar el inicio de la glucólisis hipóxica por prolongación de la generación de ATP. El mecanismo aún no ha sido del todo dilucidado (Janssens y cols., 1995).

#### 1.10.4.3 Inhibición de la FAP

El EGb761 aparece como un agente inhibidor de la agregación plaquetaria, por incremento en la concentración de derivados trombolíticos endoteliales (óxido nítrico o prostaciclina, por ejemplo) (Baroggi, 1986). El ginkgólido B (un componente de la fracción terpenoide) demostró poseer propiedades de FAP. Esta actividad es importante dada la ingerencia del FAP en procesos de edema, inflamación y estados de hipercoagulación (Braquet y cols., 1989).

#### 1.10.4.4 Acción antioxidante

El EGb761 ha demostrado inducir la destrucción de varios tipos de radicales libres, como el anión superóxido, difenil-picril-hidracilo y adriamicilo. Asimismo, reduce los niveles de nitratos de manera dosis-dependiente (Kobuchi y cols., 1997; Marcocci y Maguire, 1994). Por ejemplo, estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron el papel que cumplen los componentes flavónicos en la inhibición de la peroxidación lipídica y el FAP (Barth y cols., 1991; Robak y Gryglewski, 1988; Braquet y cols., 1991). En ese sentido los componentes flavónicos tendrían la capacidad de proteger los sistemas fisiológicos de las diferentes EROs.

Esto resulta particularmente útil cuando se desea tratar los efectos de la oxidación de lipoproteínas en sangre que facilitan el depósito y agregación de placas ateroscleróticas seguidas de hipoperfusión-reperfusión en condiciones hipóxicas. Asimismo, se ha señalado que el descenso de la lipoperoxidación contribuye a disminución de la tasa de lipoproteínas de baja densidad. El hecho de que el EGb761 inhibe la oxidación de cobre mediado por lipoproteínas de baja densidad, éste puede tener favorables implicaciones en enfermedades cardíacas.

Por último, cabe señalar que el EGb761 está asociado con un incremento en la síntesis de prostaciclina e inhibición de radicales libres producidos a partir de la cascada del ácido araquidónico. El EGb761 ha demostrado inhibir dicha cascada de secuencias relacionadas con la muerte programada de células en cultivos de neuronas de cerebelo de rata. En ese sentido, protegería del estrés oxidativo a dichas células (Braquet y cols., 1983).

### 1.10.5 **Efectos del EGb761 en el SNC**

Distintas evidencias sugieren que el EGb761 puede alterar y restaurar una variedad de situaciones y condiciones que involucran al SNC. Esto se realiza a través de los neurotransmisores y receptores, modulación hemodinámico-metabólica, antagonismo del FAP, inhibición MAO y COMT, alfa-agonismo y síntesis/inhibición de ácido nítrico.

#### 1.10.5.1 *Flujo sanguíneo cerebral y metabolismo*

Una deficiencia en el transporte de la sangre en el cerebro conduce a una disminución del oxígeno y los nutrientes a éste. El EGb761 puede aumentar el flujo cerebral de la sangre y alterar el metabolismo energético de la célula que sigue a la inducción de hipoxia (DeFeudis, 2003; MacLennan y cols., 2002). El EGb761 aumentó el flujo cerebral de la sangre en 50-100% en la mayoría de áreas del cerebro. Mientras que los niveles de la glucosa en la sangre también fueron aumentados, EGb761 no alteró la utilización de glucosa cerebral (MacLennan y cols., 2002). Los efectos del EGb761 pueden deberse a varios mecanismos; puede actuar sobre las plaquetas, eritrocitos, la síntesis del factor relajante derivado del endotelio y ciertos efectos sobre antivasoconstrictores. Todas estas propuestas permanecen abiertas para futuras investigaciones (DeFeudis, 2000).

#### 1.10.5.2 *Efectos cognitivos, neurológicos y actividad motora*

Existen muchas evidencias con respecto al aumento en la función cognitiva, después de un tratamiento con EGb761. En un estudio doble-ciego con 50 pacientes con insuficiencia cerebral crónica de origen vascular, divididos en dos grupos, fueron tratados con EGb761 a una dosis de 120 mg diarios o placebo. Encontrando que el grupo administrado con el EGb761 incrementó la actividad motora y la capacidad de comprensión, como también se redujeron los mareos (ver revisión Diamond y cols., 2000).

En estudios a nivel neurológico el tratamiento con EGb761 tiene efectos beneficios, en cuarenta pacientes diagnosticados con leve a moderada insuficiencia cerebrovascular, se les suministró 120 mg/kg diarios de EGb761 durante 12 semanas.

Éstos mostraron incremento en los parámetros que se evaluaron: tinitus, cefalea, mareos y pérdida de la memoria (Maclennan y cols., 2002). También el EGb761 tiene acción antiestrés, teniendo éste gran diferencia con respecto a los convencionales antidepresivos y ansiolíticos, el EGb761 mejora la memoria (DeFaudis y Drieu, 2000).

Son pocos los estudios que se han realizado en el aspecto motor con EGb761. En un estudio donde extirparon la corteza motora y administraron posteriormente EGb761 (50 o 100 mg/kg por días), recuperaron la actividad motora acelerada. Los efectos se empezaron a observar a los tres días de la cirugía y persistieron a los 14 días (Maclennan y cols., 2002). En animales hemiplegicos administrados con EGb761 mejoraron significativamente la actividad motora, en ratas adultas (Brailowsky y Montiel, 1997).

#### 1.10.5.3 Efectos sobre receptores

EGb761 demostró un incremento en el recambio de la norepinefrina en ratas, aumento en la densidad de receptores alfa-2, acetilcolina-muscarínicos (mACh) y serotoninérgicos (5-HT), paralelo a descensos de  $\beta$ -adrenoreceptores (Brunello y cols., 1985; Huguet y Tarrade, 1992). Cabe señalar que el EGb761 inhibe, de manera no específica, la actividad de MAO y COMT (Rojas y cols, 2004; Borchardt y Huber, 1975). El EGb761 y el Cp 202 (un extracto del *Ginkgo biloba* desprovisto de terpenos) demostraron inducir incrementos en sinaptosomas de 5-HT en corteza de ratas (un efecto inhibido por clomipramina). En cambio, el BN 52063 (*Ginkgo biloba* desprovisto de flavonoides) y quercetina (un flavonoide constituyente del EGb761) no evidenciaron incremento en los sinaptosomas. De esta manera, el componente flavonoide parece mediar la 5-HT, lo cual podría resultar en un incremento en la biodisponibilidad de 5-HT en el SNC (Ramassamy y cols., 1992). El mismo efecto ejerce el EGb761 sobre el receptor de DA, al prevenir la neurotoxicidad de MPTP a una dosis optima (Ramassamy y cols, 1990). Por otra parte, un aumento en la sobrevivencia y en la síntesis de DA en el SNC, se ha observado en ratas administradas con EGb761 (Diamond y cols., 2000).

#### 1.10.5.4 Efectos en inflamación

Hay evidencia substancial de como el FAP regula las citocinas en respuesta al proceso inflamatorio (ver revisión Bonavida y Mencia-Huerta, 1994). El FAP estimula la síntesis leucotrienos, los cuales se sabe que participan en procesos de patogénesis y de inflamación.

El factor de necrosis tumoral alfa (FNT-alfa), es una citocina capaz de causar necrosis y regresión de tumores. Du y Li (1998) examinaron los efectos de los ginkgolidos A y B sobre la producción del FNT-alfa y la interleucina-1 (IL-1), en cultivos de microglía de rata. Ambos ginkgolidos A y B inhibieron dosis dependiente la producción de estas citocinas proinflamatorias.

#### 1.10.5.5 Efecto de plasticidad y neurogénesis

La plasticidad neuronal juega un papel muy importante en la recuperación de funciones, cuando ocurre un daño al SNC. El tratamiento con EGb761 subcrónico durante 30 días recupero el daño generado a la corteza frontal (DeFeudis, 1998).

Existen muchas evidencias respecto a su acción similar a las neurotrofinas por parte del extracto del *Ginkgo biloba*. Recientemente Jin y cols. (2006), trabajando con cultivos celulares de neuronas basales de embrión, observaron que un extracto del *Ginkgo biloba* generó más neuronas, dendritas largas y más árboles dendríticos, en neuronas positivas a acetil-colinesterasa y oxido nítrico sintasa, semejantes a los factores de crecimiento neuronal y neurotrófico derivado de cerebro.

La dieta suplementaria con EGb761, también activa la transcripción de genes que codifican péptidos importantes en la función y crecimiento celular. Estos incluyen hormonas de crecimiento, prolactina, neurotrofinas 1, factor de crecimiento placentario, factor neurotrófico derivado de cerebro, factor de crecimiento derivado plaquetario y el factor de crecimiento de insulina (Gohil, 2002).

#### 1.10.6 Efectos adversos del EGb761

No se ha observado que el EGb761 sea mutagénico, carcinogénico, teratogénico ó embriotóxico. Los datos clínicos con respecto al EGb761 se ha visto que es seguro y los efectos secundarios son muy raros. En un 98% de los estudios clínicos la tolerancia

es muy buena y los efectos adversos por el EGb761 son leves, temporales y reversibles. Hasta la fecha, no se ha divulgado ninguno efecto nocivo serio atribuible al tratamiento EGb761 en ensayos clínicos. Con poca frecuencia, los pacientes han desarrollado las reacciones alérgicas de la piel, el trastorno gastrointestinal suave y el dolor de cabeza (Kleijnenand y Knipschild, 1992; Bilia, 2002). En un número pequeño de casos se han divulgado la ocurrencia de hemorragia espontánea en los individuos que tomaban los extractos del *Ginkgo biloba*. Un hombre de 70 años que tomaba *Ginkgo biloba*, mientras tenía una terapia con aspirina, desarrolló hemorragia espontánea del diafragma y en el iris de el ojo (Rosenblatt y Mindel, 1997). Además de estos estudios, el coma se ha divulgado en un paciente de 80 años con Alzheimer que tomaba EGb761 y trazodona simultáneamente (Galluzzi y cols., 2000). Mientras que el EGb761 no se ha ligado a los acontecimientos adversos ya mencionados, estos informes indican ciertamente que la precaución debe ser ejercida al prescribir EGb761 a los individuos que toman otras medicaciones de forma simultánea. Dado que la fracción terpenoide del EGb761 es antagonistas del receptor de FAP, el cuidado particular debe ser tomado cuando los pacientes son prescritos con problemas para coagular.

En una revisión concerniente a los efectos adversos de extractos de plantas, aparece el *Ginkgo biloba* como una de las plantas, en la cual no se observan efectos adversos serios (Ernst, 1998).

## 2 JUSTIFICACIÓN

El EGb761 es uno de los fármacos que proviene de las plantas medicinales que más se utiliza en Europa, para el tratamiento de enfermedades vasculares, de demencia y equilibrio entre otras. Esta cualidad es proporcionada por los componentes del extracto: flavonoides, terpenoides y ginkgolidos, los cuales tienen acción antioxidante y atrapadores de radicales libres. Como también la ausencia de efectos secundarios adversos en el uso clínico de éste. Por tal motivo, este extracto puede ejercer efectos positivos en el modelo experimental de la EP, con MPTP, en el cual, el estrés oxidativo es el causante principal de la muerte neuronal dopaminérgica.

El tratamiento tradicional de la enfermedad genera efectos adversos severos después de un período de 3 a 10 años, ocasionando que la calidad de vida del paciente sea deplorable, al presentarse las discinesias (movimientos involuntarios) y distonias en el 60-80% de los pacientes bajo tratamiento crónico con los fármacos (Kanazawa, 1986). Por lo tanto, la búsqueda de nuevas alternativas en el tratamiento de la EP es de considerable interés.

