



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL EGB 761 EN LA REGULACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON
LA FUNCIÓN DOPAMINÉRGICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE LA
ENFERMEDAD DE PARKINSON (EP)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Karina Helivier Solís González



MÉXICO, D.F.

AÑO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Atonatiu Edmundo Gómez Martínez**

VOCAL: **Profesor: José Fausto Rivero Cruz**

SECRETARIO: **Profesor: Patricia Rojas Castañeda**

1er. SUPLENTE: **Profesor: María Benita Leonor Fernández Salgado**

2º SUPLENTE: **Profesor: María Eva González Trujano**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE NEUROTOXICOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y
NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. PATRICIA ROJAS CASTAÑEDA

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B ELIZABETH RUIZ SÁNCHEZ

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): **KARINA HELIVIER SOLÍS GONZÁLEZ**

(nombre (s) y firma (s))

Agradecimientos

Agradezco al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez” por haberme dado la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis en el laboratorio de la Dra. Patricia Rojas Castañeda.

En primer lugar, quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a mi tutora la Dra. Patricia Rojas Castañeda, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por el constante apoyo entregado durante la realización de esta tesis, además, por sus oportunos, invaluable y sabios consejos que muchas veces fueron claves para ayudarme con mis problemas intelectuales, de ánimo y personales.

Quisiera agradecer también a la QFB Elizabeth Sánchez Ruiz por su paciencia y apoyo en diversas técnicas del laboratorio, así como compartir conmigo sus conocimientos. Gracias Eli, porque me has transmitido constancia, ilusión por la ciencia, nuevos conocimientos y sobre todo formación investigadora en una etapa muy importante de mi vida. Eli a lo largo de este tiempo me has alentado, animado para concluir esta tesis y has compartido conmigo momentos inolvidables, los cuales siempre estarán en mi mente, todos mis logros presentes y futuros son también tuyos Eli. Disculpa por todos los dolores de cabeza que en algún momento te ocasione, de los cuales siempre trate de mejorar, aunque algunas veces no lo conseguía siempre trate de ser perseverante y eso me ayudo a madurar en algunos aspectos, gracias por todo.

No menos agradecimiento merecen mis numerosos compañeros de laboratorio por la paciencia y la disposición para responder innumerables consultas, en especial a la M en C Norma Serrano, Dr. Pedro, y en algún momento también Orlando de la Rosa, a todos ustedes un agradecimiento especial por el gran apoyo entregado. Cada uno de ellos, a su manera, ha influido no solo laboralmente, si no como auténticos amigos apoyándome en momentos difíciles y prestando su ayuda desinteresadamente.

Así mismo durante este tiempo tuve la suerte de conocer a Daniel Magos, que aunque su paso en el laboratorio fue breve, tuvo tiempo de ser mi equipo, mi

amigo y porque no parte de mi familia en este proceso experimental, a él le agradezco su comprensión, afecto y apoyo en todo momento, así como también el hacerme feliz durante todo este tiempo.

Agradezco también el invaluable apoyo de la Dra. Perla Castañeda, quien estuvo conmigo en momentos muy difíciles en lo personal y en lo académico a lo largo de la carrera, apoyándome en todo momento, le agradezco la valentía por ese apoyo en situaciones en donde parecía que no había salida gracias Dra. Perla por todo lo que hizo por mí, disculpe las molestias, los problemas y los dolores de cabeza que en su momento le ocasiona.

Para concluir, doy gracias a mi familia, especialmente a mi padre, mis hermanos y a mi madre es a ellos a quien les debo todo en esta vida, absolutamente todo. Ellos me inculcaron todos sus valores, me proporcionaron disciplina, educación así como todo lo que estaba a su alcance y más. Gracias por haber soportado mis malos momentos, mis travesuras y mi indisciplina, la cual siempre trate de evitar y cumplir con las reglas. Gracias muchas gracias por todo y disculpen por ser como soy. Siempre recordare la frase que me repetían:

" الله لم يفرض الالتزام جاهل للتعلم ، ودون أخذ اليمين أنهم يعرفون لتعليم " .
هو الذي لا يعرف ويعرف انه لا يعرف هو مجنون ، والبقاء بعيدا
هو الذي لا يعرف ويعرف انه لا يعرف هو جاهل ؛ يعلمهم
هو الذي يعرف ويعرف انه لا يعرف ، هو نائم ، إيقاظه
هو الذي يعلم ويعلم انه يعلم ولكن لا يتباهى انه يعرف ، هو الحكيم حقا ، تبعه
حتى ونحن نعيش في جهل كل أعداء آخرين

Dios no impone la obligación de aprender es ignorante, y sin tomar el juramento que saben enseñar."
Es el que no sabe y sabe que no sabe es una locura, y se mantenga alejado
Es el que sabe y no sabe que él no sabe lo que es ignorante; enseñarles
Es el que sabe y no sabe que sabe, está dormido, lo despierte
Es el que sabe y sabe que sabe, pero no se jactan de que él sabe, es sabio, de hecho, seguido de
A pesar de que vivimos en la ignorancia de cada uno de otros enemigos

ÍNDICE

Índice.....	1
Abreviaturas.....	4
Resumen.....	6
1. Introducción.....	8
1.1 Hipótesis.....	9
1.2 Objetivos.....	9
2. Marco teórico.....	10
2.1 Sistema dopaminérgico.....	10
2.1.1 Dopamina.....	10
2.1.2 Vías dopaminérgicas.....	13
2.2 Genes relacionados con el sistema dopaminérgico.....	16
2.2.1. <i>TH</i>	16
2.2.2 <i>Pitx3</i>	17
2.2.3 <i>Vmat 2</i>	18
2.2.4 <i>En1</i>	18
2.2.5 <i>D2R</i>	19
2.2.6 <i>Nurr1</i>	20
2.3. Enfermedad de Parkinson (EP).....	22
2.3.1 Etiología.....	23
2.3.2 Diagnóstico.....	25
2.3.3 Tratamiento.....	25
2.4. Modelos experimentales animales de EP.....	29
2.4.1 6-Hidroxidopamina (6-HODA).....	30

2.4.2 Paraquat (PQ).....	31
2.4.3 Rotenona.....	32
2.4.4 1-Metil-4-Fenil-2,3,6-tetrahidroxipiridina (MPTP).....	34
2.4.4.1 Medidas de seguridad para el uso de la MPTP.....	34
2.4.4.2 Mecanismo de acción del MPTP.....	35
2.4.4.3 Tipos de esquemas de administración.....	36
2.4.4.4 Efecto dependiente de las vía de administración del MPTP.....	37
2.4.4.5 Efectos de la MPTP en diferentes especies animales.....	38
2.4.4.6 Efectos de la MPTP relacionados a la edad.....	38
2.4.4.7 Ventajas del modelo experimental.....	40
2.4.4.8 Desventajas en el modelo.....	40
2.4.4.9 Efecto del MPTP en la expresión de genes	41
2.5. Extracto estandarizado de las hojas del árbol del Ginkgo biloba (EGb761).....	43
2.5.1 ¿Qué es?.....	44
2.5.2 Componentes del EGb 761.....	46
2.5.3 Acción antioxidante.....	48
2.5.4 Acción antiapoptóticas.....	49
2.5.5 Regulación en la expresión de genes.....	50
2.5.5.1 Regulación de Factores de Transcripción.....	52
2.5.5.2 Enzimas antioxidantes.....	53
2.5.5.3 Proteínas mitocondriales.....	54
2.6. Método de análisis para expresión de genes	55
2.6.1 qRT-PCR.....	55
2.6.2 Fluoróforos empleados en qRT-PCR.....	56

2.6.2.1 SYBR Green.....	56
2.6.2.2 Sonda TaqMan	57
2.6.3 Eficiencia de RT-PCR.....	58
2.6.4 Ensayos de cuantificación.....	59
2.6.4.1 Cuantificación Absoluta.....	59
2.6.4.2 Cuantificación relativa.....	60
2.6.4.2.1 Método curva estándar relativa.....	61
2.6.4.2.2 Análisis $\Delta\Delta Ct$	61
2.6.5 Impacto del método.....	62
2.7. Métodos experimentales.....	63
2.7.1 Sujetos experimentales.....	63
2.7.2 Diseño experimental.....	63
2.7.3 Disección de regiones cerebrales.....	64
2.7.4 Extracción de RNA total.....	64
2.7.4.1 Determinación de la concentración, pureza en integridad del RNA total...	65
2.7.5 Reacción de transcriptasa reversa	65
2.7.6 Reacción de Q-RT-PCR	66
2.8. Análisis estadístico.....	67
3. Resultados.....	68
4. Discusión.....	76
5. Conclusiones.....	83
6. Bibliografía.....	85
7. Anexo de técnicas.....	109

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
AADC	L-aminoácido descarboxilasa
AD	Enfermedad de Alzheimer
AP-1	Factor de transcripción AP-1
ATP	Adenosín trifosfato
ATV	Área tegmental ventral
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CAT	Catalasa
c-Jun	Proteína que codifica para el gen <i>Jun</i>
c-Fos	Proteína que codifica para el gen <i>fos</i>
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
COX	Citocromo c oxidasa
CREB	Elementos de respuesta a cAMP
CT	Ciclo umbral
DBD	Dominios de unión al DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
D2R	Receptor de dopamina
dNTP's	Dinucleótidos trifosfatados
EGb761	Extracto estandarizado de las hojas del árbol del <i>Ginkgo Biloba</i>
En1	Engreilad-1
EP	Enfermedad de Parkinson
GAPDH	Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la célula glial
GPX	Glutación peroxidasa
Grd	Glutación Reductasa
GSH	Glutación
6-HODA	6-Hidroxidopamina
HVC	Ácido homovalínico
i.c.v	Administración intracerebro ventricular
i.m	Administración intramuscular
i.p	Administración intraperitoneal
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
JNK	Amino terminal de la cinasa c-Jun
LBD	Dominio de unión al ligando
L-DOPA	Levodopa
MAO-B	Monoaminoxidasa-B
MAPK	Proteín cinasas activadas por mitógenos
MPP+	Ión 1-Metil-4-fenilpiridina
MPTP	1-metil-4-fenil-2,3,6-piridina
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina

NINDS	Instituto Nacional de Desórdenes Neurológicos y Movimiento
NF-kb	Factor de transcripción kappa B
NGF1-B	Nurr77 factor de transcripción huérfano miembro de las hormonas tiroideas y esteroides
Nrf-1	Factor nuclear respiratorio 1
ORF	Marco abierto de lectura
Pitx3	Proteína pituitaria homeobox
PQ	Paraquat
QRT-PCR	Transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
Pur- α	Proteína Pur- α
Redox	Óxido reducción
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RXR	Receptor retinoico X
s.c	Administración sub-cutánea
SN	<i>Sustancia nigra</i>
SNC	Sistema nervioso central
SNpc	<i>Sustancia nigra pars compacta</i>
SOD	Superóxido dismutasa
SOD-Mn	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
SOD-Zn,Cu	Superóxido dismutasa dependiente de zinc-cobre
TH	Tirosina hidroxilasa
VMAT2	Transportador vesicular de monoaminas
VTR	Regiones repetidas en tandem
UPDRS	Escala de grado unificada de la Enfermedad de Parkinson

Resumen

Introducción: La Enfermedad de Parkinson (EP) es una de las enfermedades neurodegenerativas más común cuya etiología es desconocida. Se caracteriza por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc) del mesencéfalo y la disfunción de los circuitos neuronales relacionados con el control de los movimientos corporales. Los síntomas más típicos de esta enfermedad son: bradicinesia (lentitud de los movimientos voluntarios), rigidez muscular y temblor en reposo. La administración de la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidroxipiridina (MPTP) en ratones es el mejor modelo experimental de la EP debido a sus efectos bioquímicos, fisiológicos y patológicos que se asemejan a los que se presentan en este padecimiento. En este modelo se ha reportado una disminución en la expresión de los genes relacionados con la función dopaminérgica. Por otra parte el EGb 761, un extracto estandarizado de hojas del árbol de *Ginkgo biloba* ha mostrado tener propiedades antioxidantes (atrapador de radicales libres) y anti-apoptóticas; además estudios han mostrado que el EGb 761 regula la expresión de diversos genes. Aunque se desconocen los mecanismos de acción de este fitofármaco se considera que son debidos al efecto sinérgico que ejercen los componentes que lo constituyen al actuar en distintos blancos. **Justificación:** Los fármacos actualmente utilizados para el tratamiento de EP se acompañan de efectos adversos que impactan en la salud del paciente por tal motivo, se buscan alternativas terapéuticas que produzcan menores efectos adversos. El EGb 761 ha mostrado efectos benéficos en el tratamiento de humanos con este padecimiento y efectos adversos menores. Se ha demostrado que este fitofármaco influencia la expresión de un gran número de genes. Sin embargo, el efecto en la regulación de genes relacionados con las vías dopaminérgicas no ha sido completamente estudiado. **Objetivo:** Estudiar el efecto del EGb761 en la expresión de genes relacionados con la función dopaminérgica en un modelo experimental de la EP utilizando el modelo de la neurotoxina MPTP. **Hipótesis:** Si el EGb 761 regula la expresión de genes, entonces en el modelo experimental de la EP utilizando la neurotoxina MPTP se restaurará la expresión de genes relacionados con el sistema dopaminérgico. **Material y Métodos:** Se emplearon ratones machos C-57 black (25-30 g). Se administraron por vía intraperitoneal MPTP 30 mg/Kg/5 días y posteriormente el tratamiento con EGb 761 40mg/Kg/17 días. Al día

18 los animales se sacrificaron y 6 regiones cerebrales se extrajeron (mesencéfalo, cerebelo, corteza, estriado, hipocampo, hipotálamo). Se realizó el análisis de expresión en las diferentes regiones en 4 grupos de estudio: grupo I (salina-salina), grupo II (salina-EGb 761), grupo III (MPTP-salina) y grupo IV (MPTP-EGb 761). Para todos los grupos y regiones se analizó la expresión de genes relacionados con el sistema dopaminérgico: *Nurr1*, *Vmat2*, *En1*, *D2r*, *Pitx3*, así como *Th*, mediante transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR). Para ello se utilizaron colorantes fluorescentes inespecíficos como SYBR Green y específicos como tecnología sonda TaqMan. La cuantificación de la expresión se realizó por el método relativo mediante el algoritmo $2^{-\Delta\Delta CT}$. Se definieron los cambios en la expresión de estos 7 genes en las 6 regiones cerebrales. **Resultados:** Se observó un efecto neurorestaurador en la expresión de los genes *Nurr1*, *D2r* y *En1*, genes de importancia para el mantenimiento y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en dos regiones cerebrales: el mesencéfalo y estriado, ambas regiones de la vía nigroestriatal. **Conclusión.** Los resultados mostraron que el tratamiento con el EGb 761 actúa de manera distinta en las diferentes regiones cerebrales, regulando la expresión de genes relacionados con la dopamina. El efecto neurorestaurador del EGb 761 podría explicarse en parte por su modulación o reestablecimiento de la expresión de genes relacionados con el metabolismo, mantenimiento y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas.

1. Introducción

1.1 Planteamiento del problema

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un padecimiento neurodegenerativo que ocupa el segundo lugar de incidencia a nivel mundial. Caracterizada por la triada de síntomas motores: rigidez postural, temblor en reposo y acinesia. La etiología de la EP es desconocida, se han sugerido varias hipótesis patogénicas; sin embargo, la mayoría de los casos de EP son probablemente causados por la combinación entre la susceptibilidad genética y factores ambientales (Schrag et al., 2004; Jankovic et al., 2008).

Existen varios grupos de medicamentos útiles en el tratamiento de esta enfermedad (anticolinérgicos, amantadina y la levodopa). Sin embargo con el tiempo, algunos pacientes (humanos) tratados con estos medicamentos experimentan una serie de efectos secundarios y disminución de la respuesta al tratamiento (Shults et al., 2002; Fahn et al., 2004). Esto genera la necesidad de la búsqueda de alternativas farmacéuticas con menores efectos secundarios.

El EGb 761, un extracto estandarizado de las hojas del *Ginkgo biloba*, ha mostrado efectos benéficos en el tratamiento de pacientes con padecimientos neurodegenerativos y con efectos secundarios menores (Defeundis et al., 2000). Este fitofármaco posee un efecto antioxidante, como atrapador de radicales libres bien establecido (Defeundis et al., 2000). El EGb 761 ha mostrado también su capacidad para regular la expresión de genes relacionados con respuesta inflamatoria, diversos factores de transcripción, procesos apoptóticos y enzimas antioxidantes (Defeundis et al., 2002; Rimbach et al., 2003).

La administración de la neurotoxina MPTP en ratones es el mejor modelo experimental para el estudio de la EP debido a sus efectos bioquímicos, fisiológicos y patológicos que se asemejan a este padecimiento. Nuestro grupo de trabajo ha reportado un efecto neurorestaurador del EGb 761 en este modelo experimental. Este efecto neurorestaurador del EGb 761 contra la neurotoxicidad del MPTP estuvo asociado con un bloqueo en la peroxidación de lípidos y reducción en la expresión de especies reactivas de oxígeno. Adicionalmente se observó una recuperación de dopamina en el estriado y aumento en la actividad de la Tirosina hidroxilasa (TH) (Rojas et al., 2008).

Todo esto nos lleva a hipotetizar que estos eventos están ligados a la regulación de genes de las vías dopaminérgicas.

Por tal motivo en el modelo experimental de la EP utilizando la neurotoxina MPTP y postratamiento con EGb 761 se observará un efecto neurorestaurador en la expresión de genes relacionados con las vías dopaminérgicas en los grupos donde se dio el postratamiento con EGb 761, en comparación con los que solo se administró MPTP + Salina

1.2 Objetivo.

Estudiar el efecto del EGb 761 en la expresión de genes relacionados con la función dopaminérgica en un modelo experimental de la EP utilizando la neurotoxina MPTP.

Administrar el extracto para los tratamientos y extraer las áreas cerebrales.

Objetivos particulares

1. Extracción de ácidos nucleicos (DNA y RNA) en seis regiones cerebrales para los cuatro grupos de estudio.
2. Determinar concentración, pureza e integridad de los ácidos nucleicos para evaluar la expresión de genes.
3. Realizar la estandarización de las técnicas para evaluar la expresión de los genes: *Nurr1*, *Vmat2*, *En1*, *D2R*, *Pitx3*, así como *Th*.
4. Realizar un análisis estadístico con los resultados obtenidos de los 4 grupos en estudio, determinando si existe diferencia significativa en cuanto a la expresión de los genes de interés.