En un esquema de pretratamiento que realizamos en el laboratorio con EGb761 y administrados con MPP<sup>+</sup> intracerebroventricularmente, encontramos aumento significativo en los niveles de DA e inhibición de la peroxidación de lípidos (Rojas 2001), regulación de la actividad de las enzimas MAO y tirosina hidroxilasa (Rojas, 2004). Estos resultados encontrados demuestran que el EGb761 tiene efectos positivos en la síntesis de la DA, por lo que es importante analizar si el EGb761 recupera el número de neuronas y la función motora, cuando el daño a las neuronas dopaminérgicas se genera primeramente.

### **3 HIPÓTESIS**

Si el EGb 761 tiene una acción de agente antioxidante, atrapador de radicales libres, regulador de enzimas involucradas en el estrés oxidativo, entonces éste reducirá el daño a nivel bioquímico, celular y sintomatológico inducido por la MPTP, en la vía dopaminérgica nigroestriatal

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Determinar el efecto neuroprotector del EGb761 en un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson.

#### **4.2 Objetivos específicos**

Determinar si el postratamiento de EGb761 a ratones administrados con la neurotoxina MPTP:

- restaura el contenido de dopamina (DA) en CE.
- recupera la vía nigroestriatal utilizando la técnica para inmunocitoquímica para la determinación de la tirosina hidroxilasa.
- recupera la actividad locomotora.
- inhibe la PL producida por la administración de la neurotoxina.

## 5 MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Animales

Los experimentos fueron realizados en ratones macho de la cepa C-57 black (25-30g) de 11-13 semanas de edad. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar (12/12h de ciclo luz/obscuridad,  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y humedad relativa (40%) con acceso al agua y alimento *ad libitum*.

La MPTP fue obtenida de RBI (Wayland, MA), los demás reactivos fueron obtenidos de Sigma, Baker, Merck, entre otras.

### 5.2 Formación de grupos experimentales

Los grupos se diseñaron de la siguiente manera con un esquema de 23 días de administración intraperitonealmente (i.p.), sacrificando 24 horas después:

**Grupo I:** se administró solución salina por 5 días (i.p.), posteriormente solución salina (i.p.) por 18 días, (salina + salina).

**Grupo II:** se administró solución salina por 5 días (i.p.), posteriormente EGb761 (i.p.) por 18 días (salina + EGb761).

**Grupo III:** se administró la MPTP (30 mg/kg, i.p.) por 5 días, posteriormente solución salina (i.p.) por 18 días, (MPTP + salina).

**Grupo IV:** se administró la MPTP (30 mg/kg, i.p.) por 5 días, posteriormente EGb761 (i.p.) por 18 días (MPTP + EGb761).

En los grupos II y IV se administraron diferentes dosis de EGb761 para encontrar la dosis óptima (10, 40, 80, 120, 160 y 200 mg/kg). Cada grupo fue conformado por 6 a 8 ratones macho.

### 5.3 Análisis de dopamina

La muerte neuronal que se da en la EP es la causante de los síntomas de bradicinesa, temblor en reposo y la rigidez muscular, por lo cual es importante analizar el contenido de DA en CE por la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los CE.

Posteriormente para su conservación se adicionaron 500  $\mu$ l de una solución de metabisulfito de sodio con ácido perclórico (0.1% p/v) y se sonicaron las muestras con un sistema labsonic (Lab-line, instruments, Melrose Park, IL, USA). Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 15 minutos para la obtención de las catecolaminas, el sobrenadante fue recolectado y filtrado para su análisis de DA, por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector electroquímico como previamente se describió (Rojas y Ríos, 1993). Los resultados fueron expresados como contenido de DA estriatal ( $\mu$ g/g tejido).

## 5.4 Cuantificación neuronal

### 5.4.1 *Procedimiento histológico*

Para observar si hay neuroprotección del EGb761 es importante analizar el número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc, por medio de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) se puede analizar el cuerpo neuronal y sus proyecciones. Los ratones se procesaron para inmunohistoquímica después de la última administración de EGb761 (40mg/kg) ó solución salina. Se anestesiaron con éter y la perfusión se llevó a cabo por vía intracardiaca iniciándose con solución salina al 0.9%, posteriormente se administró de 100 a 200 ml de formaldehído al 10%. Se extrajeron los cerebros y se dejaron en formaldehído al 10% una hora, después se lavaron con agua corriente y se deshidrataron para posteriormente incluirlos en parafina. Se realizaron cortes seriados de la entera SNpc de 40  $\mu$ m en el micrótomo. Los cortes fueron teñidos usando una versión modificada de un protocolo inmunohistoquímico de la TH previamente descrito (Bouilleret y cols., 1999). Los cortes fueron incubados en flotación a +4°C durante 48 hr con un anticuerpo monoclonal de rata para la TH 1:500 (Chemicon), en solución de buffer de fosfatos (PBS) conteniendo Triton X-100 (0.3%) y albumina (1%) grado V. El sistema de inmunoperoxidasa de avidina-biotina (Vector, Burlingame, CA) fue empleado con tetracloruro de 3, 3'diaminobenzidina (0.3%) como cromógeno, adicionando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01%). Los cortes fueron contrastados con violeta de cresilo.

### 5.4.2 *Cuantificación estereológica*

Para analizar el número total de neuronas se utilizó el método estereológico (West y cols., 1991), éste se realizó en forma ciega sin que el observador conozca el

tratamiento del animal. Los cortes seriados de toda la SNpc de 40 micras de grosor, se escogieron de seis a ocho cortes cada 160 micras para su análisis a lo largo de toda la estructura.

Para cuantificar el promedio de neuronas se utilizó el método del disector óptico (Gundersen, 1986). Las neuronas se observaron a un objetivo 100X de cada corte seriado y se colocó un disector, que es un marco de 60 X 60 micras de medición, sobre la imagen del corte. Los resultados fueron expresados como número de células positivas a TH.

#### **5.4.3 Densitometría**

Las proyecciones de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc llegan al CE, y éstas pueden ser analizadas por medio de la inmunoreactividad de la TH como describe Wu y cols. (2002). Al disminuir el número de neuronas, las proyecciones de éstas también disminuyen, razón por la cual se analizó la densidad óptica de la inmunotinción de la TH en el CE. Usando el sistema de imágenes Metamorph (versión 4.5, Universal Imaging Corpations, PA, USA), acoplado a un microscopio de luz (Nikon Eclipse E600) por medio de una cámara de alta resolución con un mecanismo de carga acoplado (Sony CCD-Iris). La señal de la cámara de video fue digitalizada utilizando un convertidor de flash de 8 bits con una resolución de 400 por 250 píxeles proporcionando valores en la escala de grises entre 0 y 255. La densidad se analizó en ocho cortes por animal del toda el área del CE, a un aumento de 4X. El análisis se llevo acabo sin que el investigador conociera la condición experimental del corte. Los resultados fueron expresados como fibras positivas a TH.

#### **5.5 Evaluación conductual**

La actividad locomotora es un índice indirecto para analizar la recuperación del contenido del neurotransmisor de DA en el CE, ya que dicho neurotransmisor esta involucrado en los movimientos locomotores.

El análisis conductual se realizó evaluando la actividad locomotora, como previamente reportó Flip y Cunningham (2003), un día antes de su sacrificio. Cinco ratones por caja se mantuvieron bajo un ciclo de luz/obscuridad de 12 hrs (luz a las

7:00 A.M.), humedad relativa de 50-60% a  $21\pm 1^\circ\text{C}$ , con ingesta de alimento y agua *ad libitum* durante el tiempo de experimentación. Todos los experimentos fueron conducidos por un solo operador en la fase de luz del ciclo circadiano entre las 9:00 y 15:00 horas. Un periodo de habituación de 1 hora se les dió a los animales en el cuarto donde se realizó el proceso experimental.

La actividad locomotora se midió cada 10 minutos en el equipo Opto-varimex minor por 60 minutos (Columbus Instruments, Ohio, USA). El sistema usa sensores con alta intensidad, modulado por luz infrarroja para detectar el movimiento del animal. La actividad locomotora fue asociada con locomoción ambulatoria definida como distancia total recorrida. Los resultados fueron expresados como locomoción total.

## 5.6 Evaluación de la peroxidación de lípidos

La PL es un indicador del daño que se está generando a los ácidos grasos de la membrana lipídica, debido al ataque de los radicales libres formados durante la neurotoxicidad de la MPTP.

La PL fue analizada por la técnica descrita por Triggs y Willmore (1984) y modificada por Rojas y Ríos (1993). En esta se analizó la formación de productos lipídicos fluorescentes (PLF).

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajo el CE inmediatamente. El tejido se pesó y homogeneizó en 2.5 ml de buffer de fosfatos (pH 7.0), este amortiguador permitió conservar las membranas lipídicas del tejido mientras se homogeneizaba. Se tomaron alícuotas de 1 ml del homogenizado y se colocaron en tubos de vidrio con tapa. Posteriormente se adicionaron 3 ml de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v) para separar la fase acuosa de la clorofórmica, en esta última quedan los PFL llamados bases de Schiff y 1 ml de esta fase se transfirió a celdas de cuarzo.

La fluorescencia se midió en un espectrofotómetro para luminiscencia Perkin-Elmer LS50B con una longitud de excitación 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  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) preparado en ácido sulfúrico 0.05M, el cual sirvió de referencia para la medición de los

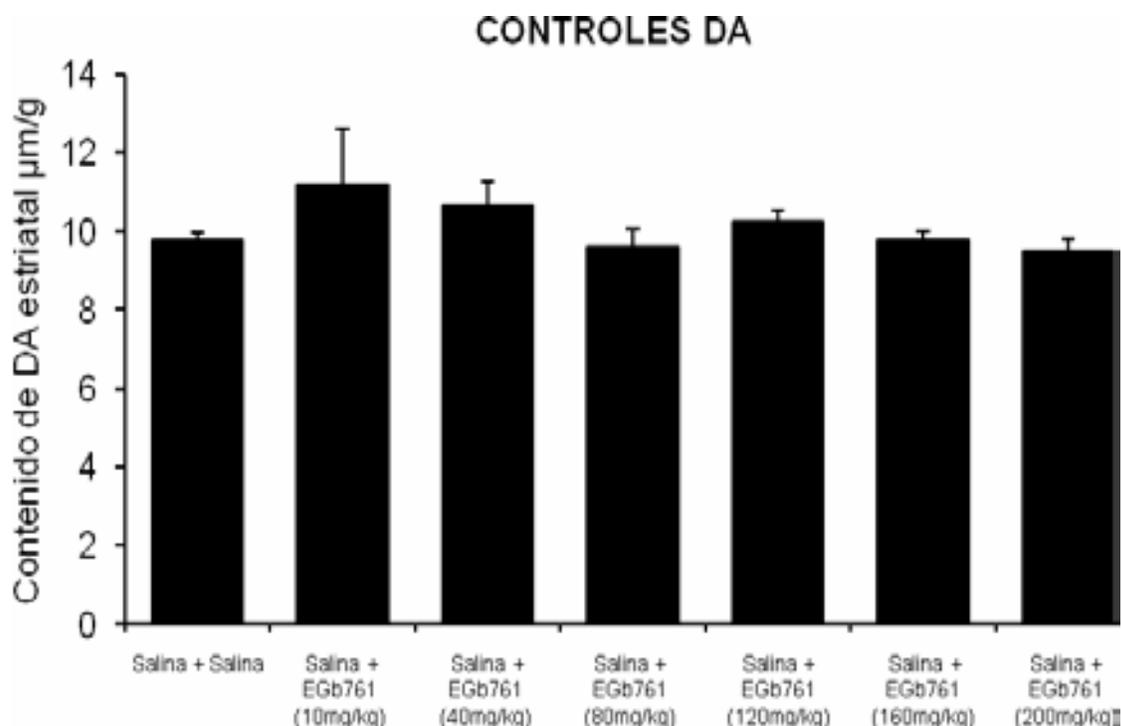
PLF. Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia / gramos de tejido húmedo/ml de extracto leído.

### **5.7 Análisis estadístico**

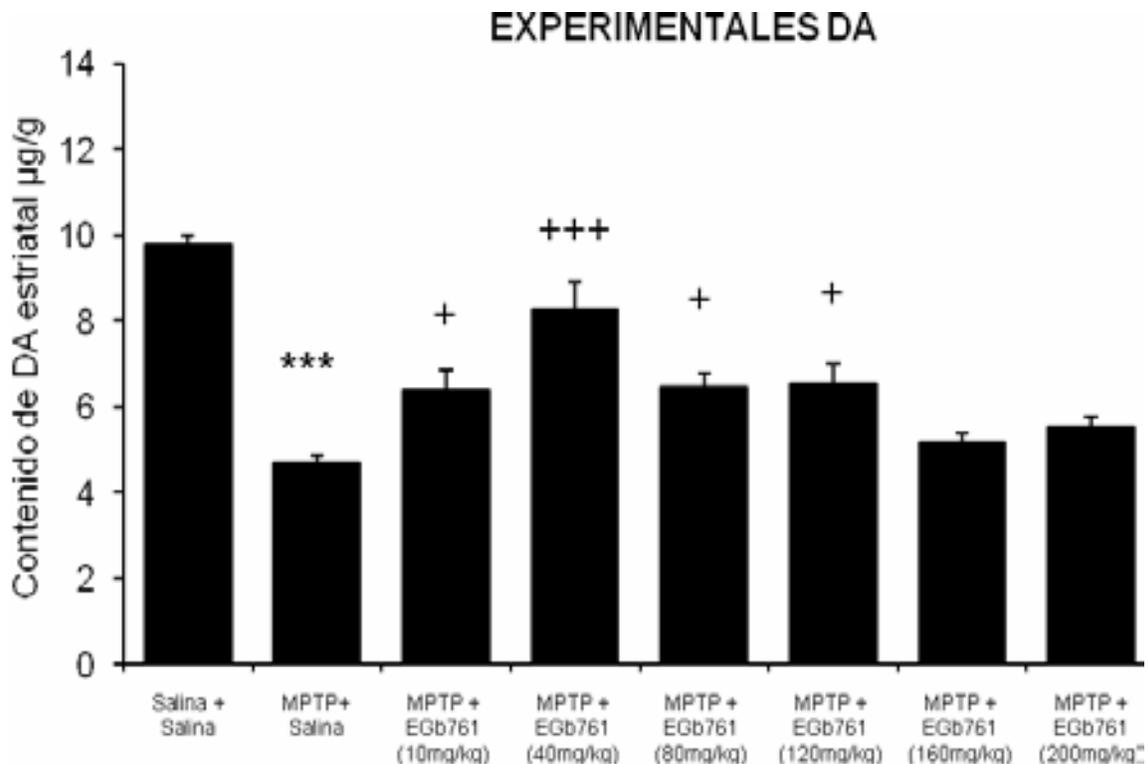
Los datos fueron expresados como medias  $\pm$  EEM. Los resultados se analizaron con la prueba estadística ANOVA de una vía seguida de un análisis de mínima diferencia significativa con Tukey en los niveles de DA, cuantificación estereológica de las neuronas en SNpc positivas a la TH, así como las fibras en CE, la PL. La locomoción fue analizada por una ANOVA de mediciones repetidas, teniendo como factores el tratamiento y dosis, seguida de un análisis de mínima diferencia significativa Newman-Keul's. Los valores de  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## 6 RESULTADOS

La administración de EGb761 a diferentes dosis en ratones control (salina + EGb761) no se observaron diferencias en el contenido de DA estriatal cuando se comparan con los animales control (salina + salina) (figura 8). Los ratones del grupo “MPTP + salina” presentaron disminución del 52% en los niveles de DA al compararse con el salina + salina (figura 9). La administración de EGb761 en ratones tratados con MPTP previamente, recuperaron en un 36, 75, 37 y 38% los niveles de DA en las dosis de 10, 40, 80 y 120 mg/kg de EGb761 respectivamente, cuando se comparan con el grupo de “MPTP + salina”. Al comparar el grupo administrado con “MPTP + EGb761 40mg/kg” no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al



**Figura 8.** Contenido de dopamina en cuerpo estriado en ratones administrados intraperitonealmente de salina durante 5 días, posteriormente EGb761 (10, 40, 80, 120, 160 ó 200 mg/kg) ó salina durante 18 días. Los resultados expresados como media  $\pm$  EEM, n= 6-8 ratones por grupo. Diferencias analizadas usando una ANOVA de una vía seguida de un análisis de mínima diferencia significativa con Tukey. EGb761: Extracto de *Ginkgo biloba*.



**Figura 9.** Contenido de dopamina en ratones administrados intraperitonealmente con MPTP (30mg/kg) o salina durante 5 días, posteriormente EGb761 (10, 40, 80, 120, 160 ó 200 mg/kg) o salina durante 18 días. Los resultados expresados como media  $\pm$  EEM, n= 6-8 ratones por grupo. Diferencias analizadas usando una ANOVA de una vía seguida de un análisis de mínima diferencia significativa con Tukey. \*\*\*  $p < 0.001$  comparado con el grupo “salina + salina”, +  $p < 0.05$  comparado con el grupo “MPTP + salina”, +++ $p < 0.001$  comparado con el grupo “MPTP + salina”. EGb761: Extracto de *Ginkgo biloba*; MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

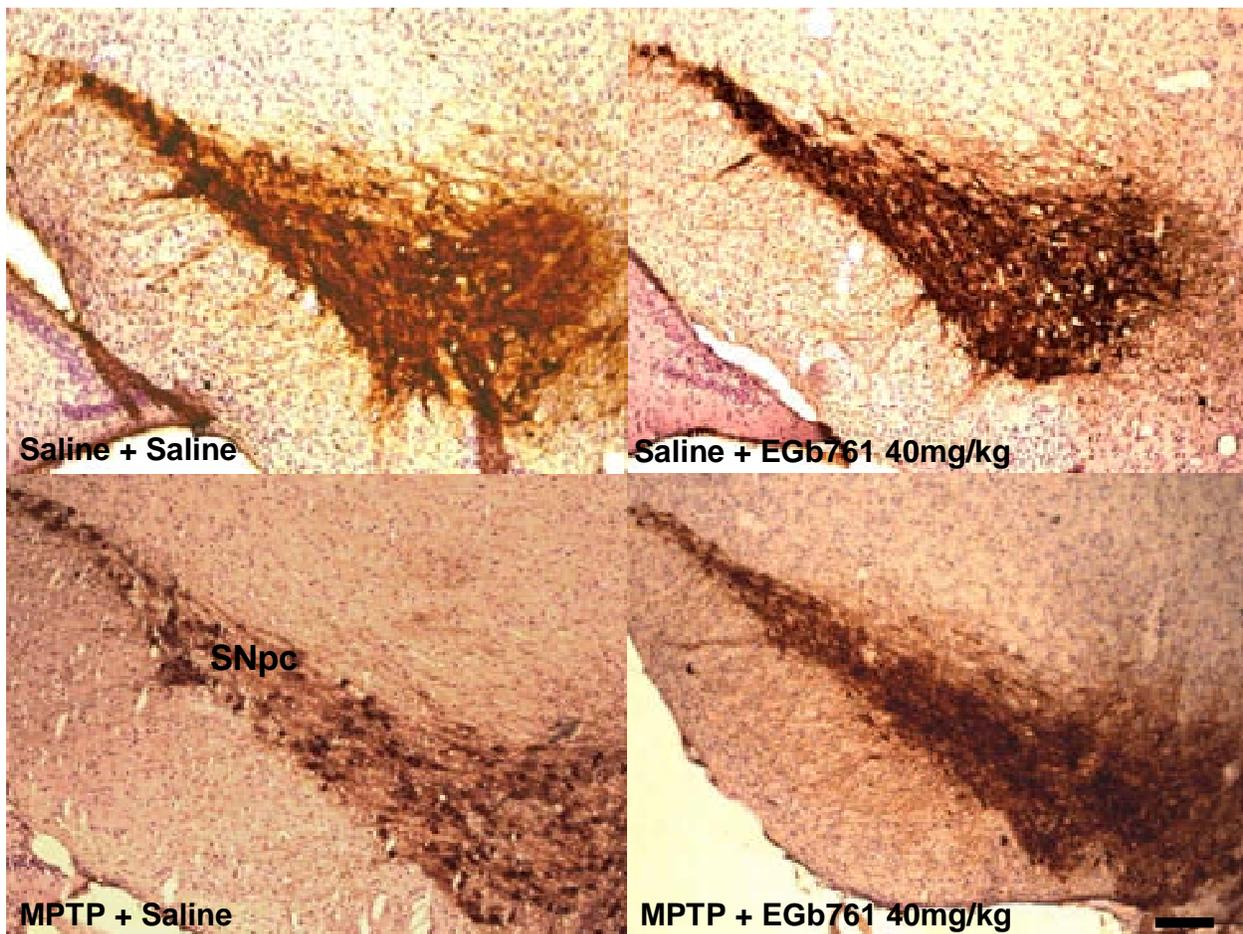
grupo “salina + salina”. Los grupos de “MPTP + EGb761” a las dosis de 10, 80 y 120 mg/kg resultaron diferentes comparado al grupo “salina + salina”.

En la figura 10 se muestran las fotomicrografías de la inmunotinción de TH en la SNpc. En el grupo de ratones administrados con “MPTP + salina” se observa menor tinción comparado al grupo de “salina + salina”. En los ratones administrados con EGb761 (“salina + EGb761” y “MPTP + EGb761”), aumentó la inmunotinción al compararse con el grupo de “MPTP + salina”. Al comparar estos grupos de EGb761 con el grupo “salina + salina” fueron semejantes la inmunotinción.

En el CE la inmunotinción se observó semejante al de la SNpc (figura 11). El grupo de ratones administrados con “MPTP + EGb761” y “salina + EGb761”, conservan

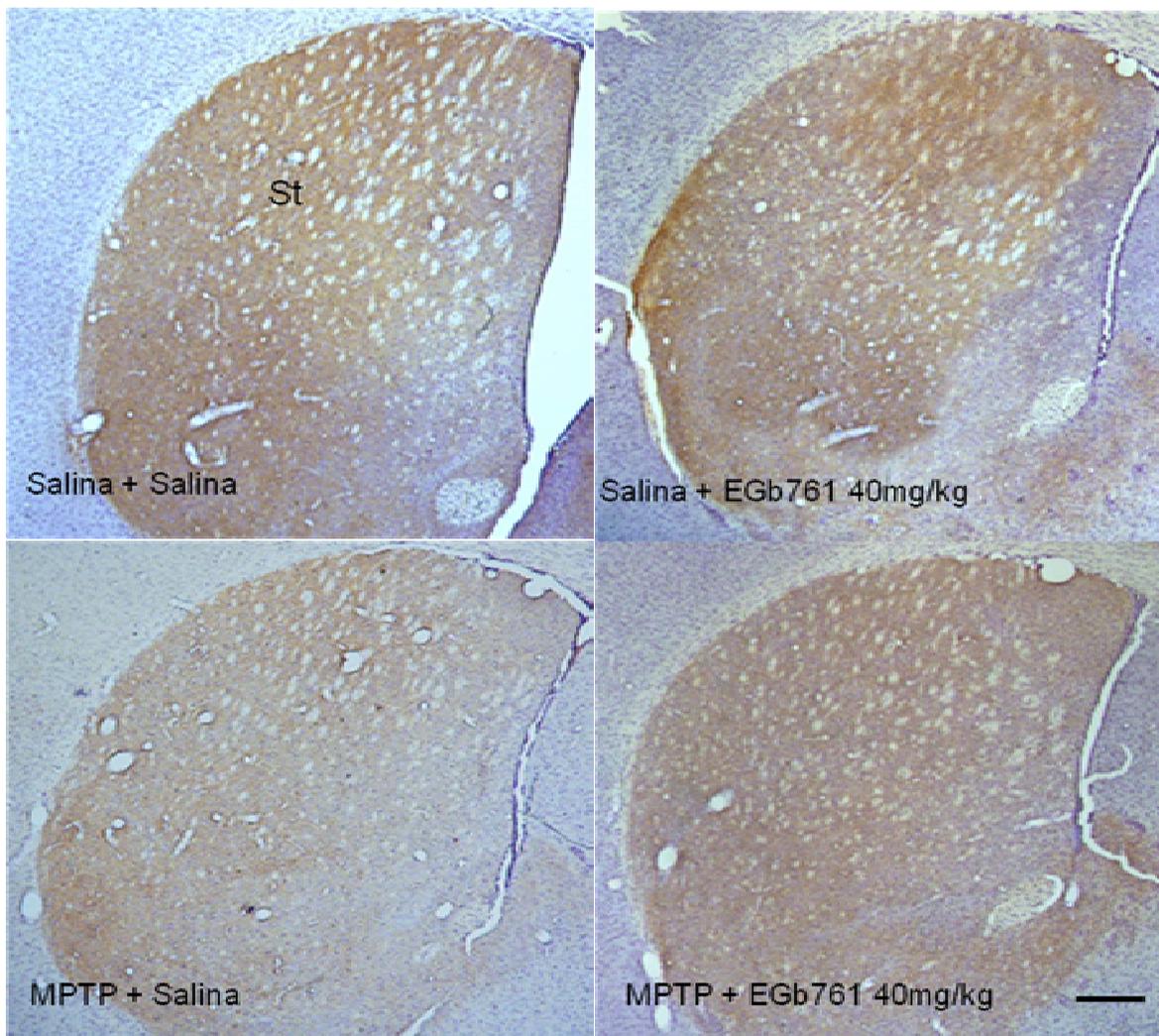
la misma tinción al del grupo “salina + salina”. El grupo de “MPTP + salina” disminuyó la inmunotinción con respecto al grupo “salina + salina”.