1.3 Hipótesis

Si el EGb 761 regula la expresión de genes, entonces en el modelo experimental de la EP utilizando la neurotoxina MPTP se restaurará la expresión de genes relacionados con el sistema dopaminérgico.

2. Marco Teórico

2.1 Sistema Dopaminérgico.

2.1.1. Dopamina. La Dopamina ($C_6H_3(OH)_2-CH_2-CH_2-NH_2$) es concebida como uno de los neurotransmisores catecolaminérgico mas importantes del sistema nervioso central (SNC) (figura 1). Cumple funciones importantes tales como la regulación de diversas funciones motoras, neuroendócrinas, motivacionales, afectivas, así como la adicción en el consumo de drogas altamente adictivas como la cocaína, las anfetaminas y otros psicoestimulantes. La dopamina se produce en varias áreas del cerebro, incluyendo la sustancia nigra (SN) y el área tegmental ventral (ATV) (Bohlen et al., 2005; Björklund et al., 2007). La dopamina es también una neuro-hormona liberada por el hipotálamo, su función principal en éste es inhibir la liberación de prolactina del lóbulo anterior de la hipófisis (Rawal et al., 2006).

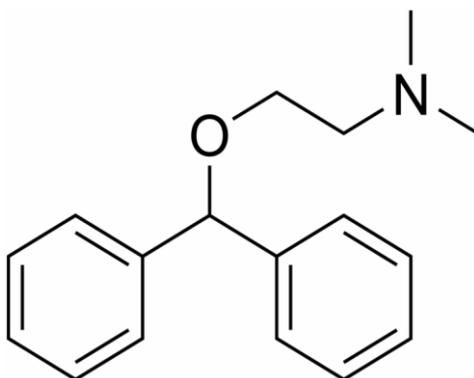


Figura 1. Estructura química de la dopamina (tomada de NCBI PubChem compound).

Síntesis de Dopamina.- En las células dopaminérgicas la dopamina se sintetiza en el citoplasma a partir del aminoácido L-tirosina. Dos reacciones convierten la L-tirosina a dopamina: la primera es catalizada por la acción de la enzima Tirosina hidroxilasa (TH) que convierte la tirosina a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). TH se considera como la enzima limitante en esta vía. El segundo paso es la descarboxilación de L-DOPA catalizada por la enzima aromática L-aminoácido descarboxilasa (AADC) que produce dopamina (figura 2).

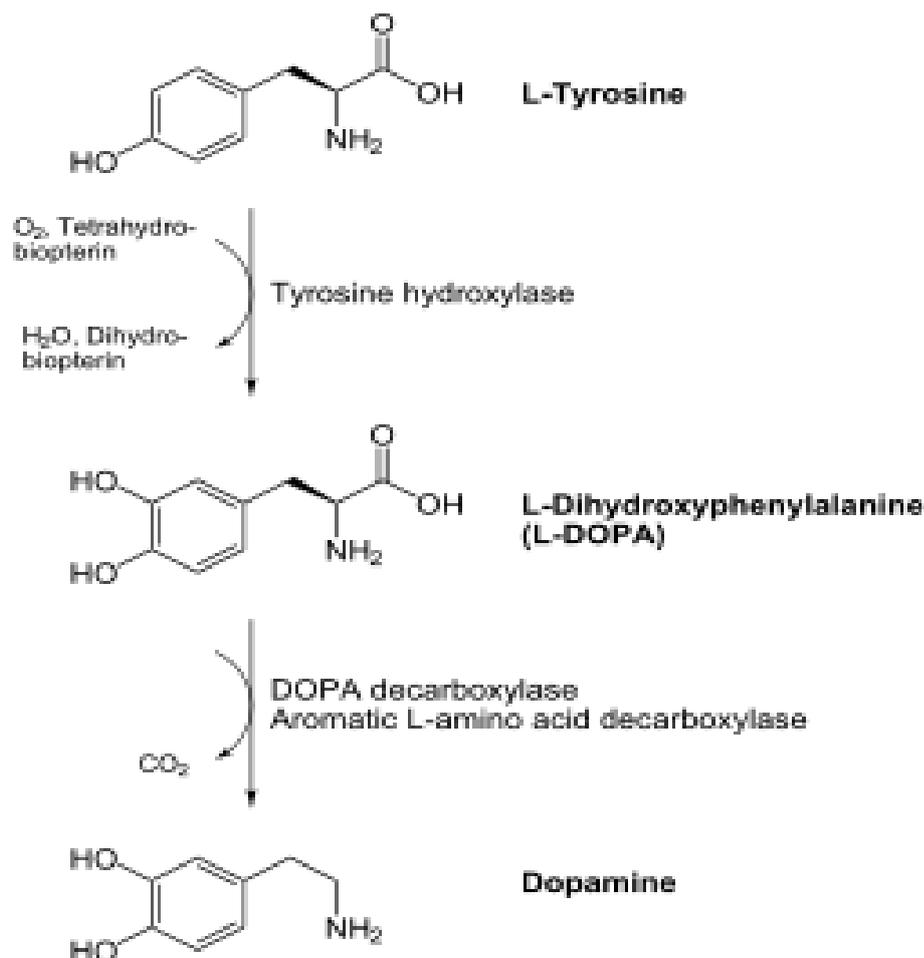


Figura 2. Síntesis de dopamina (tomada de Bahena-Trujillo 2000).

La dopamina sintetizada puede ser liberada directamente al espacio extracelular o bien almacenada en vesículas por el transportador vesicular de monoaminas (VMAT), ésta acumulación facilita su liberación regulada a través de un mecanismo de exocitosis dependiente de calcio. Una vez que la dopamina es liberada y ha actuado sobre receptores D1R y D2R, su acción concluye por medio de dos mecanismos, la recaptura y el catabolismo. La recaptura (retorno de la dopamina a células presinápticas) es regulada por el transportador de dopamina (DAT), éste recicla la dopamina a través de un cotransporte con los iones sodio (Na⁺) y cloro (Cl⁻). El segundo mecanismo de termino de acción de la dopamina es a través de su catabolismo por 2 enzimas (figura 3): la Monoaminoxidasa (MAO) y la catecol-o-metiltransferasa (COM), para generar los metabolitos inactivos ácido dihidrofenilacético (DOPAC) y ácido Homovalínico (HVC), los que son posteriormente eliminados del organismo a través de la orina, (Vallote et al., 2000).

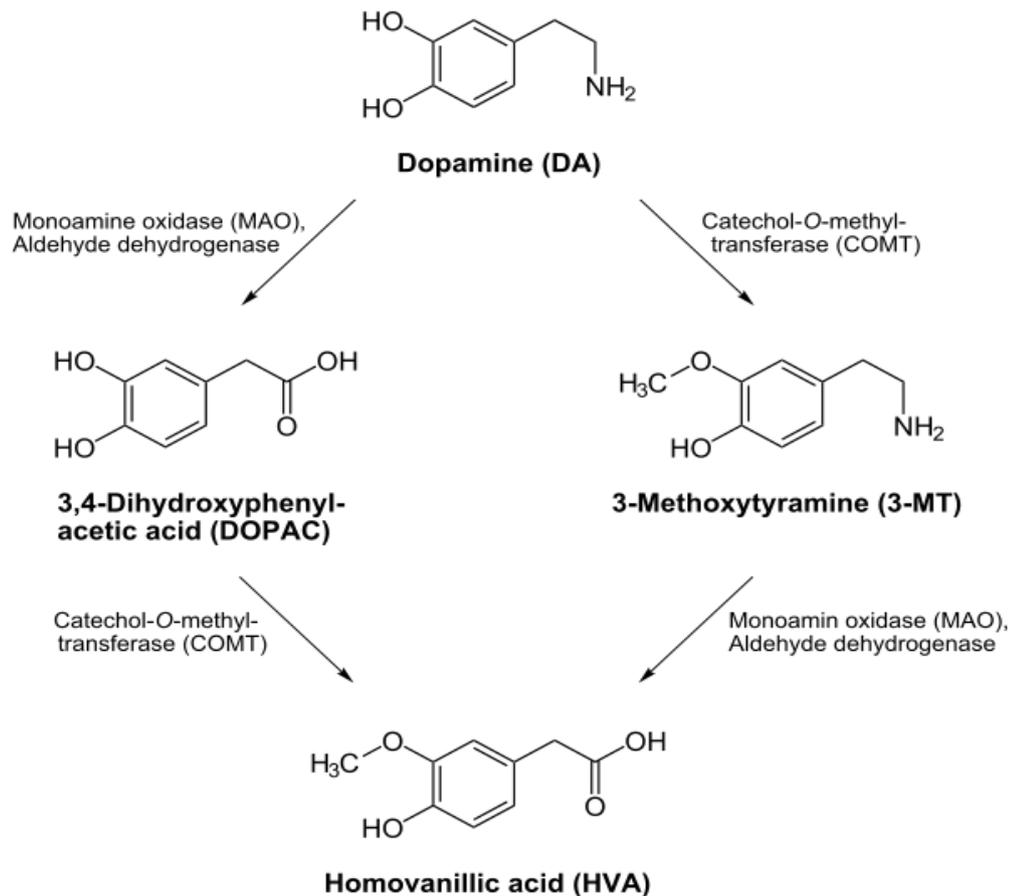


Figura 3. Catabolismo de la dopamina (tomada de Bahena-Trujillo 2000).

Las neuronas dopaminérgica del mesencéfalo producen dopamina en el SNC, estas requieren de ciertos genes para su desarrollo, diferenciación y mantenimiento entre ellos se encuentran: el gen *Nurr1*, *Pitx3*, *En1*, entre otros (Vitalis et al, 2005).

Receptores de dopamina.- Los receptores de dopamina son proteínas pertenecientes a la familia de receptores con siete segmentos transmembranales acoplados al sistema de transducción intracelular mediante proteínas G. Se han aislado, caracterizado y agrupado 5 receptores de dopamina. De acuerdo a sus características los receptores se clasifican en dos grupos llamados tipo-D1 y tipo-D2. Los receptores tipo-D1 están compuestos por los subtipos D1 y D5; los receptores del grupo tipo-D2 se forman por los subtipos D2, D3, y D4. Los receptores D1 se caracterizan por estar unidos a proteínas G α /s que estimulan al adenilato ciclasa para producir el adenosín monofosfato cíclico (cAMP). Mientras que los receptores D2 se unen a

proteínas $G\alpha 1/o$ que clásicamente inhiben a la adenilato ciclasa evitando el aumento del cAMP (Shioda et al., 2010), su localización es presináptica funcionando como autorreceptores. Además de las diferencias farmacológicas, los receptores D1 y D2 presentan importantes diferencias estructurales.

El estudio de la dopamina y sus receptores se ha centrado principalmente en el SNC, debido a que distintas alteraciones de los sistemas dopaminérgicos han sido asociados con patologías neuronales severas como la EP, esquizofrenia y psicosis, así como la adicción a drogas entre las que se encuentran cocaína, anfetaminas, marihuana y alcohol (Vallote et al., 2000).

2.1.2 Vías dopaminérgicas. Las neuronas dopaminérgicas son un grupo de células anatómico-funcional heterogéneas, localizadas en el mesencéfalo, el bulbo olfatorio y el diencefalo (Björklund et al, 2007). El grupo más prominente de neuronas reside en el ATV del mesencéfalo, éste contiene aproximadamente el 90% del total de las neuronas dopaminérgicas. Las vías dopaminérgicas mesencefálicas se subdivide en varias vías nominales (Flores et al., 2003; Rawal et al., 2006).

a) Vía nigroestriatal: La vía nigroestriatal de la sustancia nigra (SN), es un núcleo de neuronas localizado en el mesencéfalo y se extiende a las fibras dentro del caudado *putamen* (conocido como el estriado dorsal) (Björklund et al., 2007). Aproximadamente un 80% de toda la dopamina que se encuentra en el cerebro se halla en el cuerpo estriado. Esta vía es una llave moduladora del comportamiento humano, está implicada en la regulación motora y la ejecución de tareas, permitiendo que el movimiento se realice de forma armoniosa y obedezca a las órdenes voluntarias del individuo de acuerdo con patrones motores bien establecidos (Rawal et al., 2006; Björklund et al., 2007). La degeneración de estas neuronas causa la EP (Rawal et al., 2006).

b) Vía mesolímbico-mesocortical

La vía mesocorticolímbica tiene su origen en el ATV, también localizada en el mesencéfalo. Dicho núcleo contiene células dopaminérgicas que envían proyecciones a la corteza frontal y el lóbulo límbico, conformando los circuitos mesocortical y mesolímbico respectivamente, también llamado mesocorticolímbico.

La vía mesolímbica se proyecta hacia el núcleo acumbens, tubérculo olfatorio, núcleo central de la amígdala, septum lateral y núcleo intersticial de la estria terminal (Flores et al., 2003).

La vía mesocortical se proyecta hacia la corteza motora y a la corteza parietal, temporal y cingular posterior, es decir, hasta las principales áreas sensoriomotoras y de asociación (Flores et al., 2003).

La vía mesocorticolímbica es crucial para el funcionamiento de varios compartimientos importantes como: la motivación, el control de emociones y la cognición, es decir, están implicados en todos aquellos procesos en donde la motivación forma parte esencial de la conducta. Este sistema se encuentra afectado en la Esquizofrenia (Wise et al., 1996; Noble et al., 2003).

c) Vía tuberoinfundibular:

Finalmente, el sistema dopaminérgico que comprende el área tuberohipofisiaria, involucra el control endócrino, originado en el hipotálamo y las proyecciones del tallo del hipotálamo. La inhibición de este sistema por drogas antipsicóticas causan un incremento en la secreción de prolactina, que es responsable de ciertos efectos tales como la disfunción sexual, la infertilidad, ginecomastia y galactorrea (Rawal et al., 2006). Esta vía se mediada por el receptor D2; del que se ha demostrado que antagoniza la acción del efecto de las drogas antipsicóticas (Marsden et al., 2006).

Las alteraciones de estas tres vías de señalización se han asociado con diversas enfermedades. Así, la EP se ha asociado con alteraciones en la vía nigroestriatal, la esquizofrenia con alteraciones en la vía mesolímbica-mesocortical y diversas alteraciones hormonales con la vía tuberoinfundibular (Dale et al., 2000).

Las células que producen dopamina se generan en el estado embrionario en el mesencéfalo ventral y se ha demostrado que este proceso requiere de una estructuración compleja, que consiste en una serie de factores de transcripción y vías de señalización.

Debido a que las vías dopaminérgicas en el mesencéfalo se asocian con serios desordenes neuropsiquiátricos, la elucidación de los mecanismos subyacentes sobre el desarrollo neuronal dopaminérgico, puede proporcionar algunas pistas en cuanto a los posibles tratamientos para las enfermedades relacionadas (Perrone-Capano et al., 2000). Se ha demostrado que los factores

de transcripción incluyendo *Pitx3*, *Nurr1* y *En1* juegan un rol crítico en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas (Perrone-Capano et al., 2000). Los cuales continúan expresándose en el cerebro posnatalmente y en etapas adultas (Kambiz et al, 2008).

Una de las enfermedades neurodegenerativas de importancia en la última década es la EP. La posibilidad de que su causa sea por factores genéticos predisponentes ha despertado interés en la regulación de genes afectados por esta enfermedad. Siendo importante la búsqueda de tratamientos que regulen genes relacionados con la cascada dopaminérgica. Para lograr tratamientos oportunos que aminoren los efectos de la patología y efectos secundarios ocasionados por los fármacos empleados hasta este momento.

2.2 Genes relacionados con el sistema dopaminérgico

2.2.1 TH

La tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima que cataliza el paso inicial y limitante de la velocidad en la biosíntesis de los neurotransmisores como dopamina, norepinefrina y epinefrina. Responsable de catalizar la conversión de L-tirosina a dihidroxifenilalanina en DOPA, utilizando el oxígeno molecular y tetrahidrobiopterina (BH4) (Royo et al., 2005; Cho et al., 2009).

TH se expresa en el citoplasma de las neuronas noradrenérgicas y dopaminérgicas, en el locus coeruleus, el ATV, SN, medula adrenal y ganglios simpáticos (Cho et al., 2009).

El gen *tirosina hidroxilasa (TH)*, se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 banda 15.5 (11p15.5) (Fitzpatrick et al., 1999); en el ratón se localiza en el cromosoma 7 F5. Contiene 14 exones y 12 intrones, su longitud es de aproximadamente 8.5KB. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/21823> accesado 11/11/2010).

La expresión de la proteína TH es mediada por el factor de transcripción Nurr1, que se une al promotor de TH (región NBRE) (Jankovic et al., 2005; Rao et al., 2007). En el SNC los niveles de mRNA de *TH* son modulados también por diferentes factores entre ellos: administración de glucocorticoides, frío, estrés por inmovilización (induce la expresión de la proteína TH en neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo), hormonas (los andrógenos, aumentan su expresión) y administración de drogas (cocaína, reserpina y morfina) (Kumer et al., 1996; Tank et al., 2008).

La actividad de TH en el SNC se regula por su fosforilación en 3 sitios distintos de la enzima, modulando la biodisponibilidad de dopamina, siendo esta última indispensable para la locomoción (Gozal et al., 2005).

El contenido de DA en el estriado es 10 veces mayor que en la SN, sin embargo en ésta última, la vida media es más larga. Durante el envejecimiento se observa una reducción en el contenido de la proteína TH en la SN, llevando a una pérdida de DA del 35-70% (Rudow et al., 2008; Salvatore et al., 2009) que se correlaciona con alteraciones de la actividad motriz (Kubis et al., 2000). Por lo tanto el déficit en la TH y los rangos de fosforilación de las proteínas, es la actividad clave en la modulación de TH en la SN, estas alteraciones son la

fuente común de la bradicinesia en EP y en el envejecimiento (Salvatorre et al., 2009).

2.2.2 *Pitx 3*

Pitx3 es un miembro de la familia homobox RIE/PITX. Está implicado en el desarrollo de los ojos y la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. Se expresa durante el desarrollo embrionario y después del nacimiento en estas neuronas. En etapa embrionaria este factor activa el promotor de TH, realizando una activación cooperativa con el factor de transcripción de Nurr1. (Bergman et al., 2010). En su ausencia las neuronas dopaminérgicas de la SN no sobreviven (Bermang et al., 2010). *Pitx3* es un factor de transcripción de importancia para la diferenciación y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo.

Investigaciones han mostrado que *Pitx3* contribuye a la regulación de la expresión de genes que codifican: *Aldehído deshidrogenasa 2 (AHD2)*, *Tirosina hidroxilasa (TH)*, factor neurotrófico derivado del cerebro (*BDNF*) y el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (*GDNF*) (Maxwell et al., 2005; Papanikolaou et al., 2009).

El gen *Pitx3* en el humano se encuentra en el brazo largo del cromosoma 10 en la banda 25 (10q25); y en el ratón se localiza en el cromosoma 19qC3. Este gen contiene 4 exones y 3 intrones a lo largo de 12,641pb (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/18742> accesado 11/11/2010).

Estudios han mostrado que la cantidad del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de *Pitx3* es aproximadamente 6 veces más en el área ATV que en las neuronas de la SN (Korotkova et al, 2005). Este factor se expresa en neuronas dopaminérgicas (Barzilai et al., 2003; Bermang et al., 2010), y en las células del músculo esquelético, persistiendo en el adulto (Coulon et al., 2007).

El mecanismo molecular de *Pitx3* no es claro. Sin embargo, se ha identificado que *Pitx3* induce la transcripción de un microRNA, miR133b. Este micro RNA se expresa específicamente en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, regulando la maduración y función de estas neuronas (Kim et al., 2009). Un estudio realizado demostró que miR133b es deficiente en los tejidos del mesencéfalo de pacientes con la EP (Gao et al., 2008).

2.2.3 Vmat 2

El transportador vesicular 2 de monoaminas (VMAT2) es una proteína integral de membrana que actúa para transportar monoaminas (histamina, serotonina y dopamina) del citosol celular a las vesículas sinápticas (Zheng et al., 2006), desempeñando un papel importante en la transmisión sináptica, secuestrando los neurotransmisores para su almacenamiento y su posterior liberación controlando la concentración y disposición de dopamina citoplasmática en terminales nerviosas (Duchemin et al., 2009).

VMAT2 se ha considerado como una diana farmacológica para el tratamiento de la EP, debido a que secuestra la dopamina, previniendo su oxidación en el citoplasma, esto sugiere un efecto protector (Zheng et al., 2006).

El gen que codifica a *Vmat2* es denominado *Slc18a2*, segundo miembro de la familia 18 de acarreadores de solutos. En el humano se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 banda 25 (10q25) (Surrat et al., 1993); y en el ratón se localiza en el cromosoma 19 en qD3. Contiene 16 exones y su tamaño es de 34.751pb (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/214084> accesado 11/11/2010).

Vmat2 se expresa sobre todo en las neuronas monoaminérgicas del SNC y en neuronas del sistema nervioso simpático, adicionalmente se expresa en población de células endócrinas (Headley et al., 2007). La evidencia sugiere que el transportador vesicular de dopamina está regulado en el estriado, en donde la dopamina puede jugar un rol en su regulación (Surrat et al., 1993; Fleckenstein et al., 2009).

2.2.4 Engrailed 1 (En1)

En1 es un factor de transcripción Homobox que está implicado en la diferenciación del SNC y la medula espinal, así como en la función y supervivencia neuronal (Morgan et al., 2006). También es esencial para el desarrollo de las extremidades, el desarrollo de los huesos craneofaciales (Deckelbaum et al., 2006) y el desarrollo de la musculatura del tronco del esqueleto. En el adulto En1 se encuentra predominantemente en el tectum, la SN y el ATV (Horst et al., 2001).

En1 es codificado por el gen *Engrailed 1 (En1)* localizado en el humano en el brazo largo del cromosoma 2 banda 13-21 (2 q13-21) (Kohle et al., 1993); y en el ratón en el cromosoma 1qE2.3. Este gen contiene 4 exones y 1 intron a través de 67,551pb (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13798> accesado el 11/11/2010).

Se ha mostrado que la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas de SN y ATV requieren de la expresión de genes *Engrailed*, especialmente *En1*. Este gen continúa expresando en las neuronas dopaminérgicas en edad adulta (Horst et al., 2001; Simón et al., 2001; Albéri et al., 2004). Estudios han mostrado que la muerte de las células causada por apoptosis, es rápidamente inducida si *En1* es silenciado en las neuronas dopaminérgicas (Albéri et al., 2004; Alavian et al., 2009).

La disfunción o mutaciones en el gen *En1* se vinculan con enfermedades como el autismo y la EP (Simón et al., 2001; Kuemerle et al., 2007). Es un gen esencial para el desarrollo del mesencéfalo y la diferenciación de las estructuras cerebrales. Se expresa en todos los grupos de neuronas de la médula y el cerebro (Zec N et al., 1997).

2.2.5 D2r

Los receptores de dopamina D2 (D2R) son una clase de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G, que se encuentra predominantemente en SNC. Forman parte de la subfamilia tipo-D2, junto con D3R y D4R. La dopamina es su principal ligando endógeno (Vallote et al., 2000).

El receptor D2R regula la síntesis y liberación de la dopamina. Se ha demostrado que la isoforma corta está involucrada en la disminución de la fosforilación de TH (Kim et al., 2004).

El D2R se ha implicado en la modulación de la actividad motora, el aprendizaje y la memoria; así como en la fisiopatología de los trastornos neuropsiquiátricos como la EP y la esquizofrenia (Hranilovic et al., 2008; Missale et al., 1998). Varias líneas de investigación sugieren que el D2R está involucrado en otros aspectos importantes de la conducta: excitación, recuperación y consolidación de los recuerdos de miedo y otros aspectos límbicos (Wang et al., 2000; Hranilovic et al., 2008; Blasi et al., 2009).

D2R es codificado por el gen *D2r* localizado en el humano en el brazo largo del cromosoma 11 en la banda 23.1 (11q23.1); y en el ratón en el cromosoma 9qA5.3. Este gen contiene 8 exones y 7 intrones a través de 67,551pb (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13489> accesado 11/11/2010).

El gen *D2r* codifica para dos isoformas moleculares diferentes generadas por un splicing alternativo. Estas isoformas son: la forma larga (D2L) y la forma corta (D2S). Diferenciando a D2L de D2S la adición de 29 aminoácidos en su estructura (Wang et al., 2000). Las dos isoformas tienen una localización sináptica diferente: D2L se localiza principalmente en vesículas postsinápticas expresándose predominantemente en la SNpc y ATV; mientras que D2S funciona como autorreceptor presináptico y se localiza principalmente en la retina, riñones, sistema vascular y glándula pituitaria (Hranilovic et al., 2008; Blasi et al., 2009).

Recientemente se ha caracterizado al ácido retinoico como un elemento de respuesta en el promotor del gen *D2r*, desempeñando un papel importante en la regulación transcripcional de éste gen (Samad et al., 1997).

2.2.6 *Nurr1*

Nurr1 es un factor de transcripción que pertenece a la súper familia de receptores nucleares. El ligando para este receptor aun no se ha encontrado, por esa razón se hace referencia como un receptor nuclear huérfano.

Nurr1 se une a la secuencia NBRE (NBRE: AAAGGTCA) las cuales activan la transcripción de los genes Tirosina hidroxilasa (*Th*), transportador vesicular de monoamina (*Vmat2*), transportador de dopamina (*DAT*), AADC, entre muchos otros. Estudios han demostrado que *Nurr1* no solamente es crítico para la diferenciación temprana de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, sino también para el mantenimiento funcional de dichas neuronas en la edad adulta (Xu et al., 2004; Banafsheh et al., 2009).

La proteína *Nurr1* juega un rol importante en la regulación neuroendócrina, a nivel del eje hipotálamo/pituitaria/adrenal (Jankovich et al., 2005).

Nurr1 forma heterodimeros con el receptor del ácido retinoico X (RXR) y se une a elementos de respuesta de RXR. La actividad de *Nurr1* puede regular

rápidamente la vía MAPK (proteín cinasas activada por mitógeno) y otras vías (Xu et al., 2004).

Este factor de transcripción es codificado por el gen *Nurr1*. Este gen se localiza en el humano en el cromosoma 2 en la banda del brazo largo 22-23 (Wang et al., 2003); mientras que en el ratón se localiza en el cromosoma 2 en la banda qC1.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/18227> accesado el día 11/noviembre/2010).

La estructura del gen *Nurr1* incluye 8 exones y 7 intrones; con una longitud total de 9.822 Kb. El marco abierto de lectura (ORF) del gen *Nurr 1* contiene 1794 bases codificadas a 598 aminoácidos. El sitio de inicio de la traducción (codón de inicio) está en el tercer exón y la terminación de la traducción (codón de paro) está corriente arriba del exón 8. La región corriente abajo del exón 8 es una región no traducida-3` (UTR) que contiene una secuencia repetida de ATTTA y tiene una longitud total de 1.3kb. Esta región es importante para la estabilización de mRNA en la traducción. *Nurr1* se caracteriza como un gen de respuesta temprana, porque facilita una rápida transcripción en respuesta a estímulos ambientales (estrés) y diferentes factores celulares (factores de crecimiento) (Scearces et al., 1993; Wang et al., 2003).

El gen *Nurr1* tiene tres grandes partes: dominio de unión a DNA (DBD) en la región central de *Nurr1*, dominio de unión al ligando (LBD) y la región variable (Jankovich et al., 2005). El gen *Nurr1* tiene dos características distintivas: la primera característica es que LBD de *Nurr1* no tiene cavidades, están normalmente ocupados por ligandos, por varias cadenas voluminosas con residuos hidrofóbicos. La segunda característica es que *Nurr1* se une a sitios co-activadores. *Nurr1* regula la transcripción probablemente porque se une a NGFI-B elementos de respuesta al DNA (Ichinose et al., 1999).

Nurr1 se expresa predominantemente en el SNC, especialmente en la SN, ATV, el mesencéfalo y el área límbica. Adicionalmente aumenta su expresión en el bulbo olfatorio, hipocampo, corteza temporal, subiculum cerebeloso, hipotálamo posterior y núcleo habenuclear. La expresión constitutiva de este gen está restringida al tejido cerebral en el adulto, pero su expresión puede ser inducida en otros tejidos en respuesta a estímulos extracelulares. Se ha encontrado que la proteína Nurr1 se expresa en la

corteza suprarrenal en respuesta a la estimulación por la hormona adrenocorticotropina y en células del hígado en regeneración (Scearces et al., 1993).

Nurr1 está distribuido en el núcleo del SNC, especialmente en las neuronas dopaminérgicas. La proporción de las neuronas del SNC que expresan Nurr1 es del 96% en la SN, 95% en el ATV, el 91% en la línea de rafe nuclear, 85% en el bulbo olfatorio y el 61% en la corteza (Backman et al., 1999). En las neuronas del área periventricular y del núcleo del hipotálamo únicamente se expresa modestamente Nurr1 y TH, mientras que en las neuronas noradrenérgicas su existencia es nula. Los niveles de la expresión de *Nurr1* es diferente en los distintos estados de desarrollo embrionario y la etapa adulta; encontrándose aumentado en el desarrollo embrionario (Jankovich et al., 2005; Zhang et al., 2009).

Algunos estudios realizados muestran que el gen *Nurr1* es esencial para el desarrollo, migración, supervivencia y diferenciación final de las células precursoras dopaminérgicas del área ventral mesencefálica y promotor del desarrollo de estas células precursoras dentro de un completo fenotipo dopaminérgico. Los defectos en el gen *Nurr1* alteran la expresión de genes en el SNC, asociados con la EP y ciertos desordenes psiquiátricos, como esquizofrenia, bipolaridad y predisposición a la adicción a cocaína (Jankovich et al., 2005; Zhang et al., 2009).

2.3. Enfermedad de Parkinson (EP)

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, afecta del 1 al 2% de las personas mayores de 65 años de edad. En México se presenta en poco más de 50 personas por cada 100 mil habitantes, con prevalencia en el sexo masculino, según el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (Limón et al., 2008).

La EP se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y el ATV (Aarsland et al., 2009).

Clínicamente la EP se presenta cuando la dopamina estriatal se ha perdido en un 80%. Los síntomas se dividen en motores y no motores. En los síntomas motores encontramos las cuatro características de la EP que se agrupan bajo el acrónimo de TRAP: temblor en reposo, rigidez, acinesias o

bradicinesias e inestabilidad postural (figura 4), adicional a estas características se presentan la postura flexionada y la congelación (bloqueo motor) que tiene que ser incluida como una muestra clásica de fallas en el parkinsonismo (Stanley et al., 2008). La expresión de la sintomatología motora se agrupa en periodos ON (cuando los síntomas están ausentes) y OFF (no responde al tratamiento y síntomas vigentes) (Jankovic et al., 2008).

Entre los síntomas no motores comúnmente apreciados en EP se incluyen deterioro cognitivo, disminución en la motivación, apatía, demencia, fatiga, depresión, ansiedad, disturbios del sueño, estreñimiento, alteraciones en la vejiga, autonómicos (sexual, gastrointestinal) y desordenes sensoriales (los síntomas sensoriales incluyen el dolor, entumecimiento, zumbidos y sensación de quemazón) (Jankovic et al., 2008).



Figura 4. Síntomas clásicos de la EP rigidez, temblor, trastornos del equilibrio postural y dificultad al caminar (tomada de Daniel Limón, 2008).

2.3.1 Etiología

La controversia existente en cuanto a la etiología y patogénesis de la EP todavía persiste. Dicha etiología es multifactorial y no del todo bien conocida,

resultando muy difícil desarrollar fármacos apropiados que impidan la progresión de la enfermedad. Hasta el momento se han descrito diversos mecanismos relacionados con la etiología y la evolución de la EP (mecanismos que contribuyen a la degeneración y muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas); entre los más estudiados son: factores ambientales, factores hereditarios ligados a genes, excitotoxicidad ocasionada por el glutamato, anomalías mitocondriales, acumulación del hierro en la SN y estrés oxidativo (Jankovic et al., 2008). Una de las hipótesis con mayor auge en los últimos tiempos sobre el origen de la EP es la formación de radicales libres generadas por estrés oxidativo.

Radicales libres.- Independiente de cuál sea la causa de la EP, se conocen diversos procesos implicados en la producción del daño neuronal. Entre ellos la producción de radicales libres, compuestos inestables que carecen de un electrón. Son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado en una capa externa, en un intento de recuperar el electrón que falta, reaccionan con las moléculas circundantes (especialmente metales como el hierro), en un proceso llamado oxidación. Son muy reactivos y de vida efímera, con una enorme capacidad para reaccionar con diversas moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Bandyopadhyay et al., 1999). Pueden proceder de fuentes exógenas (fuentes ambientales) o endógenas (síntesis de novo en el interior del tejido). Se considera que la oxidación ocasiona daños al tejido, incluyendo las neuronas (Abou-Sleiman et al., 2006). Normalmente, los antioxidantes protegen a las células de este daño, manteniendo el control de los radicales libres. Las pruebas que fundamentan que los mecanismos oxidativos pueden ocasionar o contribuir a la EP incluyen: el hallazgo en los niveles elevados de hierro en el cerebro de estos pacientes, en especial en la materia gris, y niveles decrecientes de ferritina que sirve como mecanismo protector rodeando o formando un círculo alrededor del hierro y aislándolo (Bandyopadhyay et al., 1999; Turens et al., 2003).

En los últimos años la teoría de que los radicales libre están implicados en el desarrollo de la EP ha tomado fuerza, siendo la mitocondria el

principal generador y diana de estos, produciendo una deficiencia en su actividad. El desequilibrio en la generación de radicales libres y los sistemas de defensa antioxidantes, pueden contribuir a un estado de daño tisular, resultando en la inhibición mitocondrial, responsable del daño neuronal.

En conjunto, todas estas especies reactivas que pueden formarse en la mitocondria van a actuar dañando proteínas, el ADNmt y oxidando lípidos. Provocando en último caso la disfunción mitocondrial, mitoptosis y apoptosis (Turrens et al., 2003).

2.3.2 Diagnóstico

No hay pruebas de sangre o laboratorio que permitan diagnosticar la EP. El diagnóstico se basa en el historial médico y la examinación neurológica. La enfermedad puede ser difícil de diagnosticar. La escala de grado unificada (UPDRS) de la EP es una herramienta clínica usada para diagnosticar y determinar la severidad de la EP. En la práctica clínica, el diagnóstico esta basado típicamente en la presencia de una combinación de características motoras y no motoras, así como la respuesta a la levodopa. Las señales y los síntomas de la EP se pueden confundir con los efectos del envejecimiento normal y distintos síndromes parkinsonicos. El médico puede necesitar observar a la persona por algún tiempo hasta que sea evidente que los síntomas están constantemente presentes. Generalmente los médicos buscan en el paciente el arrastre de los pies y la carencia en la oscilación de los brazos (DMS-IV TR). Algunas veces el diagnóstico es directo cuando el paciente presenta signos clásicos de la EP. Los criterios diagnósticos han sido desarrollados por el Banco de cerebros de la sociedad de la Enfermedad de Parkinson del Reino Unido y el Instituto Nacional de Desórdenes Neurológicos y Movimiento (NINDS) (Jankovic et al., 2008). De hecho, únicamente el 75% de los diagnósticos clínicos son confirmados con la autopsia.

2.3.3 Tratamiento

Los tratamientos conocidos con eficacia para el tratamiento de la EP incluyen levodopa (L-DOPA), como una terapia para compensar la pérdida de la dopamina. Estas terapias son eficaces en el alivio de muchos de los síntomas de EP, sin embargo no frenan el progreso de la enfermedad. Desde

el punto de vista terapéutico la levodopa es el fármaco de uso oral más potente para reducir síntomas motores propios de EP, así mismo se ha visto una reducción de la mortalidad de los pacientes (Holloway et al., 2004).

El uso de levodopa asociado con un inhibidor de la enzima catecol orto metil transferasa (COMT), como entacapone, en dosis mínima puede ser recomendable. La aparición de la triple terapia en la que se combina levodopa, carbidopa (inhibidor periférico de la dopa descarboxilasa) y entacapone (inhibidor de la COMT) en un mismo comprimido, parece ser una buena alternativa para reducir las complicaciones a largo plazo (Schrag et al., 2004).

A medida que la enfermedad evoluciona muchos síntomas que se desarrollan no responden a la levodopa, de un 40% a 80% de los usuarios desarrollarán complicaciones motoras y no motoras de intensidades variables al cabo de 5 a 10 años de tratamiento (Santini et al., 2008), siendo en ocasiones discapacitantes y afectando la calidad de vida del paciente.