Al realizar el conteo de las neuronas positivas a TH en la SNpc, se observó disminución del 44% en los ratones tratados con “MPTP + salina” con respecto al “salina + salina”. La administración del EGb761 (40mg/kg), dosis óptima en la cual se observó aumento en el contenido de DA estriatal, aumentó significativamente el número de neuronas positivas a TH en SNpc (62% de protección comparado al grupo “MPTP + salina”) (figura 12). No se encontraron diferencias en los grupos “salina + EGb761 (40mg/kg)” y “MPTP + EGb761 (40mg/kg)” al compararse con el grupo “salina + salina”.

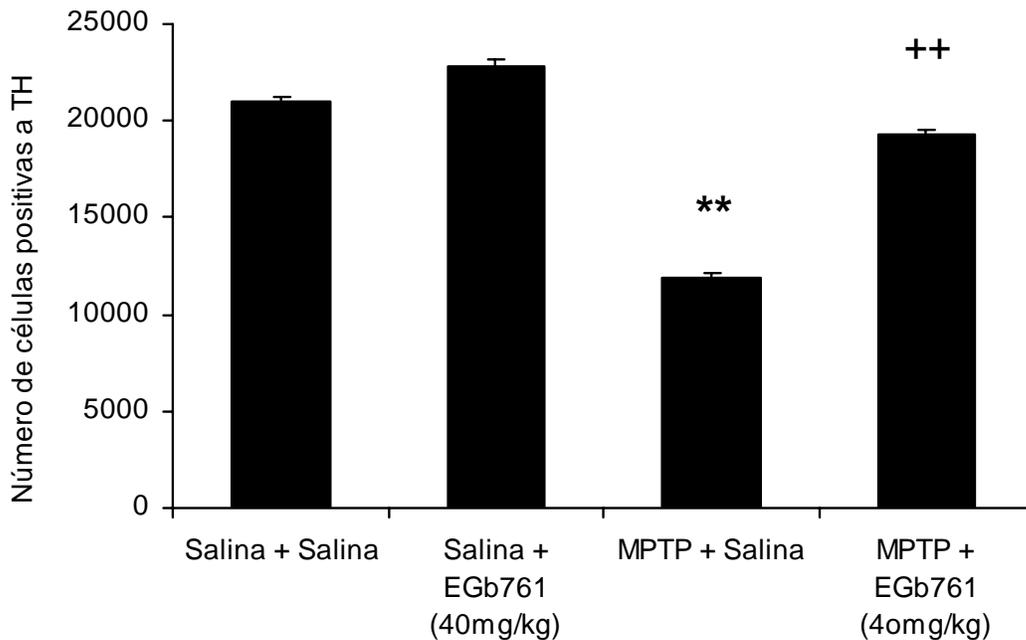


**Figura 10.** Inmunotinción de la tirosina hidroxilasa en la sustancia nigra pars compacta en animales administrados intraperitonealmente con MPTP (30mg/kg) o salina durante 5 días, posteriormente EGb761 (40mg/kg) o salina durante 18 días. Las neuronas y procesos dopaminérgicos en sustancia nigra pars compacta fueron identificadas con la inmunotinción de la tirosina hidroxilasa. Escala de la barra:40  $\mu$ m. EGb761: Extracto de *Ginkgo biloba*; MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

El análisis densitométrico de la tinción de TH en CE demostró una disminución del 29% de las fibras en el grupo de “MPTP + salina”. El grupo que fue postratado con EGb761 (40mg/kg) aumentó en un 44% la tinción de las fibras positivas a TH comparado al grupo de “MPTP + salina” (figura 13). No se observaron diferencias en los grupos administrados con EGb761 con respecto al grupo “salina + salina” (figura 13).

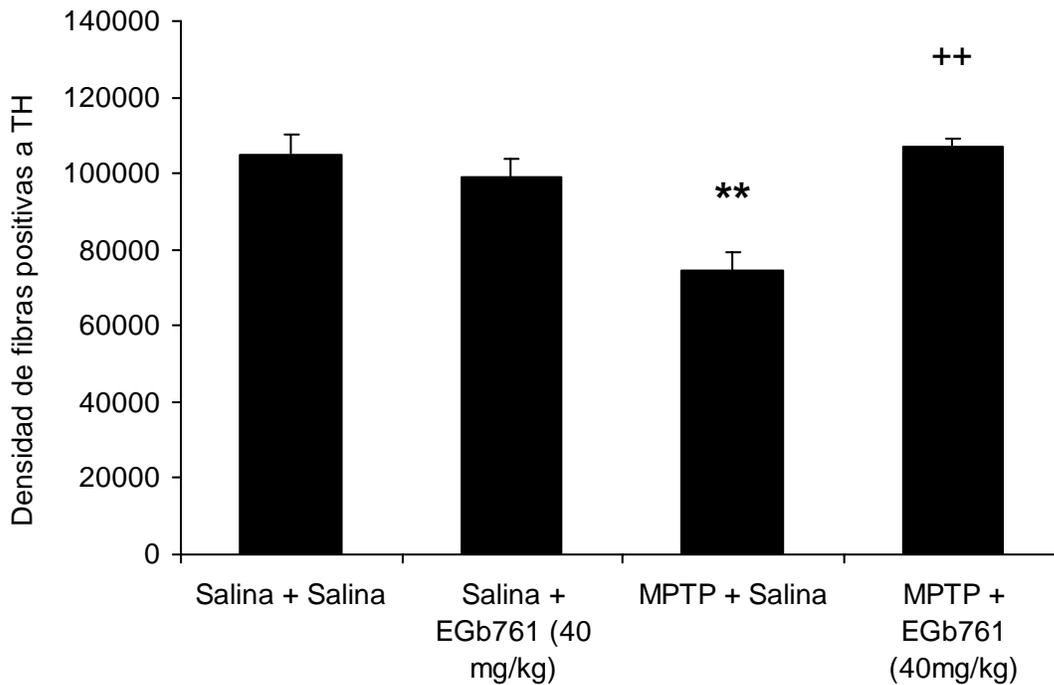


**Figura 11.** Inmunotinción de la tirosina hidroxilasa del cuerpo estriado en animales administrados intraperitonealmente con MPTP (30mg/kg) o salina durante 5 días, posteriormente EGb761 (40mg/kg) o salina durante 18 días. Las fibras nerviosas de las neuronas dopaminérgicas proyectadas en el cuerpo estriado fueron identificadas con la inmunoreacción de la tirosina hidroxilasa. Escala de la barra: 2  $\mu$ m. EGb761: Extracto de *Ginkgo biloba*; MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.



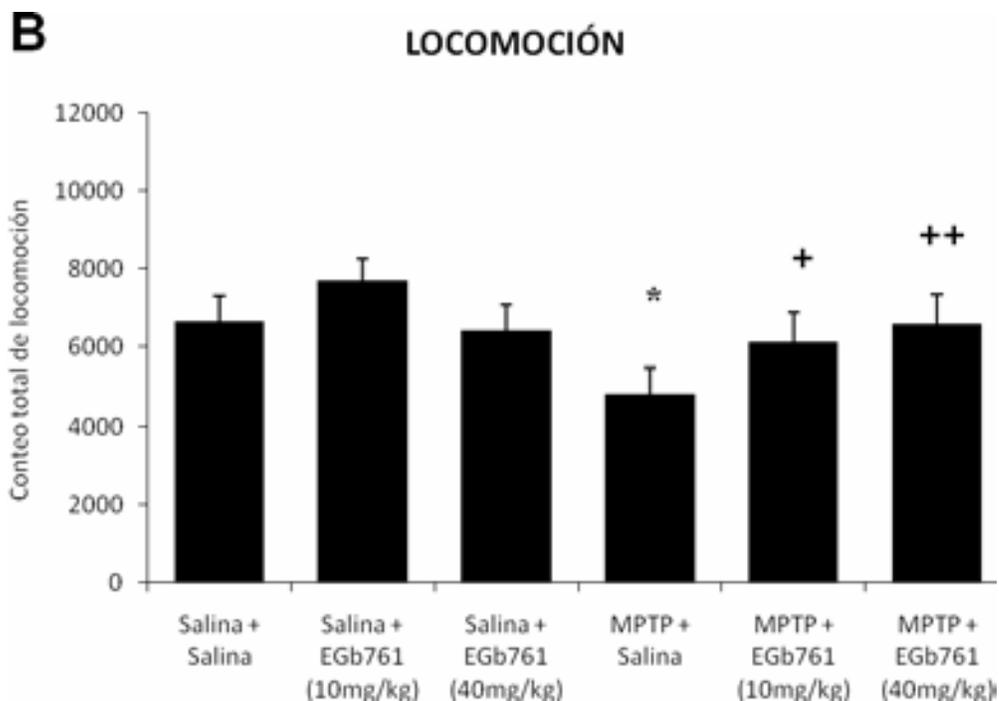
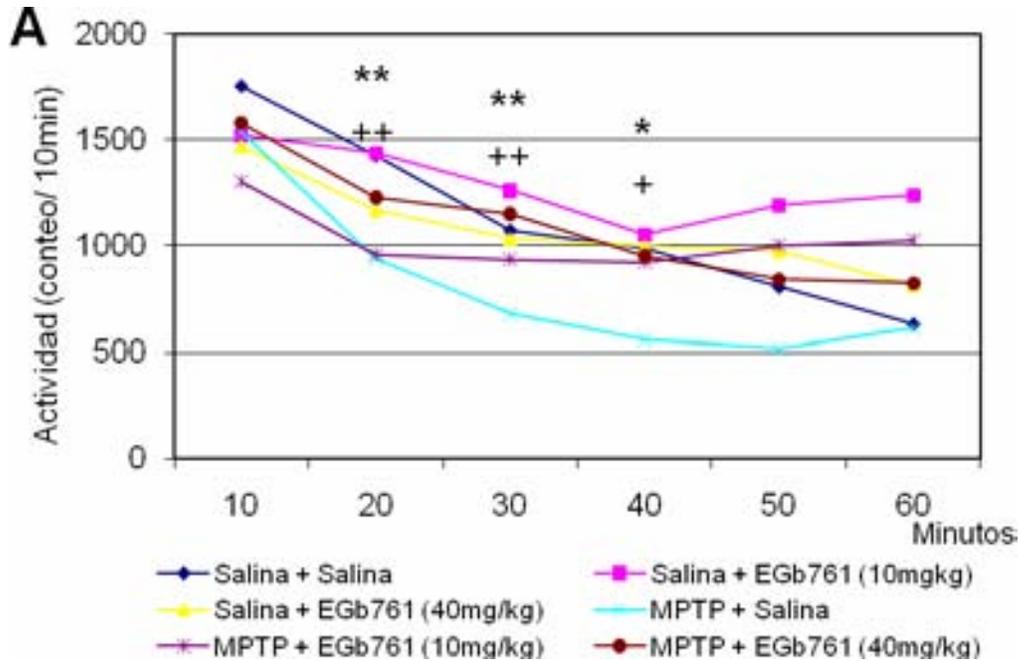
**Figura 12.** Cuantificación estereológica de las neuronas dopaminérgicas positivas a tirosina hidroxilasa en ratones administrados intraperitonealmente con MPTP (30mg/kg) o salina durante 5 días, posteriormente EGb761 (40 mg/kg) o salina durante 18 días. Los resultados expresados como media  $\pm$  EEM, n= 5 ratones por grupo. Diferencias analizadas usando una ANOVA de una vía seguida de un análisis de mínima diferencia significativa con Tukey. \*\* p<0.01 comparado con el grupo “salina + salina”, ++p<0.01 comparado con el grupo “MPTP + salina”. EGb761: Extracto de *Ginkgo biloba*; MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

El análisis de la actividad locomotora realizado cada 10 minutos (Fig. 14A), se observa la disminución en el grupo administrado con “MPTP + salina” comparado a los otros grupos a los 30 y 40 minutos de análisis. En el conteo total de la actividad locomotora, se muestra disminución significativa en el grupo de “MPTP + salina” (28%) cuando se comparan con los animales control (salina + salina) (Fig. 14B). Por el contrario, los ratones postratados con EGb761 (10 y 40 mg/kg) aumento la actividad locomotora en un 27% y 36% respectivamente, comparado con el grupo lesionado con “MPTP + salina”. Al comparar los grupos de EGb761 (10 y 40 mg/kg) con el grupo “salina + salina” la actividad locomotora se conservo igual.

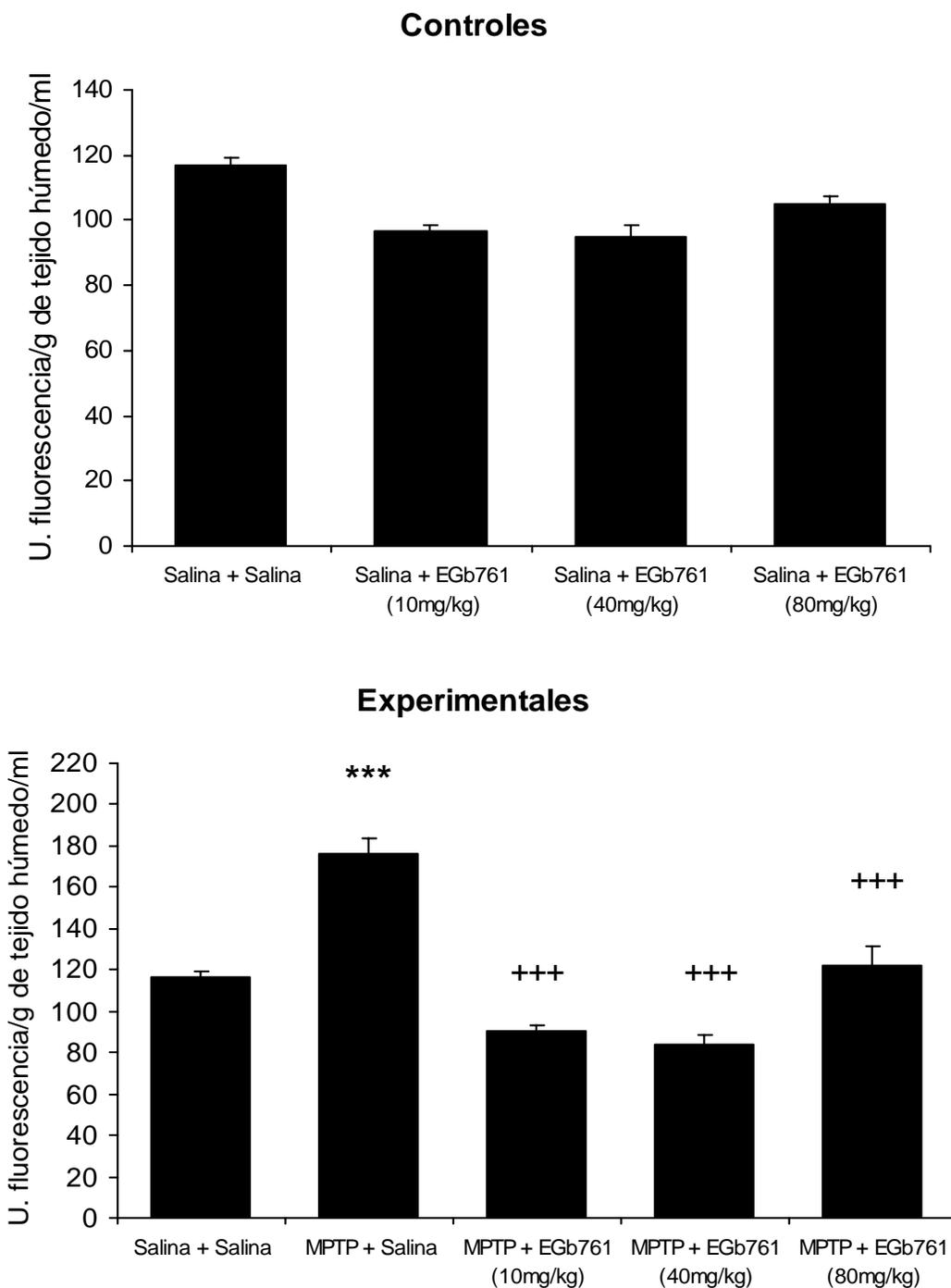


**Figura 13.** Densidad óptica de las fibras estriatales positivas a la tirosina hidroxilasa en ratones administrados intraperitonealmente con MPTP (30mg/kg) o salina durante 5 días, posteriormente EGb761 (40 mg/kg) o salina durante 18 días. Los resultados expresados como media  $\pm$  EEM, n= 5 ratones por grupo. Diferencias analizadas usando una ANOVA de una vía seguida de un análisis de mínima diferencia significativa con Tukey. \*\* p<0.01 comparado con el grupo “salina + salina”, ++p<0.01 comparado con el grupo “MPTP + salina”. EGb761: Extracto de *Ginkgo biloba*; MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

Utilizando el ensayo de PLF como un índice de estrés oxidativo, se observa disminución en la PL en el grupo de ratones administrados con EGb761. Al realizar la prueba estadística, esta disminución no fue significativa en las diferentes dosis probadas de EGb761 (10, 40 y 80 mg/kg) cuando se comparan con el grupo control (salina + salina) (figura 15A). En la figura 15B se muestra un incremento en la PL (51%) en el grupo de “MPTP + salina” comparado al grupo “salina + salina”. Los grupos de “MPTP + EGb761 (10mg/kg)” y “MPTP + EGb761 (40mg/kg)” inhiben la PL, observándose disminución significativamente en estos grupos del 22% y 28% con respecto al “salina + salina”. La dosis de 80 mg/kg de EGb761 reduce la PL 30% comparado al grupo de “MPTP + salina”. Los niveles de la PL se conservan igual entre los grupos “salina + salina” y “MPTP + EGb761 (80 mg/kg)”.



**Figura 14.** Análisis de la actividad locomotora en ratones administrados intraperitonealmente con MPTP (30 mg/kg) o salina durante 5 días seguido de la administración de EGb761 (10 ó 40 mg/kg) o salina por 18 días. Antes del sacrificio del animal se analizó la actividad locomotora. A) Mediciones cada 10 minutos por 1 hora. B) Conteo total de la actividad locomotora. Los resultados expresados como media  $\pm$  EEM,  $n=10$  ratones por grupo. Diferencias analizadas con la ANOVA de dos vías de medidas repetidas, como factores el tratamiento y dosis, seguida de un análisis de mínima diferencia significativa con Newman-Keul's. \* $p<0.05$  comparado al grupo "salina + salina", +  $p<0.05$  comparado al grupo "MPTP + salina", ++  $p<0.01$  comparado al grupo "MPTP + salina". EGb761: Extracto de *Ginkgo biloba*; MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.



**Figura 15.** Formación de productos fluorescentes lipídicos, como un índice de estrés oxidativo, en el cuerpo estriado de ratones administrados intraperitonealmente con MPTP (30 mg/kg) o salina durante 5 días seguido de la administración de EGb761 (10, 40 ó 80 mg/kg) o salina por 18 días. Los resultados expresados como media  $\pm$  EEM, n= 6-8 ratones por grupo. Diferencias analizadas usando una ANOVA de una vía seguida de un análisis de mínima diferencia significativa con Tukey. \*\*\*  $p < 0.001$  comparado con el grupo "salina + salina", +++ $p < 0.001$  comparado con el grupo "MPTP + salina". EGb761: Extracto de *Ginkgo biloba*; MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

## 7 DISCUSIÓN

El uso crónico de los fármacos utilizados en el tratamiento de la EP, genera severos efectos adversos, por lo que surge la necesidad de desarrollar estrategias, para mejorar la calidad de vida del paciente durante la progresión de la enfermedad.

Con base en numerosos estudios farmacológicos con animales y más recientemente con humanos, se ha propuesto que el EGb761 disminuye la neurodegeneración asociada con la edad (Christen, 2000; DeFeudis y Drieu, 2000). En el presente estudio se introdujo un fármaco no tóxico multifuncional, denominado EGb761, el cual ejerce una actividad neuroprotectora en el modelo experimental de la EP.

El cerebro genera continuamente varias EROs tales como, el anión superóxido, radical hidroxilo,  $H_2O_2$  y peroxinitrito, los cuales son tóxicos y capaces de destruir las neuronas. Para que la neurona se conserve ante este daño, existen enzimas antioxidantes, si surge una reducción en éstas enzimas y un aumento en la generación de los radicales libres, ocasiona que los mecanismos de defensa no sean capaces de mantener el equilibrio oxido-reducción. El daño al sistema antioxidante, como se muestra en el presente estudio, genera radicales libres. En particular en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, que se sabe, son vulnerables al estrés oxidativo, probablemente debido a su baja capacidad antioxidante, al incremento de la concentración de iones y la autooxidación de la DA y posiblemente por defectos en la actividad de la mitocondria (Greenamyre y cols., 1999).

El efecto protector del EGb761 sobre la toxicidad de la MPTP se evidencia al aumentar los niveles de DA en CE, esto puede deberse a la regulación de la TH, enzima responsable de la síntesis de las catecolaminas. Previamente nuestro grupo encontró (Rojas y cols., 2004), que el pretratamiento con EGb761 aumenta la actividad de la TH, así mismo como regula la actividad de la MAO (Rojas y cols., 2004).

En otros estudios, se ha reportado el efecto protector del *Ginkgo biloba*, como pretratamiento en la neurotoxicidad con la MPTP (Wu y Zhu., 1999; Su-Fen y cols., 2001), los datos obtenidos demuestran que el EGb761 protege a las neuronas dopaminérgicas de los efectos neurotóxicos de la MPTP *in vivo*. Los resultados de este

trabajo demuestran que el parkinsonismo experimental inducido por la MPTP y posteriormente la administración del EGb761 (“MPTP + EGb761”), recupera significativamente los niveles de DA estriatal, contrario a los ratones administrados con “MPTP + Salina”, y este efecto es dosis dependiente del EGb761.