A la levodopa le siguen un grupo heterogéneo de fármacos con potencia variable.

1. Los inhibidores selectivos de la MAO: selegilina y la rasagilina proporcionan beneficio en los síntomas a través del bloqueo de la enzima MAO-B, resultando en una reducción del metabolismo de la dopamina y por lo tanto hay mas dopamina en el cerebro (Fahn et al., 2008).
2. Agonistas dopaminérgicos. Se clasifican de acuerdo a su estructura molecular y la afinidad a los diferentes receptores de dopamina (D1, D2, D3, D4 y D5). Los agonistas dopaminérgicos disminuyen la incidencia en la presentación de discinesias (movimientos anormales), retrasan el desarrollo de las complicaciones motoras cuando es comparado con la levodopa (Holloway et al., 2004; Schrag et al., 2004). Las limitaciones de este tipo de tratamiento es su asociación con fibrosis de las válvulas cardiacas y problemas gastrointestinales (Goetz et al., 2005).
3. Numerosos fármacos se han evaluado como neuroprotectores con pobres resultados. El uso de la coenzima Q-10 (1200 mg/día) ha mostrado beneficios significativos en un ensayo prospectivo, doble

ciego, controlado contra placebo. Sin embargo existe controversia si este efecto benéfico es sintomático más que un efecto neuroprotector (Shult et al., 2002).

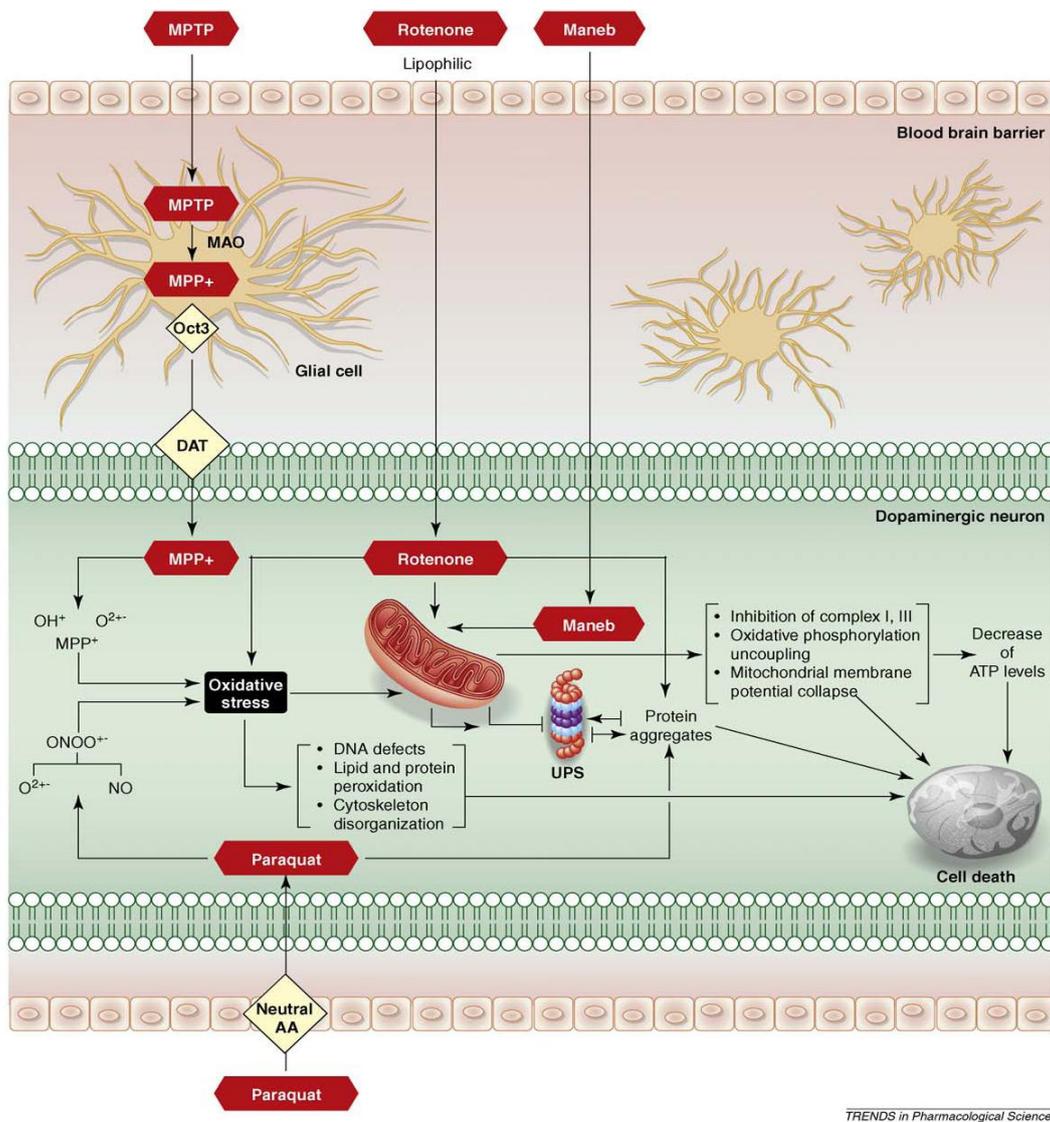
4. Anticolinérgicos. Su principal utilidad radica en el control del temblor (presente en alrededor de un 75% de los pacientes con EP) con menor efecto en los signos de rigidez y bradicinesia. Producen numerosas y frecuentes complicaciones de tipo cognitivo (somnolencia, confusión), cardiovascular (arritmias) y autonómicas (retención urinaria), actualmente su uso es escaso dentro del arsenal terapéutico disponible en la EP, quedando reservado especialmente para sujetos jóvenes con temblor que responde escasamente a la terapia habitual mencionada (Goetz et al., 2005; Gjerden et al., 2008).
5. Amantadina: antiviral, posee utilidad relativa en el control de la rigidez y la bradicinesia de la EP (Rascol et al., 2000; Fahn et al., 2008), particularmente en etapas iniciales, además de las discinesias relacionadas al uso de levodopa (Thomas et al., 2004). Su limitación reside en que su beneficio suele ser transitorio, restringido a algunos meses.

Existen terapias farmacológicas paralelas a las antes mencionadas como los fitofármacos, que han demostrado que producen mejoras en las enfermedades neurodegenerativas (Ramassamy et al., 2006). “Fitofármaco”: “fito” procede del griego y significa planta, “fármaco” que significa medicamento. Por lo tanto, en términos generales los fitofármacos son medicamentos que contienen como principio activo compuestos extraídos de plantas, partes de plantas, ingredientes vegetales o bien, preparaciones obtenidas a partir de ellas. Sin embargo son todavía terapias muy restringidas, la administración de nootrópicos (activadores cerebrales) como polifenoles, pueden tener un potencial terapéutico en patologías de origen multifactorial, debido a su acción farmacológica en múltiples blancos (Ramassamy et al., 2006).

Uno de los fitofármacos con un mayor potencial para el uso en el tratamiento de la EP es el EGb 761, extracto estandarizado de las hojas del árbol del *Ginkgo biloba*. Nuestro grupo de trabajo demostró que el pretratamiento con EGb 761 en un modelo de EP utilizando el metabolito activo de la MPTP (MPP+) disminuyó la actividad de la MAO-B y la peroxidación de lípidos, impidiendo el daño celular generado por el metabolito de la neurotoxina (Rojas et al., 2004). Adicionalmente empleando un postratamiento con EGb761 se observó un aumento en la actividad de TH así como una recuperación de dopamina en el estriado, demostrando así el efecto neurorestaurador de este fitofármaco (Rojas et al., 2008). Este efecto neurorestaurador se estudio en un modelo experimental de la EP, utilizando la neurotixina MPTP, uno de los mejores modelos para el estudio de esta enfermedad.

2.4. Modelos experimentales en animales de EP

Una gran parte de nuestro conocimiento sobre los mecanismos fisiopatológicos de la EP ha dependido en gran medida de la utilización de modelos animales. En los últimos años han surgido modelos inducidos por toxinas, procesos inflamatorios y manipulación genética (figura 5). Estos modelos animales han ayudado a identificar nuevos blancos para el desarrollo y entendimiento de nuevas terapias. Entre los modelos más utilizados se encuentran los que emplean el uso de toxinas que producen una pérdida de las neuronas de la SN (Meredith et al., 2008).



TRENDS in Pharmacological Sciences

Figura 5. Mecanismo de acción de varias toxinas empleadas en el modelo de la EP (tomada de Cicchetti, 2009).

2.4.1 6- Hidroxidopamina (6-HODA)

La neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-HODA) tiene una estructura análoga a las catecolaminas (dopamina y noradrenalina), como lo muestra la figura 6, de tal manera que ejerce un efecto tóxico en las neuronas catecolaminérgicas (Blandini et al., 2008).

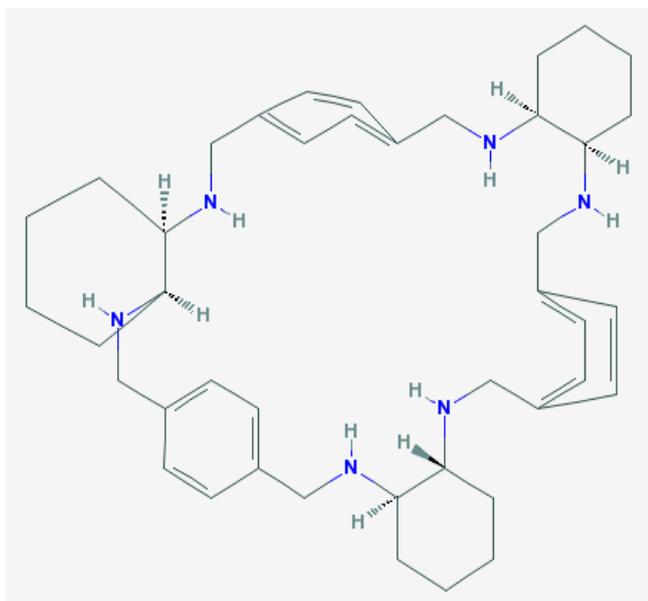


Figura 6. Estructura química de la 6-HODA (tomada de NCBI PubChem compound).

Esta toxina no tiene la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica, siendo necesaria su administración directa dentro de SNpc, cuerpo estriado o estriado (Betarbet et al., 2002). La magnitud de la lesión de 6-HODA depende de la cantidad inyectada, el sitio de inyección y la diferencia en la susceptibilidad entre especies animales (Meredith et al., 2008).

El daño neural inducido por la 6-HODA es principalmente debido al masivo estrés oxidativo causado por el incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS), generando daño mitocondrial y la disminución en la actividad de enzimas antioxidantes como glutatión (GSH) y superóxido dismutasa (SOD) (Simola et al., 2007).

Las ventajas de este modelo son: 1. manejo de diferentes animales para este modelo biológico (ratones, ratas, gatos y monos), aunque se aplica más en ratas. 2. Se tiene una buena caracterización para el uso de modelos en discinesias (Terzioglu et al., 2008). 3. La flexibilidad, es una ventaja típica del

modelo utilizando la neurotoxina 6-HODA; las lesiones totales o parciales, se desarrollan con diferentes perfiles temporales, pueden ser obtenidas y exploradas para diversas propuestas científicas, incluyendo la investigación de mecanismos patógenos y aspectos patofisiológicos de la EP, así como la prueba de acercamientos terapéuticos innovadores (Simola et al., 2007; Blandini et al., 2008).

La principal desventaja de este modelo es que la 6-HODA administrada por vía sistémica induce la reducción en los niveles noradrenérgicos, y consecuentemente genera alteración en ciertos órganos autónomos, incluyendo corazón, vasos, riñones y tracto gastrointestinal. Además, este compuesto no atraviesa la barrera hematoencefálica, requiriendo una administración intracerebral, incrementando así la variabilidad del modelo. Adicionalmente, se presenta una rápida neurodegeneración masiva (Terzioglu et al., 2008). De igual forma no reproducen muchas de las características neuropatológicas de la EP que se observan en el humano, por esta razón no se considera un modelo apropiado para el estudio de los mecanismos moleculares de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Simola et al., 2007).

2.4.2 Paraquat (PQ)

El herbicida PQ (1,1-dimetil-4,4-bipiridina) es un agente reductor que participa en la formación de ROS e induce toxicidad en el sistema dopaminérgico nigroestriatal (figura 7) (Meredith et al., 2008; Sy et al., 2009). La estructura química del PQ es similar al ión N-metil-4-fenilpiridina (MPP+), el metabolito activo de la neurotoxina MPTP, compuesto cíclico redox que es capaz de inducir daño mitocondrial, incrementando la producción de ROS y estrés oxidativo (Sy et al., 2009). El mecanismo de toxicidad del PQ es la generación de ROS, causando peroxidación de lípidos promoviendo así la muerte celular por apoptosis generado por estrés oxidativo. Además disminuye la actividad de enzimas antioxidantes, como son glutatión peroxidasa (GSH-PX) y SOD en la SN (Kanga et al., 2009).

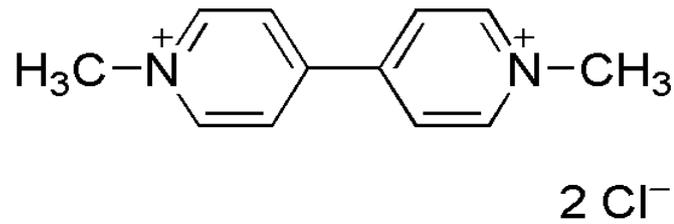


Figura 7. Estructura química del Paraquat (tomada de NCBI PubChem compound).

Se ha mostrado que inyecciones sistemáticas en el ratón, causa disminución de las neuronas dopaminérgicas de la SN dependiente de la dosis, así como disminución en la inervación dopaminérgica estriatal, seguido de una reducción de movimientos ambulatorios (Betarbet et al., 2002). La administración del PQ por vía intraperitoneal ha mostrado una disminución del número de neuronas TH positivas en el sistema nervioso, que corresponde a la muerte de neuronas dopaminérgicas (Winnik et al., 2009).

Las ventajas del uso de PQ es que al ser un pesticida ampliamente usado, este se encuentra presente en el ambiente. Además, el tratamiento crónico de éste compuesto proporciona una mejor representación de la patología asociada a la EP, como es la presencia de α -sinucleína (Drechsel et al., 2008). Se ha visto que el PQ al ser combinado con maneab (coadyuvante) es más efectivo para disminuir la dopamina (Meredith et al., 2008). Sin embargo la desventaja de emplear la toxina PQ es que afecta al organismo en general, particularmente a los pulmones, el Corazón, el hígado, los riñones y también el cerebro. Así mismo datos experimentales sugieren que el PQ por sí solo genera muy pocos efectos en las neuronas dopaminérgicas, presentándose inconsistencia en la pérdida de Dopamina (Terzioglu et al., 2008).

2.4.3 Rotenona

El pesticida rotenona, es un compuesto extraído de la planta Derris, es una sustancia con una gran lipofilicidad, cruza fácilmente la membrana celular y no necesita del transportador de dopamina para acceder a las neuronas dopaminérgicas (figura 8). Algunos reportes indican que este compuesto es selectivo para la degeneración de neuronas dopaminérgicas. La rotenona actúa

inhibiendo al complejo I mitocondrial de la cadena respiratoria, generando disturbios en la energía celular para el metabolismo y generando radicales libres (Meredith et al., 2008; Moldzio et al., 2008).

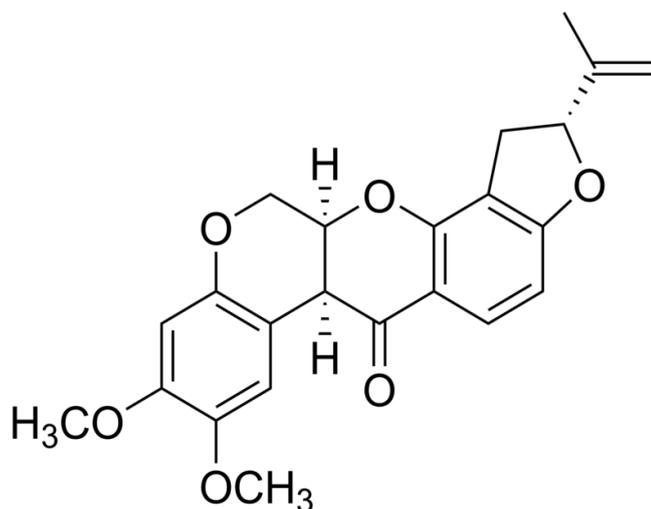


Figura 8. Estructura química de la Rotenona (tomada de de NCBI PubChem compound).

La rotenona tiene estructura similar al ión neurotóxico MPP⁺. Produce deficiencias motoras incluyendo hipocinesia, rigidez postural, movimientos en reposo y tremor. La acción de la rotenona en el modelo de la EP es variable de acuerdo al sitio de aplicación, la dosis y el tiempo en que se aplica. Reportes previos muestran que la rotenona al ser administrada vía intravenosa genera lesión específica de las neuronas dopaminérgicas, acompañada por la presencia de agregados como la α -sinucleína y la poliubiquitina, remanentes encontrados en las neuronas dopaminérgicas nigral (Meredith et al., 2008; Drechsel et al., 2008).

Así mismo la rotenona aumenta la mortalidad debido a que existe una afectación sistémica generando problemas cardiacos, estomacales y hepáticos. Esto indica que la rotenona no es específica para lesiones en el SNC. Actualmente se ha reportado que no reproduce la patología de la EP en su totalidad, aunque genera cambios patológicos típicamente del parkinsonismo, como por ejemplo la degeneración estriatal por la pérdida de las neuronas de la SN (Cicchetti et al., 2009).

2.4.4 MPTP

El 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) es un compuesto secundario que se sintetiza del análogo de la síntesis de la miperidina, molécula sencilla altamente soluble, volátil y de bajo peso molecular, es considerada como una sustancia química que causa una lesión neurotóxica específica (figura 9). Éste es ampliamente usado en modelos experimentales de la EP.

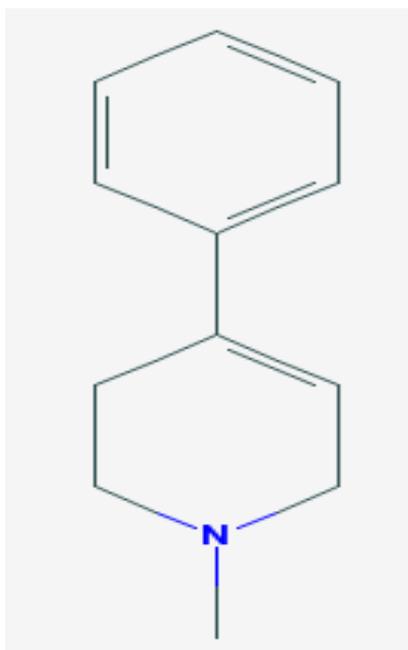


Figura 9. Estructura química del MPTP (tomada de Amit, 2004).

2.4.4.1 Medidas de seguridad para su uso

La MPTP es una molécula que por su volatilidad puede evaporarse a temperatura ambiente y absorberse por inhalación. Para manipular la neurotoxina se debe utilizar campana, dobles guantes de nitrilo, respirador de cara completa con filtros de aire HEPA, lentes de protección para los ojos y equipo de protección personal (PPE). El PPE consiste en una prenda de una pieza con una capucha, muñecas elastizadas y botas, las cuales se elaboran de un material químico y biológicamente inerte, no absorbente y ofrece protección a las partículas presentes en el aire. Esta prenda es fácil de conseguir y económica, después de su uso debe ser incinerada. El MPTP no metabolizado podría ser excretado en la orina, heces, pelo, o durante el

proceso respiratorio; por ese motivo los ratones deben de mantenerse en jaulas y en lugares aislados, las personas que tengan contacto con animales que hayan recibido la neurotoxina MPTP, hasta después de 48 horas, deben de usar la misma protección. Cualquier exposición a la neurotoxina podría causar parkinsonismo. La limpieza para inactivar el efecto de la neurotoxina debe realizarse cuidadosamente con cloro al 1% durante 10 minutos, para su posterior lavado con detergente (en el caso del respirador). El material usado para remover posibles residuos de la neurotoxina deben ser arrojadas a los contenedores de residuos peligrosos. Todos estos cuidados son importantes debido a que el hombre es más susceptible a los efectos tóxicos del MPTP que los ratones (Przedborski et al., 2001; Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE.UU).

2.4.4.2 Mecanismo de acción del MPTP

La neurotoxina MPTP después de su administración sistémica atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica por ser altamente lipofílica. Una vez en el cerebro la neurotoxina MPTP se metaboliza generando su intermediario 1-metil-4-fenil-2,3-dihidroxipiridinium (MPDP⁺) por la enzima MAO-B, enzima mitocondrial externa, que se encuentra en las células gliales. Posteriormente (probablemente por la oxidación espontánea) se reduce a 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺), que es el compuesto tóxico activo (figura 10). El ión MPP⁺ es altamente polar, por este motivo no puede entrar libremente en las células, dependen de los transportadores de la membrana plasmática para acceder a las neuronas dopaminérgicas; así mismo el ión MPP⁺ tiene una alta afinidad por el VMAT2 de dopamina, así como por los transportadores de serotonina y norepinefrina (Smeyne et al., 2005).



Figura 10. Síntesis del MPTP por la enzima MAO-B (tomada de Amit, 2004).

EL MPP⁺ entra en la mitocondria por difusión a través de la membrana mitocondrial interna, éste es impulsado activamente por el gradiente eléctrico de la membrana. Una vez en la mitocondria el MPP⁺ inhibe la respiración celular a través del bloqueo del transporte de electrones por la enzima NADH: ubiquinona óxido-reductasa (complejo I). El bloqueo de este complejo da lugar a una reducción de ATP en células. El MPP⁺ puede interferir también directamente inhibiendo complejos III (ubiquinol:ferrocitocromo óxidoreductasa c) y IV (ferrocitocromo c: óxidoreductasa oxígeno o citocromo c oxidasa) de la cadena de transporte de electrones. La pérdida de energía a través de estas vías tiene varias consecuencias, incluidas la generación de ROS que se reorganizan para generar peróxido de hidrógeno, además la catálisis conduce a la formación de radicales hidroxilo (figura 11). Debido a estos daños en los complejos mitocondriales puede relacionarse su efecto con la etiología de la EP (Lewis et al., 2006). Esto se debe a que se alteran las concentraciones intra y extracelular de calcio, potasio y sodio, generando apoptosis o necrosis (Przedborski et al., 2003).

El efecto tóxico del MPTP en el sistema dopaminérgico depende de la dosis, el intervalo de dosificación, especie de los animales, la edad, vía de administración e incluso el origen de los ratones utilizados (Furuya et al., 2004).

2.4.4.3 Tipos de esquemas de administración.

En los ratones existen 4 esquemas de administración de la neurotoxina MPTP:

- La administración aguda se divide en: Agudo con baja dosis de MPTP (1dosis X 10-20mg/Kg), y agudo con dosis de intermedia MPTP (4 dosis X20mg/kg, en intervalos de 2h). La administración aguda del MPTP en un día produce el 80% de la disminución en los niveles de dopamina en el estriado; sin embargo se genera una alta mortandad en los modelos biológicos (Gibran et al., 2009).

-Tratamiento sub-agudo: 1-2 inyecciones diarias de MPTP (20-30mg/Kg) por 5 días. La administración sub-aguda disminuye la mortalidad, al mismo tiempo que se produce 42% de depleción en la dopamina estriatal (Przedborski et al., 2003; Schneider et al., 2008).

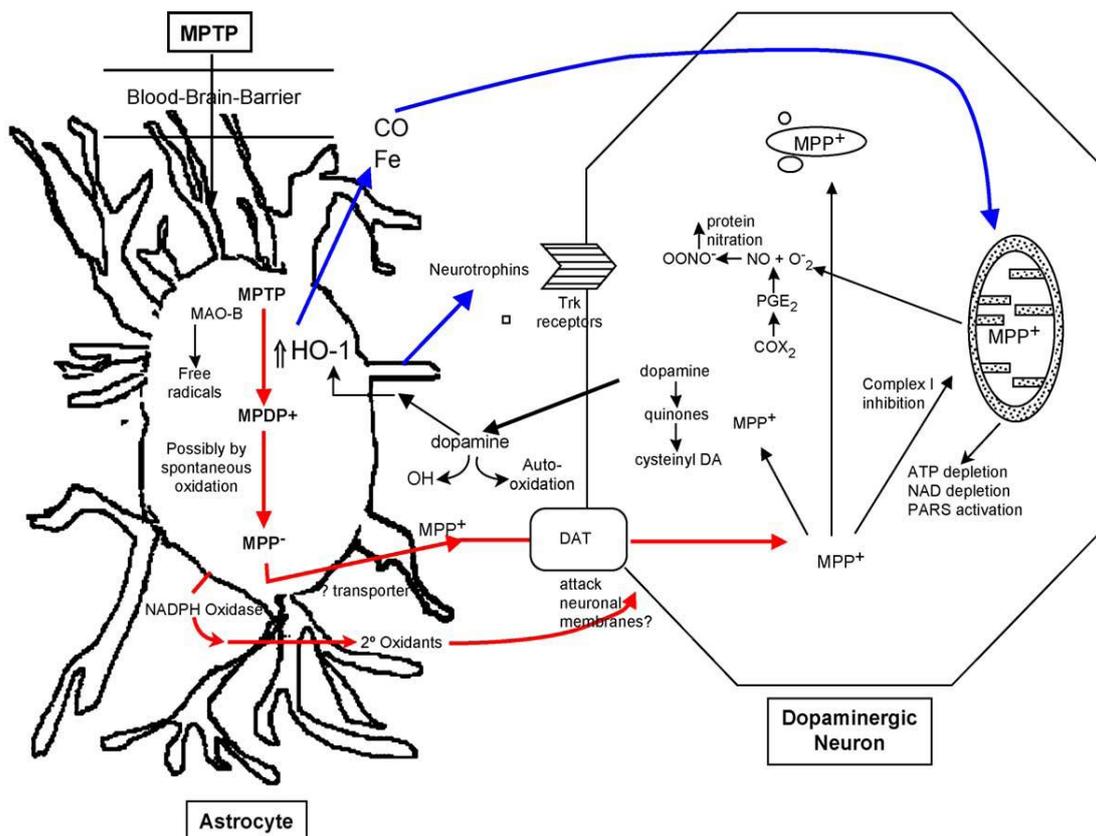


Figura 11. Representación esquemática del mecanismo de acción del MPTP en el sistema nigroestriatal. Imagen tomada de Smeyne Richard ,2005.

-Tratamiento crónico empleando MPTP combina la inyección sistémica del MPTP y un coadyuvante como probenecid, reportándose una severa depleción de dopamina estriatal (aproximadamente el 70%, medida en HPLC) y la pérdida de células nigrales(>60%). El probenecid aumenta el efecto del MPTP al inhibir la excreción del MPTP por vía urinaria (Miller et al., 2004; Gibran et al., 2009).

2.4.4.4 Efecto dependiente de las vía de administración del MPTP

Las vías de administración juegan un rol importante en el efecto de la neurotoxina MPTP, su uso depende del efecto que se requiera, así mismo del tiempo en que esta ejerza su acción. La administración del MPTP puede ser: intramuscular, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intraperitoneal e inyección intra cerebro ventricular

La administración de la solución en animales depende de la especie: intramuscular (i.m) gatos y monos; intravenoso (i.v) monos y ratones; inyección subcutánea (s.c) en ratones; administración intra cerebro ventricular (i.c.v) monos y ratones; y administración intraperitoneal (i.p) ratones.

La administración por la vía i.p es mas segura para el investigador que otro tipo de vías, además de que el daño producido es progresivo como se observa en pacientes que padecen la EP, este efecto no se observa con otro tipo de tratamientos (Przedborski et al., 2001).

2.4.4.5 Efectos de la MPTP en diferentes especies animales.

Se ha observado que el efecto de la neurotoxina MPTP difiere en cada especie. Las ratas son resistentes al efecto de la neurotoxina, por consiguiente es difícil reproducir la toxicidad en el SN, a diferencia de otras especies (ratones y monos). En monos bajas dosis de MPTP genera procesos neurodegenerativos, así como síndrome parkinsoniano. Mientras que los ratones son mucho menos sensibles que los monos, así mismo un aumento en la dosis de MPTP es requerida para producir daño significativo en la SNpc, el daño dependerá de la dosis y tiempo de dosificación. En perros y anfibios se ha observado una mayor vulnerabilidad (Przedborski et al., 2001). En el humano dosis muy bajas genera un irreversible y severo síndrome parkinsoniano.

2.4.4.6 Efectos de la MPTP relacionados a la edad.

Se ha observado en monos y ratones que la susceptibilidad al MPTP aumenta con la edad. En un estudio en monos de edad de 5-9 años se observó que se requiere una dosis triple de MPTP para generar un cuadro similar a la EP, que en animales de 20-30 años, en donde se requieren dosis menores para generar una respuesta al daño. Esto mismo se ha observado en diversos modelos experimentales usando la MPTP en ratones.

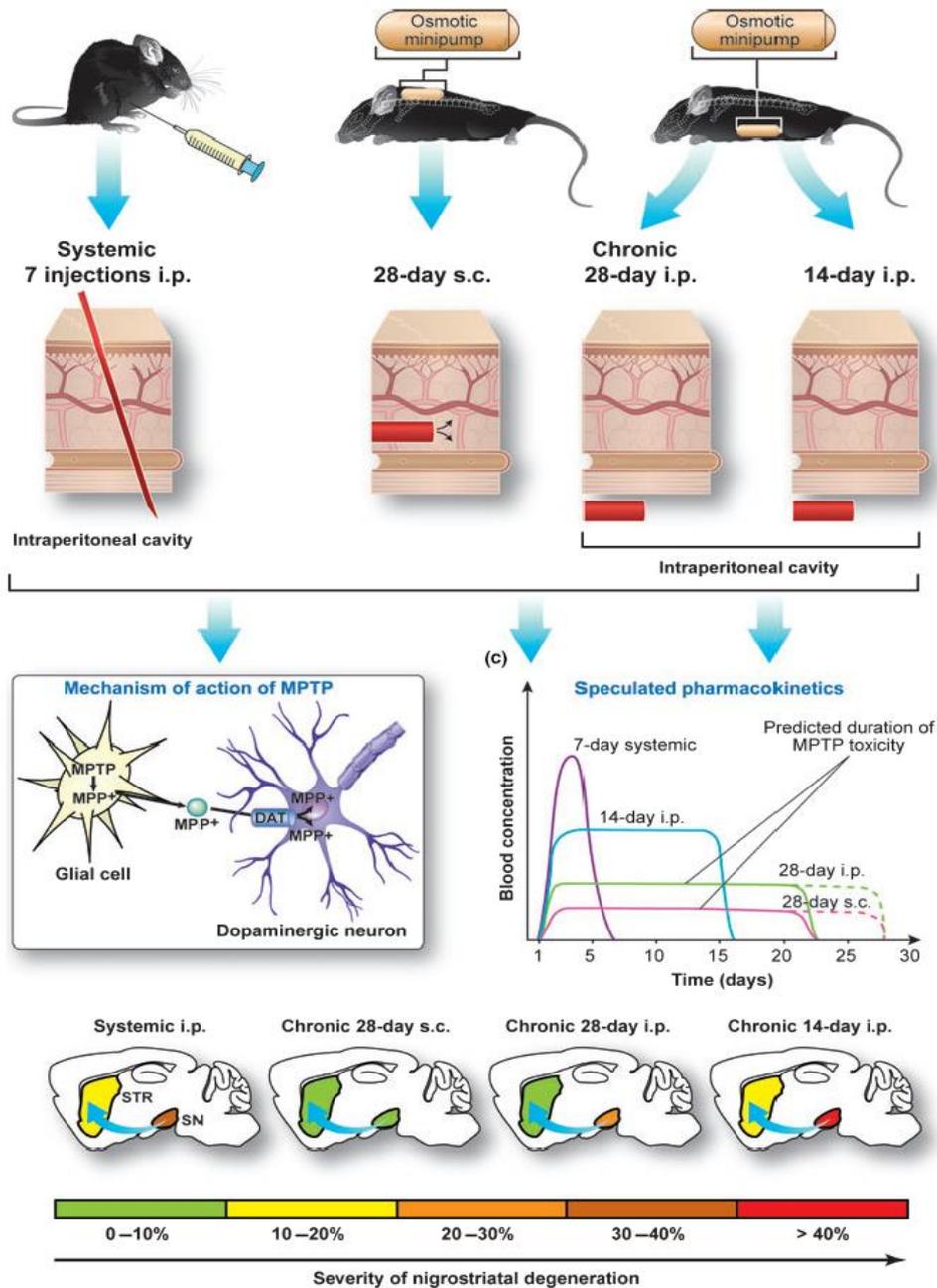


Figura 12. Vías de administración del MPTP y duración del tiempo de administración en un modelo experimental de la EP. Imagen tomada de Claire Gibran, 2009.

Diversas líneas de investigación sugieren que el sitio primario de daño en el modelo de la EP utilizando la neurotoxina MPTP son las terminales nerviosas de la SNpc en el estriado. El acontecimiento inicial es daño de las terminales sinápticas en el estriado, seguido por la degeneración retrógrada y la muerte celular. Este mecanismo es particularmente relevante para la toxicidad de MPTP a través de su metabolito activo MPP⁺, que se acumula selectivamente en terminales nerviosas del estriado, vía la absorción a través del transportador de la dopamina (Furuya et al., 2004).

2.4.4.7 Ventajas del modelo experimental

Esta neurotoxina produce múltiples síntomas clínicos que son similares a los que se presentan en la EP en humanos, e induce una pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas. Este efecto se presenta por un aumento en el estrés oxidativo y reducción de ATP generada por radicales libres (Bohlen et al., 2005).

La MPTP es el mejor modelo para estudiar la EP debido a tres razones; en primer lugar el MPTP es la única neurotoxina dopaminérgica capaz de causar un cuadro clínico en los seres humanos y el mono semejante a la EP; en segundo lugar, no requiere de cirugía de animales vivos como la toxina 6-HODA; y tres el MPTP produce una fiable y reproducible lesión de la vía dopaminérgica nigroestriada después de su administración sistémica, esto no suele ser el caso de otras toxinas.

Así mismo este modelo parece tener beneficios en el desarrollo de estrategias en la neuroprotección de la EP (Schneider et al., 2008).

2.4.4.8 Desventajas en el modelo

La administración del MPTP puede generar dos distintas formas de muerte celular, esto puede ser una ventaja o desventaja del modelo, dependiendo de cómo se esté usando (Anderson et al., 2006).

Su alta neurotoxicidad que genera en el humano en dosis bajas. La presencia de inclusiones citoplasmáticas son raras (Betarbet et al., 2002).

2.4.4.9 Efecto del MPTP en la expresión de genes

El MPTP induce una cascada de eventos génicos relacionados con el estrés oxidativo, que incluyen alteraciones en la expresión de genes implicados en procesos inflamatorios (iNOS, Citotoxinas citoquinas, IL-1, IL-10), en el estrés oxidativo (A 170, NADPDH, citocromo P450), transducción de señales (NF- κ B), toxicidad glutamatérgica, genes implicados en la regulación del ciclo celular (ciclina B2), genes relacionados con factores de transcripción (AP-1, PKC) y genes relacionados con factores neurotróficos (BDNF y GDNF) (Pattarini et al., 2008). La mayoría de los estudios realizados han mostrado que la neurotoxina MPTP genera cambios en la expresión de genes en la SN y el estriado (Xu et al., 2005; Pattarini et al., 2008).

En un estudio realizado administrando MPTP a una dosis sub-aguda (24mg/kg durante 5 días, s.c) se observó un incremento en genes relacionados con el estrés oxidativo. El incremento de ROS producido por el MPTP podría explicar el aumento en la expresión de genes sensibles al estrés oxidativo como: IL-1b, IL-6 e IL-7, generando neurodegeneración por inflamación (Mandel et al., 2002). En este mismo estudio se observó un aumento en la expresión de genes que codifican factores neurotróficos como son GDNF y BDNF, que intervienen en la protección neuronal, recuperación, plasticidad neuronal entre muchas otras acciones. Este incremento refleja un mecanismo compensatorio para la estimulación de la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, debido a que BDNF evita la muerte de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, así mismo se observa que BDNF protege a estas neuronas contra la neurotoxicidad generada por la neurotoxina MPTP (Mandel et al., 2002; Zhao et al., 2010).