Otro posible mecanismo de protección del EGb761, es la inhibición de la PL, como un índice de estrés oxidativo, observado en este estudio. Esto concuerda con los resultados previamente demostrados por nuestro grupo (Rojas y cols., 2001), en un esquema de pretratamiento con EGb761, encontramos bloqueo de la PL inducida por el MPP<sup>+</sup>. Varios estudios resaltan el potencial del EGb761 y sus constituyentes como antioxidante y capturador de radicales libres, tales como el radical nitrito, hidroxilo, superóxido y peróxido (Maccocci y Maguire, 1994; Maccocci y cols., 1994; Maitra y cols., 1995) y actúa eficientemente contra el estrés oxidativo (Maccocci y Maguire, 1994; Sastre y cols., 1998). El EGb761 también previene las modificaciones en la fluidez de la membrana (Ramassamy y cols., 1993), protegiendo de esta forma las membranas lipídicas de las neuronas dopaminérgicas ante el ataque de los radicales libres.

El efecto neuroprotector del EGb761, se debe a sus compuestos activos, entre estos los flavonoides; los cuales son ricos en fenoles, estos son compuestos no lipofílicos y pueden atravesar fácilmente la membrana plasmática. De esta forma pueden interactuar con transportadores de la membrana o receptores que participan en el mecanismo de señalización (Ramassamy, 2006). Existen múltiples estudios en los cuales se evidencia que los compuestos fenólicos tienen actividad antioxidante, esto se asocia al número de grupos hidroxilos (3 a 6) y su posición activa (Ramassamy, 2006).

En preparaciones sinaptosomales de CE de ratón, el EGb761 demostró que previene la alteración del sistema de recaptura de DA (Ramassamy y cols., 1992). Esta eficacia fue observada *in vivo* en neuronas dopaminérgicas que se protegieron con el EGb761, dos semanas antes de la administración periférica de la MPTP, a través de una minibomba osmótica durante 7 días (Ramassamy y cols., 1990).

Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con otros de monitoreo genómico, donde los efectos bioquímicos del EGb761 están enfocados en neuromodular proteínas que son significativamente sobretranscritas en genes relacionados al estrés oxidativo, tales como las enzimas hemoxygenasa-1, Mn-SOD y

la subunidad reguladora de  $\gamma$ -glutamyl-cisteina sintetasa (Gohil y Packer, 2002; Zhuang y cols., 2002).

A nivel conductual, el EGb761 tiene efectos benéficos sobre la memoria y cognición en muchos modelos experimentales (Cohen-Salmon y cols., 1997; Winter, 1998; Wirth y cols, 2000; Paganelli y cols., 2006), y esta asociado principalmente con la recuperación funcional en muchos modelos de lesión (Brailowsky y Montiel, 1997; Hoffman y Stein, 1997). Los animales tratados con MPTP mostraron daño motor significativo (Sedelis y cols., 2001), similar al observado en la EP idiopática. El EGb761 recuperó la actividad motora causado por la MPTP.

El mejoramiento de la función motora en los animales administrados con la MPTP y postratados con EGb761, puede ser debido a la reducción de la muerte neuronal y la preservación de los niveles de DA. Esto se evidencia al observar la recuperación en el número de neuronas dopaminérgicas y la actividad locomotora.

Se ha investigado que el EGb761 significativamente modula la excitabilidad y la plasticidad sináptica en ratones maduros (Williams y cols., 2006). Así como, cambios en la expresión de genes, por ejemplo, células expuestas al EGb761 incrementaron transcritos de las ciclinas, permitiendo de esta forma que la célula se mantenga en la fase G1 y se de la síntesis del ADN. Las células que estuvieron en fase G1 no mostraron necrosis celular o apoptosis (Gohil y Packer, 2002). Esto permite una generación o regeneración celular, tal como se encontró en tejido retinal, cuando se administro EGb761, este fue capaz de regenerar el axón cuando se realizo una axotomía retinal (Cheung y cols., 2002).

Utilizando un extracto de *Ginkgo biloba* se observo que éste tiene acción similar al de los factores tróficos, al generar proyecciones dendríticas y mayor número de cuerpos neuronales similares a otros factores neurotróficos (Jin y cols., 2006). Todos estos estudios evidencian que el EGb761 puede inducir la neurogénesis; lo anterior se corrobora con los resultados encontrados en este estudio al haber aumento en el número y proyecciones de las neuronas dopaminérgicas en el grupo de animales administrados con MPTP y posteriormente EGb761. Esto es apoyado por los estudios

realizados por Zhao y colaboradores, donde encontraron que en la SNpc se da la neurogénesis en la etapa adulta de los ratones (Zhao y cols., 2003)

La capacidad del EGb761 de modificar la expresión de genes que participan en el desarrollo, maduración y reparación neuronal permite una mejor viabilidad de la neurona. Esto se observa en los resultados obtenidos al encontrar aumento en el número de neuronas en SNpc y las prolongaciones axonales en el CE.

En estos resultados se evidencia primordialmente como el EGb761 participa como antioxidante ante la neurotoxicidad de la MPTP, sin embargo, el estrés oxidativo y su consecuente activación de la PL, dañan la integridad de las membranas de las neuronas dopaminérgicas y activan los mediadores del proceso inflamatorio. Las células gliales y fundamentalmente la microglia, son las responsables de llevar a cabo los procesos inflamatorios en el cerebro (Benveniste y cols., 2001). Éstas al activarse, son capaces de liberar al medio citocinas, quimiocinas o factores de crecimiento, que pueden ser benéficos o dañinos.

La presencia de estas citocinas en el cerebro de pacientes de la EP, nos sugiere que puede estar implicado el mecanismo de muerte neuronal dopaminérgica, debido a la activación del factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . En pacientes postmortem se encontró este factor aumentado significativamente (Nishimura y cols., 2001). Los radicales libres y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  durante la inflamación son capaces de activar el factor nuclear  $\kappa$ B, el cual se activa en las neuronas dopaminérgicas de los pacientes con la EP y el EGb761 es capaz de inhibir todo esta cascada de reacciones de muerte neuronal (Zhou y cols., 2006). Este es otra de las acciones por las cuales se encontró aumento en el número de neuronas en la SNpc en el grupo de animales administrados con MPTP postratados con el EGb761. Su efecto antiinflamatorio del EGb761 también es muy importante, a pesar de que en este trabajo no se midió, se puede pensar que ésta es otra vía de neuroprotección.

Es muy importante considerar, el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas para los pacientes de la EP, porque los efectos colaterales que se presentan después de una prolongada administración son severos. El uso extenso del EGb761 tiene una impresionante seguridad clínica. Además, el efecto neuroprotector no es limitado a la

neurotoxicidad inducida por la MPTP. Más importante aún, contrario a los fármacos de tradición para la EP, como la L-DOPA que puede proveer mejoramiento solamente sintomático por un periodo de tiempo limitado, el EGb761 es capaz de reducir el estrés oxidativo, tiene acción antiinflamatoria y de factor de crecimiento neuronal, demostrando que este fármaco puede ser efectivo en regular la neurodegeneración progresiva.

## 8 CONCLUSIONES

El EGb761 recupera significativamente los niveles de DA estriatal, contrario a los ratones administrados con “MPTP + salina” y este efecto es dosis dependiente del EGb761.

El EGb761 tiene acción neurorestauradora en la vía dopaminérgica nigroestriatal de ratones con la enfermedad de Parkinson, inducido por la MPTP.

La administración del EGb761 por si solo no causa efectos adversos en los parámetros analizados en este trabajo contrario a los fármacos tradicionales para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

## 9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Albin RL, Young AB, Penney JB. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. Trends Neurosci 12:366-375.

Arias-Carrión O. (2007) Enfermedad de Parkinson y neurogénesis. Archivos de Medicina. 3:1-18.

Arpa GJ, Vivancos MF. (2004) Tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Inf. Ter. Sist Nac Salud. 28:57-69.

Auguet M, Clostre F. (1983) Effects of an extract of *G. biloba* and diverse substances on the phasic and tonic components of the contraction of isolated rabbit aorta. Gen Pharmacol. 14:277-80.

Baba Y, Wharen RE Jr, Uitti RJ. (2005) Parkinson's disease: surgical treatment – stereotactic procedures. In Ebadi M and Pfeifferi RF. Parkinson's disease. CRC Press, New York. p.745-765.

Bahena-Trujillo R, Flores G, Arias-Montaña JA. (2000) Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. Rev Biomed; 11:39-60.

Baroggi N, Etienne A, Braquet P. (1986) Changes in cytosolic free calcium induced by platelet-activating factor in rabbit platelets: specific inhibition by BN 52021 and structurally related compounds. Agents Actions Suppl. 20:87-97.

Barth S, Inselman G, Engemann R, Heidemann HT. (1991) Influences of *G. biloba* on cyclosporin A induced lipid peroxidation in human liver cromosomes in comparison to vitamine E, glutathion and N-acetylcisteine. Biochem Pharmacol. 41:1521-1526.

Basaga HS. (1989) Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol.* 68:989-998.

Benveniste EN, Nguyen VT, O'Keefe GM. (2001) Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 39:381-391.

Berlett BS, Stadtman ER. (1997) Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J Biol Chem.* 272:20313-20316.

Bertoni J. (2005) The role of MAO-B inhibitors in the treatment of Parkinson's disease. In Ebadi M and Pfeifferi RF. *Parkinson's disease.* CRC Press, Florida. p.691-704.

Betarbet R, Sherer TB, Mackenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 3:1301-1306.

Biber A. (2003) Pharmacokinetics of *Ginkgo biloba* extracts. *Pharmacopsychiatry.* 36:S32-S37.

Bilia AR. (2002) *Ginkgo biloba* L. *Fitoterapia.* 73:276-279.

Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Anderson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O. (2002) Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:2344-2349.

Blows WT. (2000) Neurotransmitters of the brain: serotonin noradrenaline (norepinephrine), and dopamine. *J Neurosc Nurs.* 32:234-238.

Bonavida B, Mencia-Huerta JM. (1994) Platelet-activating factor and the cytokine network in inflammatory processes. *Clin Rev Allergy.* 12:381-395.

Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonisms. *Science*. 299:256-259.

Borchardt R, Huber J. (1975) COMT structure activity relationships for inhibitions by flavonoids. *J Med Chem*. 3:59-62.

Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig, La Salle LG. (1999) Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice, electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 3:717-729.

Brailowsky S, Montiel T. (1997) Motor function in young and aged hemiplegic rats: Effects of a *Ginkgo biloba* extract. *Neurobiol Aging*. 18:219-227.

Braquet P, Braquet M, Deby C. (1983) Oxidative damages induced by cerebral ischemia: Protective role of some radical scavenger related drugs. *J Cereb Blood Flow Metab. Suppl*:1564-1565.

Braquet P, Paubert-Braquet M, Koltai M, Bourgan R, Bussdino F, Hosford D. (1989) ¿Is there a case for PAF antagonists in the treatment of ischemic disease?. *Trends Pharmacol. Sci*. 10:23-30.

Braquet P, Esanu A, Buisine E, Hosford D, Broquet C, Koltai M. (1991) Recent progress in ginkgolide research. *Med Res Rev*. 11:295-355.

Bruel A, Gardette J, Berrou E, Droy-Lefaix MT, Picard J. (1989) Effects of *G. biloba* extract on glucose transport and glycogen synthesis of cultured smooth muscle cells from pig aorta. *Pharmacol Res*. 21:421-9.

Brunello N, Racagni G, Clostre F, Drieu K, Braquet P. (1985) Effects of and *G. biloba* extract on noradrenergic systems of rat cerebral cortex. *Pharmacol Res Comm.* 17:1063-72.

Buechter DD. (1988) Free radicals and oxygen toxicity. *Pharm Res.* 5:253-260.

Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ. (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.

Carretero ME. (2000) Compuestos fenólicos: Flavonoides. *Panorama Actual Med.* 24:525-528.

Chan P, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Di Monte D. (1991) Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J Neurochem* 57:348-351.

Cheung ZH, So KF, Lu Q, Yip HK, Wu W, Shan JJ, Pang PKT, Chen CF. (2002) Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal ganglion cells by a mixture of herbal extracts. *Journal of Neurotrauma.* 19:369-378.