Se ha demostrado que el daño inducido por la neurotoxina MPTP depende de la dosis por día, la duración del tratamiento y la vía de administración. En un estudio realizado se demostró que una dosis crónica de MPTP vía i.p durante 14 días, produce características patológicas semejantes a la EP en humanos, generando muerte neuronal progresiva, disminución de la expresión del gen *Nurr1* y en última instancia la formación de inclusiones α -sinucleína (Gibran et al., 2009).

Así mismo se demostró que este modelo presenta cambios en la expresión de genes que regulan la pro-apoptosis como *Bax* (apoptótico) y *Bcl-*

2 (anti-apoptótico), a una dosis sub-aguda (30mg/kg 5 días, vía i.p). Se observaron cambios en la expresión de genes apoptóticos dependiente del tiempo en que se realiza el estudio. Observándose que después de la última administración de la neurotoxina (0, 2, 4, 7, 21 y 42 días), la expresión de *Bax* y *Bcl2* variaba, mostrando un aumento en la expresión el día 4 y posteriormente una disminución (Vila et al., 2001).

Se ha reportado que el empleo de la MPTP, en dosis agudas, a diferentes tiempos de tratamiento (1 días y 7 días), por vía i.p y en distinta región cerebral (SNpc y estriado) disminuye la expresión de genes relacionados con la cascada dopaminérgica, como: Tirosina Hidroxilasa (*Th*), Transportador de dopamina (*Dat*) y transportador vesicular de monoaminas (*Vmat*). De igual forma se observó un aumento en la expresión del gen α -*sinucleína*, que está involucrado con la cascada de eventos relacionados con la muerte celular y en la EP (Kûhn et al., 2003; Xu et al., 2005). Adicionalmente se observó la disminución en la unión de CREB al DNA. Posiblemente porque el MPTP altera la función de CREB causando una disminución en la expresión del gen *Th*, debido a la participación de CREB en la formación específica de complejos proteicos-DNA capaz de regular la expresión de TH (Xu et al., 2005).

La administración aguda de MPTP a una dosis de 50mg/kg vía i.p, generó un efecto campana en el mRNA de *TH*. Este efecto mostró primero una disminución del mRNA (3hr), luego un aumento (6hr) y una disminución (24hr) después de administrar una dosis única de la neurotoxina. Mientras que el tratamiento crónico presentó una disminución constante (3hr, 6hr y 24hr) en los niveles de mRNA de *TH* (Mandel et al., 2002). El mRNA de *TH* y los niveles de proteínas fueron afectados diferencialmente por la administración del MPTP a diferentes intervalos de tiempo. Esta proteína es tan importante que puede tener distintas formas de regulación, incluyendo elementos regulatorios de los glucocorticoides (GRE), la secuencia AP1 (sitio de unión inmediata de Fos/Jun) y CRE (elementos de respuesta cAMP) (Mandel et al., 2002).

Un aumento en la regulación de genes relacionados con las vías dopaminérgicas, así como factores neurotróficos, podrían prevenir el progreso de la EP. Sin embargo emplear una terapia directa con estas moléculas, no es viable debido a la dificultad para ser administradas en regiones específicas del cerebro. Por esa razón es importante la búsqueda de fitofármacos que ayuden

a la restauración de genes relacionados con la cascada dopaminérgica, para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como es el caso de EP. Así mismo el empleo del EGb 761 en el tratamiento de problemas neurosensoriales, desordenes neuropsiquiátricos, enfermedades cerebro vasculares, demencias neurodegenerativas asociadas a la edad y AD, han dado la pauta para explorar el efecto que ejerce el EGb 761 en la expresión de genes relacionados con la cascada dopaminérgica (Su et al., 2009; Zhao et al., 2010).

2.5. EGb 761

El *Gingko biloba* pertenece a la familia botánica de *Ginkgoaceae* con sinónimos como: *Salisburia andiantifolia*, *Salisburia macrophylla*, y *Pterophylla salisburiensis* (Zhou et al., 2003). El árbol del *Gingko* es una de las especies vivas más antiguas del planeta, ha vivido en los bosques por más de 200 millones de años, denominándolo así el “fósil viviente” (Tredici et al., 1989). Es un árbol dioico con órganos reproductivos de hembras y macho en árboles separados (Holt et al., 1997). Tiene un tronco de aproximadamente 7 metros de circunferencia y 30 metros de largo (Zhou et al., 2003). El proceso de polinización en los machos implica los microstrobillos y en las hembras los gametofitos pendulares que parecen óvulos que nacen de los brotes. Estos árboles comienzan a reproducirse después de unos 20 años, tienen una semilla (nueces) con una capa carnosa alrededor (fruta). La capa carnosa exterior de la fruta contiene una cantidad considerable de ácido butanoico y hexanoico que son los responsables del olor a fermentado (Holt et al., 1997).

El nombre proviene del *Gingko* palabra *Sankyo* chino o *yinkuo* que significa una colina de albaricoques o fruta de plata debido a su forma de albaricoque y su fruto maduro de color amarillo (Holt et al., 1997). El término *Gingko* fue utilizado por primera vez por Carlos Linneo y posteriormente por un cirujano alemán Englbart Kaempfer. Tanto las hojas, los frutos y la cáscara de este árbol han estado en uso durante los últimos siglos en la medicina tradicional china (Defeundis et al., 2000). Las semillas (nueces) se han utilizado para el tratamiento de trastornos pulmonares (asma, tos y enuresis), el abuso del alcohol y la inflamación de la vejiga, mientras que las hojas se han utilizado principalmente en el tratamiento de disfunciones del corazón,

pulmones e infecciones en la piel (Foster et al., 1992; Mahadevan et al., 2008). La fruta y las semillas de este árbol son utilizadas en la gastronomía China como un exquisito platillo. Crece en la mayoría de los lugares debido a su resistencia a las plagas, la contaminación y las enfermedades (Mahadevan et al., 2008). Sin embargo no fue sino hace aproximadamente 20 a 30 años que la formulación del extracto estandarizado de la hoja del *Ginkgo*, EGb 761, se formuló en Alemania y ahora es muy utilizado para el tratamiento de enfermedades cognitivas en Estados Unidos.

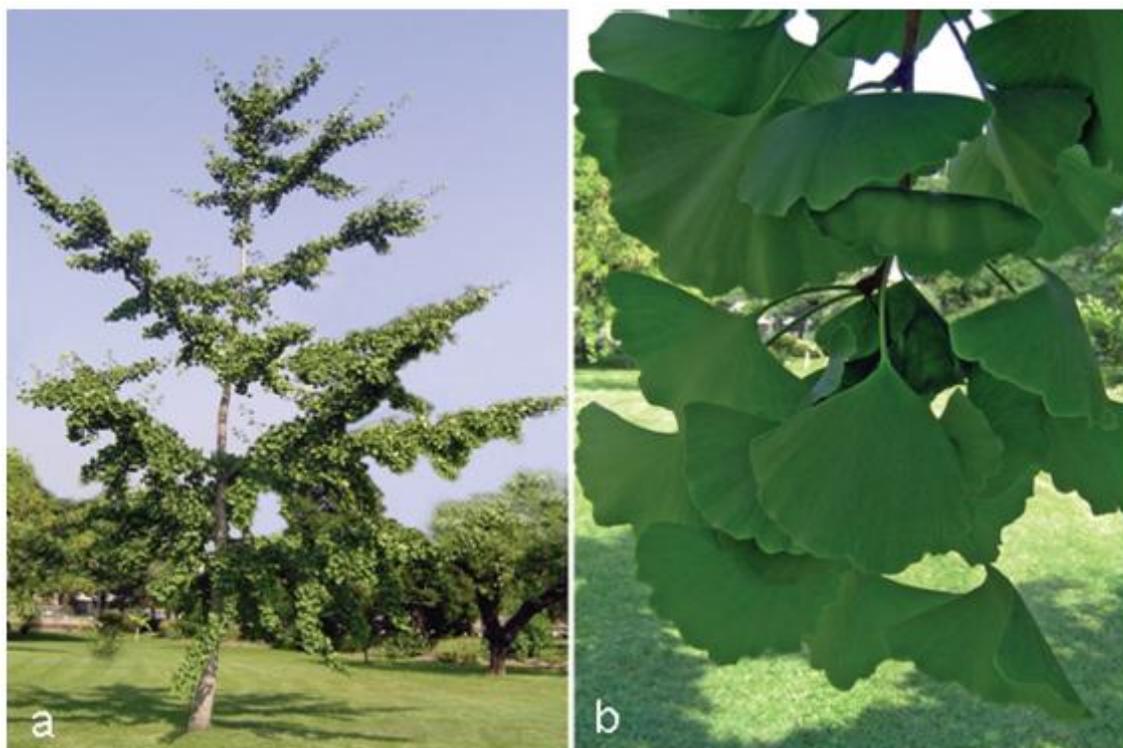


Figura 13. a) Árbol del *Ginkgo biloba* y b) hoja del *Ginkgo biloba* (tomada de Iriti, 2010).

2.5.1 ¿Qué es el EGb 761?

El extracto estandarizado de *Ginkgo biloba* es un fitofármaco que se ha estudiado por sus múltiples propiedades (Defeundis et al., 2002). Su composición esta basada en los componentes polifenólicos con actividad farmacológica de las hojas de *Ginkgo biloba*. La concentración de los compuestos polifenólicos varía de acuerdo al origen, especie y tiempo de cosecha de las hojas. Estos parámetros necesitan ser controlados para lograr una adecuada normalización de la bioactividad del extracto. Normalmente las

hojas se recogen durante el verano y el otoño en los meses de julio y septiembre, cuando aún están verdes. Las hojas secas se analizan para detectar la presencia de contaminantes y sustancias tóxicas tales como metales pesados y aflatoxinas (Mahadevan et al., 2008). El crudo de las hojas secas se extrae mediante mezcla de acetona:agua (35 a 67:1). La normalización del extracto de la hoja de *Ginkgo* se hace mediante la medición de flavonoides y terpenoides. El EGb 761 contiene 24% de flavonoides glucósidos, 6% de terpeno lactosas, y menos de 5ppm de ácido ginkgólico (genera efectos alérgicos) (DeFeundis et al., 2000). Recientemente el método de HPLC es el más usado para evaluar el extracto de la hoja de *Ginkgo biloba* (MacLennan et al., 2002).

El EGb 761 hoy en día es el fitofármaco más prescrito en toda Alemania y uno de los más empleados dentro de los fármacos de libre prescripción en Estados Unidos (Diamond et al., 2000). En 1964 el EGb 761 fue desarrollado en Alemania por una compañía farmacéutica llamada Pharmaceuticals (Karlsruhe, Alemania). Diversas líneas de investigación han atribuido al EGb 761 acciones tales como: ser antagonistas de la activación y agregación plaquetaria, aumentar la circulación sanguínea (atribuido a los ginkgólidos) y reducir el daño por isquemia cerebral (resultado de la acción del bilobárido) (Rammassamy et al., 2006). En el SNC el efecto neuroprotector y neurorestaurador del EGb 761 se debe principalmente a su acción antioxidante, protegiendo así a las neuronas del daño inducido por el estrés oxidativo, generado por distintos tipos de ROS como: el radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (DeFeundis et al., 2000).

Se ha reportado que el EGb 761 protege de la neurotoxicidad inducida por el MPTP en la vía dopaminérgica nigroestriatal, generando un efecto neuroprotector al inhibir la acción de la MAO-B en el cerebro, enzima requerida para la biotransformación del MPTP a MPP^+ (Cicchetti et al., 2009). Así mismo, este fitofármaco protege al estriado de la peroxidación de lípidos inducida por el ión tóxico MPP^+ , protegiendo parcialmente la depleción de dopamina, posiblemente porque actúa como un potente agente antioxidante (Rojas et al., 2001). Esta acción antioxidante se debe a su acción atrapadora de radicales libre (DeFeundis et al., 2000).

La amplia evidencia documental sobre los efectos benéficos de este fitofármaco con respecto a sus efectos secundarios menores, propició que el EGb 761 fuera aprobado en el año 1998 por la Comisión E de Alemania (equivalente a la FDA en Norteamérica) para su utilización en el tratamiento sintomatológico de déficit de memoria, concentración y depresión, a partir de patologías orgánicas cerebrales como la enfermedad de Alzheimer (Rammasamy et al., 2006).

2.5.2 Componentes del EGb761

El extracto estandarizado de las hojas del árbol del *Ginkgo biloba* EGb 761 se caracteriza por contener de 22-27% de glucósidos flavonoides, del 5-7% de trilactonas terpelactonas (2.8% a 3.4% de ginkgólidos A, B, C y 2.6% a 3.2% de bilobalide), y ácidos ginkgólidos responsables de generar reacciones alérgicas (figura 14), se encuentran presentes en una concentración <5ppm (DeFeundis et al., 1998).

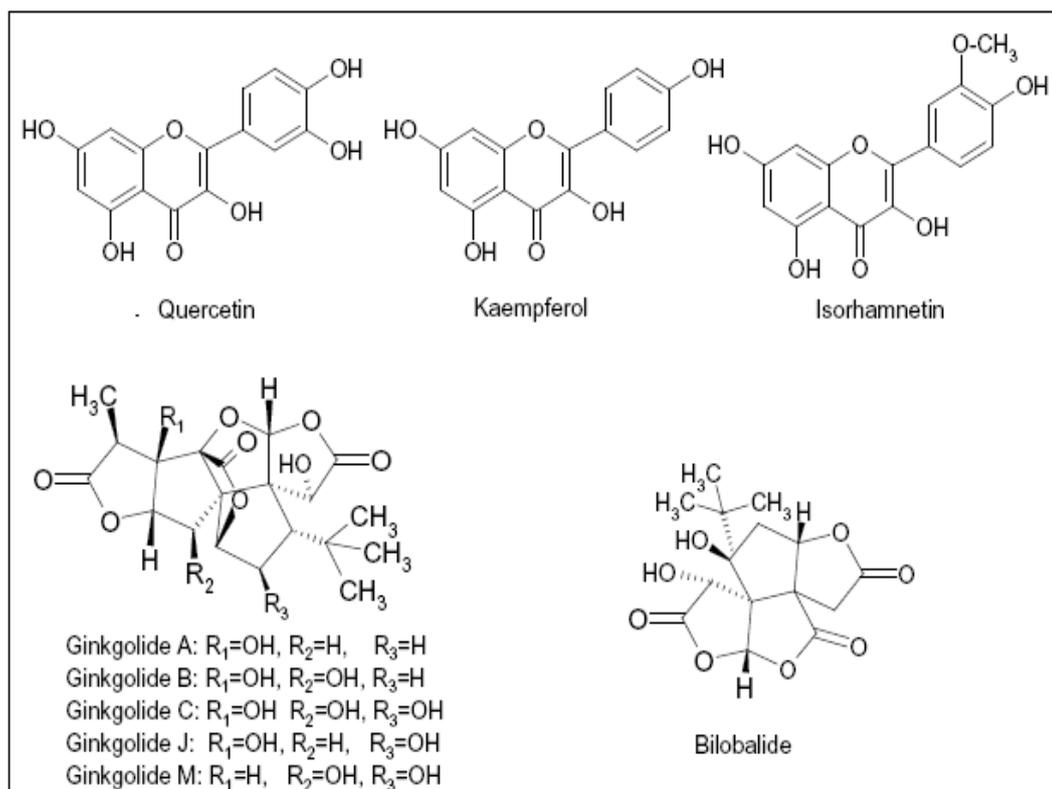


Figura 14. Estructuras químicas que representan a los constituyentes del EGb 761 (tomada de Iriti, 2010).

Los dos principales grupos con actividad farmacológica en el EGb 761 son los flavonoides y los terpenoides (Smith et al., 2004).

Los flavonoides también llamados fenilbenzopironas o fenilcromonas, son un grupo de sustancias de bajo peso molecular, ampliamente usadas en el reino vegetal. Los flavonoides presentes en el EGb 761 son Flavonas, flavonoles, taninos, biflavonas (amentoflavonas, bilobentol, 5-metoxibilobetol, ginkgetin, isoquingetin y ciadopitysin), glucósidos de quercetina y Kaempferol (Mckenna et al., 2001). Estos compuestos actúan como antioxidantes/ atrapador de radicales libres, inhibidor enzimático y como quelante de cationes (DeFeudis et al., 2000). En general los flavonoides tienen una biodisponibilidad baja debido a su mala absorción en el intestino (en su forma glicosilada) y una rápida eliminación. Solo como agliconas pueden ser absorbidos (Goh et al., 2004). Los flavonoides no absorbidos que se encuentran en el colon pueden estar sujetos al metabolismo de las enzimas bacterianas y estos metabolitos pueden ser absorbidos. Una vez absorbidos los flavonoides llegan al hígado donde se metabolizan en sus derivados conjugados (DeFeudis et al., 2000).

El EGb 761 contiene también terpenoides que son lípidos no saponificables del tipo éster cíclico (lactonas). Dos tipos de terpenoides están presentes en este extracto: Ginkgolides y el bilobalides (Smith et al., 2004). Los Ginkgolidos presentes en este extracto se clasifican en 5 tipos: A, B, C, J y M, donde el tipo A, B y C representan el 3.1% del total del extracto de la hoja de Ginkgo. El Bilobalide una trilactona sesquiterpeno, constituye el 2,9% del total del extracto de la hoja de *Ginkgo biloba* (DeFeudis et al., 2000).

La acción polivalente del EGb 761 es responsable de la eficacia en el tratamiento de desórdenes clínicos de origen multifactorial (Smith et al., 2004). Las actividades multifacéticas del EGb 761 de actuar en distintos blancos terapéuticos, es debida a la acción de sus compuestos químicos para generar interacciones sinérgicas, efecto aditivo o incluso generar antagonismo (DeFeudis et al., 2000).

2.5.3 Acción antioxidante

Numerosos estudios mostraron que el EGb 761 contiene compuestos con actividad antioxidante que protegen a la célula de manera efectiva contra el daño producido por estrés oxidativo (DeFeudis et al., 1998). Este extracto puede eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el radical hidroxilo (OH^\cdot), radical peróxido (ROO^\cdot), radical del anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical del óxido nítrico (NO^\cdot), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y especies iónicas de hierro (Mahadevan et al., 2008). Adicionalmente el EGb 761 aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes, como son SOD, GSH-PX, y/o hemo-oxigenasa-1 (Smith et al., 2003).

Los flavonoides (quercetina y kaempferol) y los terpenoides (ginkgolides y bilobalide) que constituyen al EGb 761 aportan diferentes propiedades antioxidantes (Shi et al., 2009). Los flavonoides previenen la peroxidación de lípidos en las membranas particularmente debido a la capacidad de penetrar la membrana lipídica; mientras que los terpenos potencian la acción antioxidante de los flavonoides en el extracto del EGb 761 (Sastre et al., 2002). Por otra parte el bilobalide aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD y catalasa) y mejora la viabilidad celular (Saija et al., 1995). En conjunto estos compuestos pueden actuar directamente como atrapador de radicales libres y especies relacionadas con ROS, o indirectamente disminuyendo la formación de radicales libres, probablemente por que inhiben enzimas que catalizan la generación de radicales libres, o aumentan la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes (Saija et al., 1995). Los radicales libres como ROS se asocian con daño oxidativo que ocurre durante la vejez y este puede ser causado por la exposición a muchos agentes dañinos (Shi et al., 2003). El daño oxidativo puede estar implicado con enfermedades neurológicas asociadas con la edad, desórdenes cardiovasculares, varias formas de cáncer y en muchos otros estados de enfermedad. En la mitocondria el EGb 761 aumenta su acción antioxidante como defensa, previniendo el estrés oxidativo crónico asociado con la edad (Sastre et al., 2002). El tratamiento con EGb 761 proporciona efectos benéficos en enfermedades asociadas con la edad, en especial en las neurológicas (DeFeudis et al., 2003).

Adicionalmente el EGb 761 puede estabilizar el estado redox celular al aumentar la regulación de proteínas y la actividad de enzimas antioxidantes.

Por ejemplo, se ha encontrado que el EGb 761 aumenta la actividad SOD y la CA en el hipocampo de ratas, así como aumentan la actividad de GSH y gamma glutamil sistein sintetasa.

Nuestro grupo de trabajo previamente reporto una curva de dosis respuesta (Rojas et al., 2008) para determinar el efecto neuroprotector del EGb 761 ante la neurotoxicidad del MPTP. Se emplearon 4 grupos de trabajo: los animales del grupo I (salina+salina) y III (salina+EGb761) solo se administraron con solución salina i.p, mientras que los grupos II (MPTP+Salina) y IV(MPTP+EGb761) recibieron EGb 761 vía i.p por 18 días en dosis de 10,40,80, 120mg/kg sacrificando 24 horas después de la última inyección, observándose un mayor efecto neuroprotector del EGb 761 a una dosis de 40mg/kg vía i.p, al aumentar la concentración de dopamina estriatal en un 75% (Rojas et al., 2008).

En un modelo experimental de la EP utilizando la neurotoxina MPTP y postratamiento con EGb 761 nuestro grupo de trabajo demostró que el EGb 761 bloquea la peroxidación de lípidos al ejercer su actividad SOD al bloquear el efecto toxico de la neurotoxina, así mismo se observó que el EGb 761 restaura la concentración de dopamina en el estriado después del daño ocasionado al inyectar la neurotoxina MPTP, también se pudo observar un aumento de los cuerpos neuronales TH positivos en la SNpc y fibras del estriado (Rojas et al., 2008).

2.5.4 Acción anti-apoptótica

La apoptosis puede dispararse por varias condiciones, una de las cuales es el estrés oxidativo. La acción antioxidante del EGb 761 puede contribuir a la prevención de muerte neuronal, particularmente a la producida por apoptosis. (Smith et al., 2003).

La acción anti-apoptótica del EGb 761 es multifactorial y puede actuar sinérgicamente a través de múltiples vías de señalización intracelular involucradas en la apoptosis (Maclennan et al., 2002; Smith et al., 2004). Es posible que el mecanismo anti-apoptótico del EGb 761 pueda ser debido al mantenimiento de la membrana mitocondrial, bloqueando así la formación del apoptosoma y la activación de la apoptosis por la cascada de las caspasas. Este extracto aumenta la transcripción de la proteína anti-apoptotica Bcl-2, que

atenúa la transcripción de la caspasa-12 con actividad pro-apoptótica. Además inactiva la actividad pro-apoptótica de la cinasa c-Jun en el dominio N-terminal (JNK). Inhibiendo el anclaje de c-jun a la caspasa-3 (molécula ejecutora de la apoptosis). El EGb 761 bloquea así la ejecución de la apoptosis. (Smith et al., 2004; Shi et al., 2009).

Evidencias describen que los flavonoides previenen la apoptosis celular inducida por varios oxidantes (Saija et al., 1995; Smith et al., 2003). Recientemente se mostró que el efecto anti-apoptótico de los flavonoides se puede asociar a la modulación de proteínas específicas, centrales en la señalización intracelular de la cascada apoptótica (Wang et al., 2002; Spenser et al., 2003). Se ha propuesto que la quercetina ejerce un efecto anti-apoptótico por la inactivación del peróxido que induce a la vía JNK-c-Jun/AP-1 y regula a las cinasas por señales extracelulares (ERK)-c-fos/AP-1, ambos activadores de la apoptosis (Ishikawa et al., 2000; Spencer et al., 2003).

La fracción terpenoide del EGb 761 puede contribuir también a las propiedades anti-apoptóticas. El Bilobalide, el Ginkgolide B y Ginkgolide J demostraron atenuación de la apoptosis en neuronas de embriones de pollo causada por la deprivación de suero durante 24 horas (Ahlemeyer et al., 1999; DeFeundis et al., 2002). Adicionalmente el bilobalide pudo revertir el daño apoptótico inducido 12 horas después del tratamiento con staurosporina en neuronas de pollo (DeFeundis et al., 2002).

2.5.5 Regulación en la Expresión de genes

La información de un gen determinado se expresa si la secuencia de DNA del gen se transcribe primero en una molécula de mRNA, después de ser editado en el núcleo. La transcripción del gen es el primer mecanismo de regulación en la formación de una proteína.

El efecto del EGb 761 en la regulación de genes puede ser una importante función para la acción neuroprotectora y neurorestauradora en el SNC. De acuerdo a DeFeundis et al., (2002) algunos de los constituyentes del EGb 761 disminuyen la regulación del receptor periférico de benzodiazepinas, resultando en una disminución en los niveles de corticoesterona y posiblemente un efecto anti-estrés. Así mismo se ha observado que el EGb 761 aumenta la regulación de genes que codifican para enzimas antioxidantes, genes que

codifican para citocromo c oxidasa y NADH deshidrogenasa (DeFeudis et al., 2002).

Recientemente se ha encontrado que el extracto del EGb 761 regula la expresión de genes que están involucrados en la defensa celular, reparación, genes sensibles a redox, genes antioxidantes, anti-apoptóticos, genes de factores de crecimiento, genes de canales iónicos, genes de transducción de señales y genes del citoesqueleto (Su et al., 2009).

Estudios realizados en modelos animales han demostrado que el EGb 761 puede disminuir la expresión del gen que codifica para iNOS. Esta acción puede estar mediada por la regulación de la actividad de p38MAPK que es requerida para la expresión de iNOS (Rammassamy et al., 2006).

El análisis en microarreglos de cDNA mostró que la exposición de células cancerígenas al extracto EGb 761 producía una respuesta adaptativa transcripcional, y modulaba la expresión de genes sensible a redox como NF-kb, AP-1 y Nrf-1. Así mismo inhibían cinasas dependientes de ciclinas y topoisomerasa, que controlan la proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Gohil et al., 2002).

Por otra parte en la corteza y el hipocampo de ratones suplementados con EGb 761 (vía oral), se observó un aumento en la regulación de genes que codifican para prolactina, proteína transportadora de la Tirosina (Ttr) y hormona de crecimiento, en la corteza cerebral (Augustin et al., 2009). De igual forma el EGb 761 aumento la regulación de genes que codifican proteínas de canales iónicos (Gohil et al., 2002).

EGb 761 altera las vías que se asocian con la función neuronal en el cerebro, especialmente en la corteza. Más aun muchos de los receptores aminos aumentan su regulación por el EGb 761 (Su et al., 2009).

El EGb 761 regula la regeneración de axones y redes neuronales durante el desarrollo del sistema nervioso. A largo plazo se cree que participa en la plasticidad neuronal, como el aprendizaje y la memoria (Bridi et al., 2001; Kim et al., 2004; Miyamoto et al., 2006).

2.5.5.1 Regulación de Factores de transcripción

La transcripción de la información genética por el DNA a mRNA se genera por la regulación de la interacción entre los factores de transcripción y la región promotora de los genes. Los factores de transcripción son proteínas que coordinan y regulan la expresión de un gen o un grupo de genes, interaccionando con regiones específicas en el DNA, con elementos de la maquinaria de transcripción como la RNA polimerasa, con otros factores de transcripción o con moléculas que activan o inhiben su actividad. Este proceso se ve afectado en respuesta a varios estímulos, facilitando la activación de los factores de transcripción para la formación del complejo de pre-iniciación y la promoción de la transcripción de genes adyacentes.

Se ha sugerido que el EGb 761 regula la actividad de algunos factores de transcripción, entre los que se encuentra: proteína que interacciona al elemento de respuesta del cAMP (CREB), MAPKs, NF-KB, AP-1 y proteína purinérgica α (Pur- α) (Mizuno et al., 1996; Watanabe et al., 2001; Ramassamy et al., 2006).

Estudios realizados han mostrado que el EGb 761 aumenta la actividad del factor de transcripción CREB, generando un aumento en la regulación de Bcl-2 en las células neuronales. El mecanismo de acción del EGb 761 en el aumento de la regulación de CREB no es bien conocido, pero se cree que está asociada con un aumento en la fosforilación de CREB. El aumento en la actividad de este factor de transcripción conlleva a la neurogénesis en células neuronales del hipocampo en el adulto (Ramassamy et al., 2007).

La activación de MAPKs y el factor de transcripción sensible a redox NF-KB y AP-1 representan una serie de eventos en la transducción de señales y la expresión de genes. El EGb 761 regula la actividad de los factores de transcripción antes mencionados.

Las ROS pueden activar factores de sensibilidad a redox como las cinasas (PCK), los cuales por señalización activan diferentes factores de transcripción (ejemplos AP-1 y NF-kB). En un estudio realizado por Packer demostró que el EGb 761 modula la expresión de genes relacionados con apoptosis, que son activados por ROS. Estos estudios mostraron que al aumentar la concentración de EGb 761, la activación de AP-1 disminuía. Esto debido a que el EGb 761 bloquea la transducción de señales para activar la

cinasa (PCK), esta cinasa genera una activación directa en AP-1, interfiriendo con la activación de AP-1 (pertenece a la familia c-Fos, c-Jun, ATF y JDP). Demostrando así que la vía de activación de AP-1 se suprime por el EGb761 (Mizuno et al., 1996; Klassen et al., 1995).

Estudios *in vivo* mostraron que el EGb 761 incrementó la expresión del factor de transcripción Pur- α en el hipocampo de ratones. Esta proteína regula una variedad de mRNA expresadas en las células nerviosas, por ejemplo: BC1 (cuyo RNA se distribuye en las dendritas neuronales) así como a la proteína Fe65 precursora del β -amiloide en AD (Watanabe et al., 2001).

2.5.5.2 Enzimas antioxidantes

Existen evidencias que demuestran que un aumento en la generación de ROS contribuye a la patogénesis de EP, observándose mayor peroxidación de lípidos y disminución en la actividad de enzimas antioxidantes como CAT y SOD. El EGb 761 es un potente atrapador de radicales superóxido, en un estudio realizado en ratas tratadas con EGb 761 se observó una disminución en la peroxidación de lípidos y aumento en la actividad de las enzimas CAT y SOD, (Bridi et al., 2001).

Adicionalmente se demostró que el EGb 761 tiene actividad SOD, debido a que favorece la reacción que convierte al radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular; se ha sugerido que este efecto puede deberse a la presencia de un tipo de enzima SOD que contiene hierro en las hojas del *Ginkgo biloba* (Pincemail et al., 1989).

El EGb 761 regula otras enzimas antioxidantes como GPx y Glutación reductasa (Grd), esta evidencia fue demostrada en un modelo de la EP utilizando la neurotoxina MPTP, en donde observaron que el EGb 761 estimula la actividad de la GPx y Grd en ausencia de neurotoxicidad, este aumento en su actividad puede proporcionar protección contra la neurotoxicidad inducida por el MPTP (Rimbach et al., 2003; Rojas et al., 2008).

Debido a efecto de atrapador de radicales superóxido se sugiere que indirectamente el EGb 761 genera una respuesta protectora temprana ante la neurotoxicidad producida por la neurotoxina MPTP, previniendo así el aumento de la SOD-Mn. Así mismo reportes previos, han mostrado que la actividad de

Cu/Zn-SOD y Mn-SOD se regulan de distinta manera por el EGb 761 ante la neurotoxicidad producida por la neurotoxina MPTP (Rojas et al., 2008).

Se demostró que EGb 761 aumenta la regulación de genes que codifican para enzimas antioxidantes, incluyendo hemo oxigenasa-1 y la regulación de la subunidad catalítica gamma glutamil sintetasa. El efecto del EGb 761 de incrementar la expresión de genes de enzimas antioxidantes está regulada por la acción antioxidante del EGb 761 en la inactivación o supresión de radicales libres y ROS, por esta razón el extracto puede reducir el impacto del daño generado por un exceso de ROS, que contribuyen a la iniciación o progreso de desórdenes neurodegenerativos que se asocian con daños al tejido por oxidación (DeFeundis et al., 2002).

2.5.5.3 Proteínas mitocondriales

El DNA mitocondrial (mtDNA) codifica para 13 polipéptidos, cantidad que constituyen las subunidades del citocromo c oxidasa (COX): COX I, COX II, COX III. La actividad de COX y los niveles del mRNA de la subunidad de COX pueden ser considerados como marcadores del metabolismo oxidativo y de la actividad neuronal. El mecanismo molecular del EGb 761 para proteger a las neuronas se ha asociado con una estimulación en la expresión de genes mitocondriales. (DeFeundis et al., 2000).

Estudios realizados han mostrado que el EGb 761 previene la disminución de la actividad del citocromo c oxidasa (COX), el contenido de ATP mitocondrial y el contenido de GSH mitocondrial. Así mismo estudios demuestran que el EGb 761 aumenta la regulación en la expresión del gen mitocondrial NADH deshidrogenasa, y disminuye la generación de ROS en la mitocondria (Shi et al., 2009).

Adicionalmente la acción de los flavonoides y los bilobalides que componen el EGb 761 pueden mediar algunos efectos de la función mitocondrial, incrementando un control en la respiración de la mitocondria y la expresión de la subunidad del citocromo oxidasa III codificada en el DNAm (DeFeudis et al., 2000).

2.6. Método de análisis para expresión de genes

Entre las técnicas de mayor importancia utilizadas para el análisis de la expresión génica inducida por el EGb 761 y sus componentes son: Northern Blotting (método que identifica secuencias de mRNA complementarias a un segmento de DNA); inmunotransferencia (identifica proteínas que se unen a anticuerpos específicos); dot-blot (método para detectar una proteína específica o un mRNA); microarreglos (permite determinar decenas de genes por hibridación) y transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR) (DeFeundis et al., 2002).

2.6.1 qRT-PCR

El método de la transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR), se basa en la reacción enzimática de transcriptasa reversa, obteniendo un cDNA (DNA complementario) a partir de una molécula de mRNA. El cDNA obtenido se amplifica mediante la función de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, empleando colorantes fluorescentes que se unen al producto formado. La cuantificación de la cantidad de moléculas de DNA generadas durante la reacción se lleva a cabo en la fase logarítmica, en donde la cantidad de material genético se ha duplicado y la eficiencia de amplificación es cercana al 100%. La generación del producto por la reacción de PCR es detectada en el momento en que se está generando la reacción, por la fluorescencia emitida por los fluoróforos empleados (Kubista et al., 2006).

El criterio de valoración cuantitativa de PCR en tiempo real es el ciclo umbral C_T , que se define como el ciclo del PCR en que la señal fluorescente del colorante reportero cruza arbitrariamente el umbral. Su valor numérico es inversamente proporcional a la cantidad del amplicón en la reacción. Para realizar la cuantificación dentro de la fase logarítmica es necesario definir el umbral de detección de todas las muestras, y así todas las muestras sean comparables entre sí (Peirson et al., 2003).

2.6.2 Fluoróforos empleados en QRT-PCR.

Existen dos métodos de cuantificación por fluorescencia empleados en RT-PCR

Inespecíficos-----SYBR Green

Específicos -----Sonda TaqMan (Van et al., 2008).

2.6.2.1 SYBR Green

El agente intercalante SYBR Green I (figura 15) es un fluorocromo que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen al ADN de doble hélice de manera inespecífica (Kubista et al., 2006; Valasek et al., 2005).

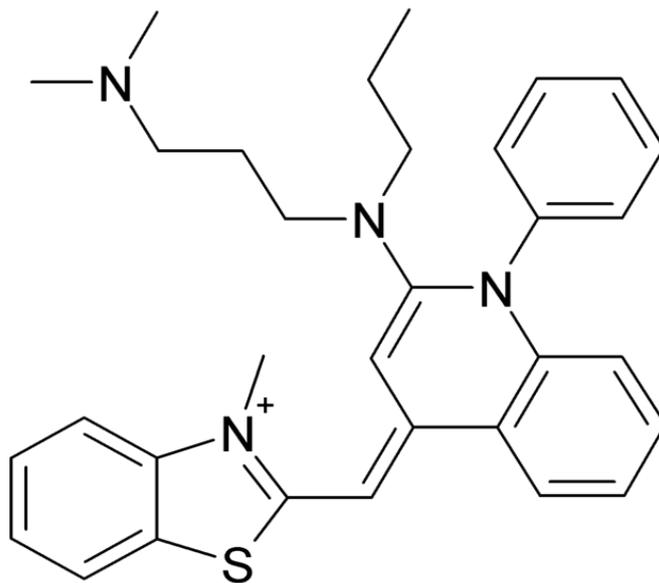


Figura 15. Estructura química del SYBR Green (tomada de tomada de NCBI PubChem compound).

Durante la reacción de PCR con SYBR Green se debe validar el proceso. Este consiste en probar que solo se está generando un producto de amplificación en la reacción y que la fluorescencia registrada corresponde a ese producto en particular y no a productos inespecíficos o dímeros de primer.