Chusid JG. (1977) El Sistema Nervioso Central. En *Neuroanatomía correlativa y neurología funcional.* El Manual Moderno. México. p.509

Christen Y. (2000) The effect of *Ginkgo biloba* extract (EGb761) on neurodegenerative processes. *Adv Ginkgo biloba Extr Res.* 8:1-12.

Ciechanover A, Schwartz AL. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:2727-2730.

Cleeter MW, Cooper JM, Schapira AH. (1992) Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *J Neurochem.* 58:786-789.

Cohen G, Werner P. (1994) Free radicals, oxidative stress, and neurodegeneration. In *Neurodegenerative Disease*. D, B. Calne, ed. Philadelphia: W. B. Saunders. p.139-161.

Cohen-Salmon C, Venault P, Martin B, Raffalli-Sébille MJ, Barkats M, Clostre F, Pardo MC, Christen Y, Chapouthier G. (1997) Effects of *Ginkgo biloba* extract EGb761 on learning and memory. *J. Physiol. Paris.* 91:291-300.

Cohen G. (2000) Oxidative stress, mitochondrial respiration, and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 899:112-120.

Côte L, Crutcher MD. (1991) The Basal Ganglia. En Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of neuronal science*. Elsevier Science, New York. p.647-659.

Dauer W, Przedborski S. (2003) Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron.* 39:889-909.

Day BJ, Patel M, Calavetta L, Chang LY, Stamler JS. (1999) A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:12760-12765.

DeFeudis F. (1991) *Ginkgo biloba* extract: pharmacological activities and clinical applications. Paris. Elsevier. p.1187.

DeFeudis FV. (1998) *Ginkgo biloba* Extract (EGb761): from Chemistry to the Clinic. Wiesbaden: Ullstein Medical. p.401

DeFaudis FV, Drieu K. (2000) *Ginkgo biloba* extract (EGb761) and CNS functions: basic studies and clinical applications. *Curr Drug Targets.* 1:25-28.

DeFeudis FV. (2003) A brief history of EGb761 and its therapeutic uses. *Pharmacopsychiatry*. 36:S2-S7.

Diamond BJ, Shiflett SC, Feiwel N, Matheis RJ, Noskin O, Richards JA, Schoenberger NE. (2000) *Ginkgo biloba* extract: mechanisms and clinical indications. *Arch Phys Med Rehabil*. 81:668-678.

Du ZY, Li XY. (1998) Effects of ginkgolides on interleukin-1, tumour necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide production by rat microglia stimulated with lipopolysaccharides in vitro. *Arzneim Forsch Drugs Res*. 48:1126-1130.

Ebadi M, Iversen P L, Haoz R, Certis DR, Rojas P, Happe HK, Murrin LC, Pfeifferi RF. (1995) Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem Int*. 27:1-22.

Ebadi M, Sharma SK, Wanpen S, Shavali S. (2005) Metallothionein isoforms attenuate peroxynitrite-induced oxidative stress in Parkinson's disease. In Ebadi M and Pfeifferi RF. *Parkinson's disease*. CRC Press, New York. p.479-499.

Eckert A, Keil U, Kressmann S, Schindowski K, Leutner S, Leutz S, Müller WE. (2003) Effects of EGb761 *Ginkgo biloba* extract on mitochondrial function and oxidative stress. *Pharmacopsychiatry*. 36:S15-S23.

Ernst E. (1998). Hermlless herbs?. A review of the recent literatúra. *Am J Med*. 104:170-178.

Escobar A. (2003) Fisiopatología y neuropatología de la enfermedad de Parkinson. *Rev Mex Neuroci*. 4:295-303.

Fall PA, Fredrikson M, Axelson O, Granérus AK. (1999) Nutritional and occupational factors influencing the risk of Parkinson's disease: a case-control study in southeastern Sweden. *Mov Disord*. 14:28-37.

Farrer M, Gwinn-Hardy K, Muentner M, DeVrieze FW, Crook R, Perez-Tur J, Lincoln S, Maraganore D, Adler C, Newman S, MacElwee K, McCarthy P, Miller C, Waters C, Hardy J. (1999) A chromosome 4p haplotype segregating with Parkinson's disease and postural tremor. *Hum Mol Genet.* 8:81-5.

Findley LJ, Gresty MA, Halmagyi GM. (1981) Tremor, the cogwheel phenomenon and clonus in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 44:534-546.

Flip M, Cunningham K. (2003) Hyperlocomotive and discriminative stimulus effects of cocaine are under the control of serotonin<sub>2c</sub> (5HT<sub>2c</sub>) receptors in rat prefrontal cortex. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 306:734-743.

Freeman BA, Crapo JD. (1982) Free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 47:412-415.

Fridovich I. (1975) Superoxido dismutase. *Ann Rev Biochem.* 44:147-159.

Galluzzi S, Zanetti O, Binetti G, Trabucchi M, Frisoni GB. (2000) Coma in a patient with Alzheimer's disease taking low dose trazodone and *Ginkgo biloba*. *Neurosurg Psychiatry.* 68:679-680.

Gasser T, Müller-Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznai B, Fabrizio E, Vieregge P, Horstmann RD. (1998) A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet.* 18:262-5.

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

Gohil K. (2002) Genomic responses to herbal extracts: lessons from *in vitro* and *in vivo* studies with an extract of *Ginkgo biloba*. *Biochemical Pharmacology.* 64:913-917.

Gohil K, Packer L. (2002) Global gene expression analysis identifies cell and tissue specifications of *Ginkgo biloba* extract, EGb761. *Cell Mol Biol.* 48:625-631.

Goudreau JL. (2005) Symtomatic treatment of Parkinson's disease: Levodopa. En Ebadi M. y Pfeiffer RF. *Parkinson's disease.* CRC Press, New York. p.713-728.

Greenamyre JT, O'Brien CF. (1991) N-methyl-D-aspartate antagonists in the treatment of Parkinson's disease. *Arch Neurol.* 48:977-981.

Greenamyre JT, Mackenzie GM, Peng TI, Stephans SE. (1999) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Symp.* 66:85-97.

Greenamyre JT, Sherer TB, Betarbet R, Panov AV. (2001) Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life* 52:135-141.

Gundersen HJG. (1986) Stereology of arbitrary particles. A Review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R Thompson. *J Microsc.* 143:3-45.

Happe S. (2005) Sleep disorders in Parkinson's disease. In Ebadi M, Pfeiffer FR. *Parkinson's disease.* CRC. Press. New York. p.217-227.

Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, Evan GI, Agid Y, Hirsch EC. (2000) Caspase-3: a vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci.* 97:2875-2880.

Hartmann A, Troadec JD, Hunot S, Kikly K, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Agid Y, Hirsch EC. (2001) Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. *J Neurosci.* 21:2247-2255.

Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC. (1984) Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Science*. 224:1454-1453.

Hellegouarch A, Baranés J, Clostre F, Drieu K, Braquet P, DeFeudis FV. (1985) Comparison of the contractile effects on an extract of *G. biloba* and some neurotransmitters on rabbit isolated vena cava. *Gen Pharmacol*. 16:129-32.

Hoffman SW, Stein DG. (1997) Extract of *Ginkgo biloba* (EGb761) improves behavioral performance and reduces histopathology after cortical contusion in the rat. *Restor Neurol Neurosci*. 11:1-12.

Homykiewicz O, Kish S. (1986) Biochemical Pathophysiology of Parkinson's Disease, In: *Advances in Neurology*. 45:19-34.

Hung SW, Lang AE. (2005) Differential diagnosis of Parkinson's disease. In Ebadi M and Pfeiffer RF. *Parkinson's disease*. CRC Press, Florida. p.557-568.

Huguet F, Tarrade T. (1992) alfa-adrenoceptor changes during cerebral aging. *J Pharmacol Pharm*. 44:24-27.

Irwin I, DeLanney LE, Langston JW. (1993) MPTP and aging: Studies in the C57BL/6 mouse. *Adv Neurol*. 60:197-206.

Janssens D, Michiels C, Delaive E, Eliaers F, Drieu K, Remacle J. (1995). Protection of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells by *G. biloba* extract and bilobalide. *Biochem Pharmacol*. 50:991-9.

Jabbari B, Pazdan R. (2005) Treatment of Parkinson's disease with anticholinergic medications. In Ebadi M, Pfeiffer FR. *Parkinson's disease*. CRC. Press. New York p.677-684.

Javoy F, Sotelo C, Herbert A, Agid Y. (1976) Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-Hydroxydopamine in the nigrostriatal system. *Brain Res.* 102:210-215.

Jenner P, Olanow CW. (1998a) Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 44(suppl 1):S72-S84.

Jenner P. (1998b). Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 13:24

Jha N, Jurma O, Lalli G, Liu Y, Pettus EH, Greenamyre JT, Liu RM, Forman HJJ, Andersen JK. (2000) Glutathione depletion in PC12 results in selective inhibition of mitochondrial complex I activity. Implications for Parkinson's disease. *J Biol Chem.* 275:26096-26101.

Jin GH, Huang Z, Tan XF, Tian ML, Zhang XH, Qin JB, Xu HJ, Yew DT, Mak YT. (2006) Effects of ginkgolide on the development of NOS and AChE positive neurons in the embryonic basal forebrain. *Cell Biology International* 30:500-5004.

Jonsson G. (1980) Chemical neurotoxins as denervation tools in neurobiology. *Annu Rev Neurosci.* 3:169-187.

Jonsson G. (1983) Chemical lesioning techniques: monoamine neurotoxins. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, A. Bjorklund and T. Hokfelt, eds. Amsterdam: elsevier Science Publisher B.V. p.463-507.

Kanazawa I (1986) Clinical pathophysiology of basal ganglia disease. In Vinken PT., Bruyn GW, Klawans HI. *HANDBOOK OF Clinical Neurology*. Elsevier Science Publisher, New York. 49:65-92

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 392:605-608.

Kleijnen J, Knipschild P. (1992) *Ginkgo biloba*. *Lancet*. 340:1136-1139.

Klockgether T. (2004) Parkinson's disease: clinical aspects. *Cell Tissue Res*. 318:115-120.

Kobuchi H, Droy-Lefaix MT, Christen Y, Packer L. (1997) EGb: inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line Raw 264-7. *Biochem Pharmacol*. 53:897-903.

Kopin IJ. (1987) Toxins and Parkinson's disease: MPTP parkinsonism in humans and animal. *Adv Neurol*. 45:137-144.

Kopin IJ. (1988) MPTP effects on dopamine neurons. *Ann New York Sci*. 537:451-461.

Korrel M, Tanner CM. (2005) Epidemiology of Parkinson's disease: An overview: In Ebadi M and Pfeifferi RF. *Parkinson's disease*. CRC Press, Florida. p.39-50.

Kruger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O. et al (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*. 18:106-108.

Kumari M, Hiramtsu M, Ebadi M. (2000) Free radical scavenging actions of hippocampal metallothionein isoforms and of antimetallothionein: an electron spin resonance spectroscopic study. *Cell Mol Biol*. 46:627-636.

Kuniyoshi S, Jankovic J. (2005) Dopamine agonists in Parkinson's disease. In Ebadi M and Pfeifferi RF. *Parkinson's disease*. CRC Press, Florida. p.729-744.

Laitinen LV, Bergenheim AT, Hariz MI. (1992) Leksell's posteroventral pallidotomy in the treatment of Parkinson's disease. *J Neurosurg.* 76:53-61.

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

Langston JW, Forno LS, Rebert CS, 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 JW, Irwin I, Ricaurte GA. (1987) Neurotoxins, Parkinsonism and Parkinson's disease. *Pharmacol Ther.* 32:19-49.

Liou HH, Tsai MC, Cheh CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, Chen RC. (1997) Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology.* 48:1583-1588.

Luthman J, Fredriksson A, Sundstrom E, Jonsson G, Archer T. (1989) Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron system in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res.* 33:267-277.

Lyons KE, Pahwa R. (2005) Amantadine. In Ebadi M and Pfeifferi RF. *Parkinson's disease.* CRC Press, Florida. p.685-690.

Maclennan KM, Darligton CL, Smith PF. (2002) The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and ginkgolide B. *Progress in Neurobiology.* 67:235-257.

Maitra I, Marcocci L, Droy-Lefaix MT, Packer L. (1995) Peroxyl radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* extract EGb761. *Biochem Pharmacol.* 49:1649-1655.

Manning-Bog AB, McCormark AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA. (2002) The herbicide paraquat causes upregulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 277:1641-1644.

Marco-Igual M. (1995) El sistema glutamatérgico (II): aspectos fisiopatológicos, clínicos y terapéuticos. *Med Clin (Barc).* 105:306-316.

Marcocci L., Maguire J. (1994) The nitric oxide scavenging properties of *G. biloba* extract. *Biochem Biophys Res Comm.* 201:748-55.

Marcocci L, Packer L, Droy-Lefaix MT, Sekaki A, Gardes-Albert M. (1994) Antioxidant action of *G. biloba* extract EGb761. *Meth Enzymol.* 234:462-475.

Marklund SL. (1984) Properties of extracellular superoxido dismutase from human lung. *J Biochem.* 220:269-272.

Marsden CD. (1992) Dopamine and basal ganglia disorders in humans. *Seminars Neurosci.* 4:171-178.

Martin W R, Ye FQ, Allen PS. (1998) Increasing striatal iron content associated whit normal aging. *Mov Disord.* 13:281-286.

McCormark AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechate DA, Di Monte DA. (2002) Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol.* 10:119-127.

Merad-Boudia M, Nicole A, Santiard-Baron D, Saille C, Ceballos-Picot I. (1998) Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevance to Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol.* 56:645-655.

Nakazawa H, Genka C and Fujishima M. (1996) Pathological aspects of active oxygens/free radicals. Japanese Journal of Physiology. 46:15-32.

Nishimura M, Mizuta I, Mizuta E, Yamasaki S, Ohta M, Kaji R. (2001) Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with sporadic Parkinson's disease. Neurosci Lett. 311:1-4.

Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Arbizu J, Jiménez-Amaya JM. (2002) The basal ganglia and disorders of movement: Pathophysiological mechanisms. News Physiol Sci; 17:51-55.

Ohye C, Narabayashi H. (1979) Physiology study of presumed ventralis intermedius neurons in the human thalamus. J Neurosurg. 50:290-297.

Olanow CW, Tatton WG. (1999) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. Ann Rev Neurosci 22:123-144.

Olanow CW, Tatton WG. (1999) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. Ann Rev Neurosci. 22:123-144.

Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. (2002) An inflammatory review of Parkinson's Disease. Neurobiology. 68:325-340.

Ovadia A, Zhang Z, Gash DM. (1995) Increased susceptibility to MPTP toxicity in middle-aged rhesus monkeys. Neurobiol Aging. 60:931-937.

Paganelli RA, Benetoli A, Milani H. (2006) Sustained neuroprotection and facilitation of behavioral recovery by the *Ginkgo biloba* extract, EGb761, after transient forebrain ischemia in rats. Behav Brain Res. 174:70-77.

Pahwa R, Wilkinson S, Smith D, Lyons K, Miyawaki E, Koller WC. (1997) High-frequency stimulation of the globus pallidus for the treatment of Parkinson's disease. *Neurology*. 49:249-253.

Parker WD., Jr. Boyson SJ and Parks JK. (1989) Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 26:719-723.

Polymeoropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. (1997) Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 276:2045-2047.

Pollack M and Leeuwenburgh C. (1999) Molecular mechanisms of oxidative stress in aging: free radicals, aging, antioxidants and disease. In Packer SL and Hänninen O. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Elsevier Science. p.881-923.

Ramassamy C, Clostre F, Christen Y, Costentin J. (1990) Prevention by a *Ginkgo biloba* extract (EGb761) of the dopaminergic neurotoxicity of MPTP. *J Pharm Pharmacol*. 42:785-789.

Ramassamy C, Naudin B, Christen Y, Clostre F, Costentin J. (1992) EGb761 increase synaptosomal uptake of 5-HT. *J Pharm Pharmacol*. 44:943-945.

Ramassamy C, Girbe F, Christen Y, Costentin J. (1993) *Ginkgo biloba* extract EGb761 or trolox C prevent the ascorbic acid/Fe<sup>2+</sup> induced decrease in synaptosomal membrane fluidity. *Free Radic Res Commun*. 19:341-350.

Ramassamy C. (2006) Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol*. 545:51-64.

Reilly PM, Bulkley GB. (1990) Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *Br J Surg.* 77:1324-1325.

Reuse-Blom S, Driew K. (1988) Effects of *G. biloba* extract on arteriolar spasm in rabbits. Springer-Verlag, berlin. p.162-8.

Ríos de Molina M del C. (2003). El estrés oxidativo y el destino celular. *Química Viva.* 2. quimicaviva@gb.fcen.uba.ar

Robak J, Gryglewski R. (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide-anions. *Biochem Pharm.* 37:837-841.

Roche E, Romero-Alvira D. (1997) Introducción a la bioquímica y citotoxicidad del desequilibrio oxidativo. II) Alteraciones oxidativas en las macromoléculas biológicas. En: Romero-Alvira D, Roche E. *Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología.* ENE Ediciones p. 91-104.

Rodríguez Perón JM, Menéndez López JR, Trujillo López Y. (2001) Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit.* 30:36-44.

Rojas P, Rios C. (1993) Increased striatal lipid peroxidation after intracerebroventricular MPP<sup>+</sup> administration to mice. *Pharmacol Toxicol.* 72:364-8.

Rojas P, Garduño B, Rojas C, Viguera RM, Rojas-Castañeda J, Ríos C, Serrano-García N. (2001) EGb761 blocks MPP<sup>+</sup> induced lipid peroxidation in mouse corpus striatum. *Neurochem Res.* 26:1245-1251.

Rojas P, Rojas C, Ebadi M, Montes S, Monroy-Noyola A, Serrano-García N. (2004) EGb761 pretreatment reduces monoamine oxidase activity in mouse corpus striatum during 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity. *Neurochem Res.* 29:1417-1423.

Rose S, Nomoto M, Jackson EA, Gibb WRG, Jaehnig P, Jenner P, Marsden CD. (1993) Age-related effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment of common marmosets. *Eur J Pharmacol.* 230:177-185.

Rosenblatt M, Mindel J. (1997) Spontaneous hyphema associated with ingestion *Ginkgo biloba* extract (letter). *N Engl J Med.* 336:1108.

San Miguel A, Campo F, Aguado P, Calvo B, Alonso N, Mazón MA. (2006) Niveles de marcadores de estrés oxidativo: determinación de peróxidos (oxystat) y de antioxidación de LDL (olab) en pacientes con síndrome de apnea del sueño (sahs). *Revista electrónica Diagnóstico in vitro.* 4:66

Sastre J, Millán A, Asunción JG, Plá R, Juan G, Pallardo FV, O'Connor E, Martín JA, Droy-Lefaix MT Viña J. (1998) A *Ginkgo biloba* extract (EGb761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 24:298-304.

Schapira AH, Copper JM., Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 54:823-827.

Schulz JB, Falkenburger BH. (2004) Neuronal pathology in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res.* 318:135-147.

Sedelis M, Schwarting RKW, Huston JP. (2001) Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 125:109-125.

Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, Suno M, Ogawa K, Hayase N, Kimura K, Shiono H. (2001) Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res.* 906:135-142.

Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD. (1994) Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol.* 36:348-355.

Stark AK, Pakkenberg B. (2004) Histological changes of the dopaminergic nigrostriatal system in aging. *Cell Tissue Res.* 318:81-92.

Su-fen Y, Zhen-Qin Y, Qin W, An-Sheng S, Xie-Nan H, Jing-Shan S. (2001) Protective effect and mechanism of *Ginkgo biloba* leaf extract for Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Acta Pharmacol Sin.* 22:1089-1093.

Sayre LM. (1989) Biochemical mechanism of action of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicology letters.* 48:121-149.

Talpade DJ, Greene JG, Higgins DS, Greenemyre JT. (2000) In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using  $\{^3\text{H}\}$ dihydrorotenone. *J Neurochem.* 75:2611-2621.

Tanner CM, Goldman SM. (1996) Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin* 14:317-335.

Triggs WJ, Willmore LJ. (1984) In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe<sup>2+</sup> injection. *J Neurochem.* 42:976-80.

Ungerstedt U. (1968) 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 5:107-110.

Ungerstedt U. (1971) Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand.* 82(Suppl.367):95-122.

Utter AA, Basso MA. (2008) The basal ganglia: An overview of circuits and function. *Neurosci Biobehav Rev* 32:333-342.

Valente EM, Brancati F, Ferraris A, Graham EA, Davis MB, Breteler MM, Gasser T, Bonifati V, Bentivoglio AR, De Michele G, Dürr A, Cortelli P, Wassilowsky D, Harhangi BS, Rawal N, Caputo V, Filla A, Meo G, Oostra BA, Brice A, Albanese A, Dallapiccola B, Wood NW; European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. (2002) Park 6-linked parkinsonism occurs in several european families. *Ann Neurol*. 51:14-18.

Velazquez Paniagua M, Prieto Gómez B, Contreras Pérez R. (2004) El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias* 75:36-43.

Wahba M, Zesiewicz TA, Hauser RA. (2005) Catechol-O-methyltransferase inhibitors in the treatment of Parkinson's disease. In Ebadi M and Pfeifferi RF. *Parkinson's disease*. CRC Press, New York. p.705-712.

Waters CH. (2002) Diagnosis and management of Parkinson's disease. *Professional Communications.Inc. USA*. p.240.

West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anatomical Record*. 231:482-97.

White H. (1996) Extracts of *G. biloba* leaves inhibit MAO. *Life Sci*. 58:1315-1321.

Widdowson PS, Farnworth MJ, Simpson MG, Look EA. (1996a) Influence of age on the passage of paraquat through the blood-brain barrier in rats a distribution and pathological examination. *Hum Exp Toxicol*. 15:231-236.

Widdowson PS, Farnworth MJ, Upton R, Simpson MG. (1996b) No changes in behaviour, nigro-striatal system neurochemistry or neuronal cell death following toxic multiple oral paraquat administration to rats. *Hum Exp Toxicol.* 15:583-591.

Williams B, Watanabe CMH, Schultz PG, Rimbachd G, Krucker T. (2004) Age-related effects of *Ginkgo biloba* extract on synaptic plasticity and excitability. *Neurobiology of Aging.* 25:955–962

Winter JC. (1998) The effects of an extract of *Ginkgo biloba* EGb761, on cognitive behavior and longevity in the rat. *Physiol Behav.* 63:425-433.

Wirth S, Stemmelin J, Will B, Christen Y, DiScala G. (2000) Facilitative effects of EGb761 on alfactory recognition in young and aged rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 65:321-326.

Wu W, Zhu X. (1999) Involvement of monoamine oxidase inhibition in neuroprotective and neurorestorative effects of *Ginkgo biloba* extract against MPTP-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity in C57 mice. *Life Sci.* 65:157-164.

Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S. (2002) Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 22:1763-1771.

Zentella de Piña M, Corona García S, Saldaña Balmori Y. (1994) Toxicidad de los radicales libres en la peroxidación de lípidos. *Boletín de Educación Bioquímica, México, (D.F.): Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.* 13:87-93.

Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlén M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisén J, Janson AM. (2003) Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *PNAS.* 100:7925-7930.

Zhuang H, Pin S, Christen Y, Doré S. (2002) Induction of heme oxygenase 1 by *Ginkgo biloba* in neuronal cultures and potential implications in ischemia. *Cell Mol Biol.* 48:647-653.

Zhou YH, Yu JP, Liu YF, Teng XJ, Ming M, LV P, An P, Liu SQ, Yu HG. (2006) Effects of *Ginkgo biloba* extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ Bp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. *Mediators of Inflammation.* 92642:1-9.