Para ello se efectúa un ensayo de disociación, donde se incrementa la temperatura gradualmente hasta 96°C para desnaturalizar las cadenas de DNA

(Bustin et al., 2005) y se registra la intensidad de la fluorescencia durante el proceso. Al llegar a la temperatura de disociación (T_m , el 50% del producto de amplificación se encuentra desnaturalizado) del amplicón la curva de disociación presentará un punto de inflexión a esta temperatura. Si durante la reacción se generaron productos inespecíficos o dímeros de primer, estos tendrán también un pico de disociación, debido a que esta temperatura depende del tamaño y contenido de bases de cada producto en particular (Bustin et al., 2005; Kubista et al., 2006).

Una reacción de PCR en tiempo real utilizando SYBR Green debe presentar un solo pico en la grafica de disociación para garantizar su especificidad (Kubista et al., 2006).

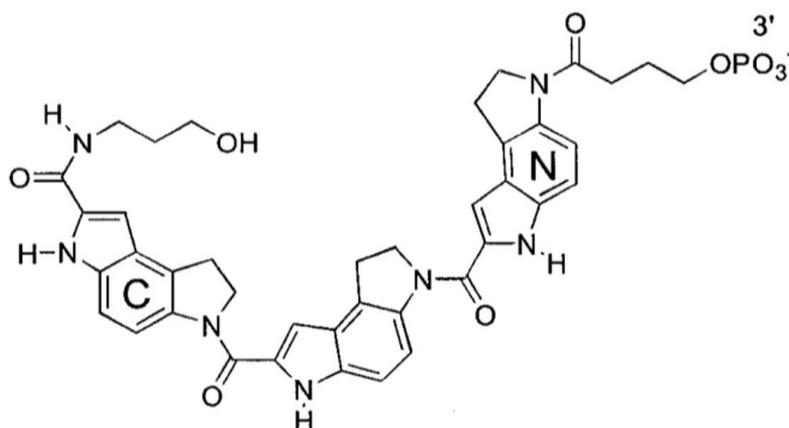
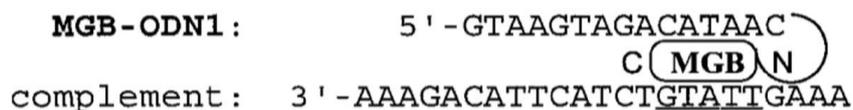
Ventajas y Desventajas

SYBR Green es el reactivo para el análisis de tiempo real más económico, sin embargo requiere una gran cantidad de tiempo y gasto de reactivos durante el proceso de optimización.

2.6.2.2 Sonda TaqMan

Una sonda TaqMan es un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria a la región central del amplicón. Tiene una secuencia de 13-18 nucleótidos que presenta en el extremo 5' una marca fluorescente (reportero) y en el extremo 3' un quécher o apagador. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia FRET (Fluorescent Resonant Energy Transfer), entre las dos moléculas. Este principio consiste en que una molécula de alta energía cercana a una molécula de baja energía (quécher), promueve una transferencia energética y no habrá emisión de fluorescencia. Las sondas TaqMan tienen una T_m mayor que los iniciadores, por tanto durante la etapa de alineación, la primera en unirse a su secuencia específica es la sonda, y posteriormente los iniciadores. De esta forma cuando la DNA polimerasa se une al extremo 3' del primer e inicia la elongación, a su paso se encuentra con la sonda y la degrada dado su actividad exonucleasa 5'-3', generando que el fluoróforo sea liberado y emita la señal de fluorescencia que es captada por el aparato (Bustin et al., 2002).

La incorporación de una molécula MGB (Minor Groove Binder) en el extremo 3' aumenta el Tm de las sondas permitiendo utilizar secuencias más cortas, de 13-20 nucleótidos, con Tms de 65-67 °C, permitiendo así una mejor discriminación (figura 16).



MGB = 3' DPI₃ and N-terminal linker

Figura 16. Minor groove binder unido a una molécula de DNA (tomada de Kutyaev, 2000).

Ventajas y desventajas

La utilización de sondas TaqMan representa muchísimas ventajas en comparación con el SYBR Green, incrementando su especificidad al incorporar un tercer oligonucleótido a la reacción de PCR, de esta forma la fluorescencia registrada corresponde únicamente a la generada por el producto de amplificación, siendo altamente específico. Sin embargo es un reactivo caro, y es necesario un diseño especializado de iniciadores y sonda.

2.6.3 Eficiencia de RT-PCR

Se define como la proporción en la que un amplicón de PCR se está generando, normalmente se expresa con un valor de porcentaje. Si un amplicón dobla la cantidad durante la fase logarítmica de su amplificación por PCR el ensayo se considera que tiene un 100% de eficiencia (Peirson et al., 2003).

La evaluación del rango dinámico para determinar la eficiencia de amplificación y sensibilidad de la técnica se lleva a cabo mediante una curva estándar a partir de una muestra de RNA/cDNA, que es diluida serialmente en órdenes de 10, esta se amplifica por triplicado. La curva estándar de la reacción se representa gráficamente como el diagrama de regresión lineal semi-log del valor de CT versus el log de la concentración del ácido nucleico inicial. Una pendiente de esta gráfica de -3.32 indica una reacción de PCR con 100% eficiencia. Pendientes más negativas que -3.32 (ej. -3.9) indica reacciones que tienen menos del 100% de eficiencia, y pendientes más positivas que -3.32 puede indicar problemas de calidad de la muestra o problemas de pipeteo. La desviación estándar entre los diferentes puntos debe ser menor a 0.2 unidades de Ct (Applied Biosistem., 2004). Este ensayo se debe realizarse al menos una vez por cada experimento de PCR en tiempo real que se deba analizar.

Los parámetros que afectan la eficiencia de PCR son: especificidad de oligonucleótidos y sondas, concentraciones altas de dNTPs, agentes inhibidores como hemoglobina, heparina, IgG, y altas concentraciones de proteína (Bustin et al., 2002).

2.6.4 Ensayos de cuantificación

Dependiendo el tipo de aplicación existen varios métodos de análisis:

Absoluta -----curva estándar

Relativa ----- método de curva estándar relativo y método comparativo Ct (Delta Ct) (Yuan et al., 2006)

2.6.4.1 Cuantificación Absoluta.

El método de cuantificación absoluta, permite determinar el número exacto de moléculas de DNA o RNA presentes en una muestra determinada. Es necesario utilizar una curva de calibración a partir de estándares de concentración finamente conocida (exacta) y determinada por otra técnica, expresando la concentración de la secuencia blanco en número de copias, ng/ μ L o umol/ μ L (Bustin et al., 2005).

Los estándares para la construcción de la curva patrón para cuantificación absoluta deben de cumplir con los siguientes requisitos: DNA o

RNA puro, DNA plasmídico o RNA transcrito in vitro (Yuan et al., 2006). Para la preparación de la curva patrón debe de ejecutarse un pipeteo exacto (disoluciones del estándar de 10^{-6} - 10^{-12}), y mantener la estabilidad de los estándares diluidos. No es posible usar DNA como estándar para una cuantificación de RNA, pues no hay control de RT.

Debido a que en muchos casos estos requisitos no se pueden cumplir, es difícil aplicar en todos los casos un análisis de cuantificación absoluta, por lo tanto siempre que sea posible es preferible utilizar una cuantificación relativa, esta no requiere de tanto control como la cuantificación absoluta (Rutledge et al., 2008).

2.6.4.2 Cuantificación relativa.

En este tipo de cuantificación, es necesario incluir un control endógeno de amplificación, se refiere a la amplificación de un gen blanco diferente, de expresión constitutiva (constante) a partir de la misma muestra de RNA o DNA de cada muestra o tejido (Guenin et al., 2009). Como un control interno generalmente se utilizan genes llamado Housekeeping (genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican proteínas que son esenciales para el funcionamiento general de las células). Entre los más empleados se encuentran: β -actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), rRNA (RNA ribosomal) e hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Expósito-Rodríguez et al., 2008).

El control interno ayuda a normalizar los resultados, asegurando que las variaciones observadas en expresión sean realmente debidas a cambios de expresión (Guenin et al., 2009) y no a la cantidad variable de muestra añadida entre dos ensayos. Esta normalización permite un valor relativo corregido del gen de interés que puede ser comparada entre muestras y nos permite estimar la expresión relativa del gen blanco entre estas muestras.

La comparación cuantitativa del ácido nucleico blanco se expresa en órdenes de magnitud relativas a un calibrador (muestra que se usa como la base para la comparación de los resultados).

2.6.4.2.1 Método de curva estándar relativa

En este método es necesario construir una curva estándar de calibración relativa, en la que no es necesario saber la cantidad precisa de la secuencia blanco de interés, basta con saber la cantidad de DNA/RNA total que se está utilizando. Una vez obtenidos los valores mediante esta técnica, se normaliza con respecto al control endógeno y posteriormente se compara con el calibrador elegido. La normalización se realiza mediante la relación del valor obtenido del gen de interés dividido entre el valor obtenido para el control interno.

La exactitud en la cuantificación de la expresión de genes depende de que la eficiencia en la amplificación del gen de interés y la referencia (control interno) sea similares. Así varios modelos han publicado el uso de diferentes algoritmos para una correcta eficiencia y la demanda para permitir mayor confiabilidad en la relación de la expresión. El método más empleado es el $2^{\Delta\Delta Ct}$ el cual ha mostrado resultados confiables en los procesos experimentales (Bustin et al., 2008)

2.6.4.2.2 Análisis $\Delta\Delta Ct$

En el caso del método $\Delta\Delta Ct$ es necesario validar la medición mediante una curva de rango dinámico. Esta se define como el orden (máximo o mínimo) de la concentración o la cantidad de muestra que el ensayo es capaz de detectar, su sensibilidad. Para realizar el rango dinámico se debe obtener tanto el ΔCt ($Ct_{\text{gen en estudio}} - Ct_{\text{control endógeno}}$) para cada uno de los puntos de una curva estándar (Gibson et al, 1996; Pfaffl et al., 2001; Schmittgen et al., 2008). Este ΔCt se grafica vs Log de la cantidad de RNA de cada uno de los puntos, y la pendiente obtenida debe ser menor o igual a 0.1, esto valida la utilización del método de ΔCt que requiere que la eficiencia de amplificación de ambos genes (control interno y gen blanco) sea la misma (Schmittgen et al., 2008).

Una vez validado este método ya no es necesario efectuar curvas patrón para ensayos posteriores, directamente se aplica la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Giulietti et al., 2001; Schmittgen et al., 2008).

El valor ΔC_T se determina por la resta del valor promedio del C_T_{GAPDH} por el valor del promedio del gen blanco C_T ($\Delta C_T = C_T_{\text{gen de interés}} - C_{T\text{GAPDH}}$) por

cada muestra. El cálculo del $\Delta\Delta C_T$ implica la resta de del valor del calibrador ΔC_T ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T.\text{grupos en tratamiento}} - \Delta C_{T.\text{grupo control}}$). El índice relativo de la expresión de genes se calcula por la formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

2.6.5 Impacto del método.

La gran demanda de un método confiable, reproducible, sensible y altamente específico, para cuantificar el DNA/RNA, marco el surgimiento de los ensayos de PCR en tiempo real. El PCR en tiempo real ha conseguido una amplia aceptación debido a su rapidez, sensibilidad, reproducibilidad y riesgo reducido de contaminación. En esta metodología la fluorescencia generada en cada ciclo de amplificación es detectada por el sistema óptico del equipo, la generación del amplicón se puede observar conforme la amplificación progresa “en tiempo real” (Yuan et al., 2006).

En la actualidad, la combinación de factores ambientales y genéticos ha incrementado la prevalencia de enfermedades neurodegenerativas, una de éstas es la EP caracterizadas por alteraciones motoras y cognitivas, en los últimos años diversas terapias con fitofármacos han sido utilizadas en el tratamiento de alteraciones cognitivas de algunas enfermedades, una de ellas es la administración de extracto estandarizado de *Ginkgo biloba*, que por su acción neuroprotectora y antioxidante, ha demostrado ser útil en el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer. Pese a esto, no hay estudios publicados que demuestren los beneficios de este fármaco en personas con EP. El objetivo de esta tesis fue determinar posibles cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la dopamina en un modelo de la EP utilizando la neurotoxina MPTP. Para ello se diseñó un método experimental utilizando la técnica de qRT-PCR, para cuantificar la expresión de genes en 6 regiones cerebrales como se describe en los siguientes apartados.

2.7. Método experimental

2.7.1 Sujetos experimentales.

Para los estudios “*in vivo*” se emplearon ratones machos de la cepa C57BL/6J. Los animales se mantuvieron de acuerdo a la norma, bajo un ambiente de foto período (ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas), temperatura controlada, (22+/-2 °C), acceso libre de agua y comida (dieta estándar de laboratorio). Los ratones utilizados presentaron una edad de 11-13 semanas y un peso entre 25-30 g. Todos los experimentos se realizaron acorde a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

2.7.2 Diseño experimental

En el experimento se utilizaron 30 ratones en total, estableciendo 4 grupos experimentales los cuales se clasificaron como sigue:

Tratamiento	Número de ratones	Grupos experimentales	Grupo
Salina-Salina	5	I	CONTROL
Salina-EGb761	5	II	CONTROL
MPTP-Salina	10	III	TRATAMIENTO
MPTP-EGb761	10	IV	TRATAMIENTO

2.7.2.1 Administración de MPTP y tratamiento (i.p) con EGb761

Se administró diariamente por vía intraperitoneal MPTP (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) disuelto en solución salina isotónica (0.9%) en una dosis de 30 mg/Kg de peso durante 5 días consecutivos para inducir parkinsonismo. Posteriormente se inicio el postratamiento con EGb761 disuelto en solución salina fisiológica (0.9%) a pH 7.4, en una dosis de 40 mg/kg durante 17 días, 24 horas después de la última administración de MPTP. El extracto de EGb761 fue proporcionada por Schwabe Pharmaceuticals (Karlsruhe, Alemania).

Los ratones de los grupos I y II, inyectados con solución salina (ip), sirvieron como controles. Mientras que el grupo III y IV fueron los grupos a estudiar.

2.7.3 Disección de regiones cerebrales

Al día 18 los animales se sacrificaron por dislocación cervical, 24 horas después de su última dosis de EGb761 o solución salina isotónica (0.9%). Rápidamente y en frío, el cerebro fue cuidadosamente removido y se diseccionaron las siguientes regiones: mesencéfalo, cerebelo, corteza, estriado, hipocampo, hipotálamo; estas fueron inmediatamente pesadas en la balanza analítica Explorer (OHAUS) y almacenadas a -80°C para su conservación y posterior análisis.

En estas regiones se analizó la expresión de genes relacionados con el sistema dopaminérgico mediante transcriptasa reversa acoplada a Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo real (qRT-PCR), para determinar si el EGb761 regula la expresión de genes, produciendo un efecto neurorestaurador contra la neurotoxicidad generada por la neurotoxina MPTP.

Para llevar a cabo este análisis se realizaron los siguientes procedimientos para todas las muestras: extracción de RNA total (concentración, pureza y calidad), reacción de transcriptasa reversa y reacción de qRT-PCR.

2.7.4 Extracción de RNA total

El RNA total fue aislado de cada una de las regiones cerebrales por un método de extracción fenólica de Chomczynski y Sacchi (1987). Éste método se basa en el uso de una solución monobásica (TRIZOL®, Invitrogen) de fenol/isotiocianato de guanidina (agente caotrópico) químico que inhibe y desnaturaliza a las RNAsas. Esta solución mantiene la integridad del RNA durante la lisis celular y permite obtener RNA, DNA y proteínas.

La posibilidad de aislar el RNA total lo más puro posible es fundamental para las subsecuentes reacciones, para ello es necesario que la concentración, pureza e integridad se encuentren dentro de los parámetros establecidos como óptimos (<http://tools.invitrogen.com> accesado 11/11/2010).

2.7.4.1 Determinación de la concentración, pureza e integridad del RNA total.

El RNA se cuantificó aplicando la ley de Lamber Beer, tomando en consideración la Densidad óptica (DO) que equivale a 40 µg/mL de RNA por el una unidad de absorbancia (A) a 260 nm. La concentración y pureza del RNA total se determinó en un espectrofotómetro UV/VIS. Para determinar la concentración del material genético se evaluó la absorbancia a 260nm, obteniendo en la mayoría de las muestras valores que oscilaban entre los 300-400 ng/µl.

Las muestras de RNA deben de estar libres de proteínas, fenol, alcohol y sales. La pureza del RNA puede estimarse a partir de valores estándares, para proteínas el valor óptimo es $A_{260/280} \geq 2.0$ y para compuestos aromáticos el valor óptimo es $A_{230/260} >1.8$. El RNA obtenido de las muestras de tejido cerebral en nuestro estudio presentaron un valor promedio de $A_{260/280}$ 1.8; así como un valor promedio de $A_{230/260} >1.8$.

Para determinar la calidad e integridad del RNA total, se llevó a cabo una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.45% teñido con bromuro de etidíó 0.2 mg/mL, se buscan la presencia de las bandas 18S y 28S del RNA ribosomal que conforma un 80% del RNA total y su calidad es directamente proporcional al mRNA, así como la inexistencia de DNA genómico. La técnica de electroforesis se basa en el desplazamiento, en este caso del RNA total, a través de una matriz porosa; formada por la polimerización de la agarosa, siendo el tamaño del poro determinado por la concentración de agarosa. Al aplicarle la corriente eléctrica a través del gel, los ácidos nucleicos que poseen una carga negativa conferida por los grupos fosfatos, migran hacia el ánodo en condiciones de pH neutro (Maniatis et al., 1989).

Una óptima extracción del RNA total de los tejidos cerebrales con buena concentración, alta pureza y excelente calidad es fundamental para la síntesis de cDNA, por medio de la reacción de transcriptasa reversa.

2.7.5 Reacción de transcriptasa Reversa

Para la reacción de transcriptasa reversa se empleó la enzima del virus de la Leucemia Murina de Moloney (M-MLV RT) recombinante, aislada de una

línea de *E. coli* que expresa el gen viral. Esta enzima es utilizada para transcribir mRNA a cDNA. Esta puede sintetizar un cDNA de hasta 7kb.

El cDNA se sintetizó a partir del RNA total obtenido, a través de la enzima transcriptasa reversa M-MLV, para realizar la conversión del RNA a un tipo de DNA llamado DNA complementario (cDNA); se utilizaron 2 tipos de iniciadores: oligos al azar (Random Primer) 3 µg/µL (Invitrogen) y oligo dT 5µg/µl (In-vitro). Las moléculas de mRNA actúan como molde, mientras que los oligos al azar (random primer) y oliodT actúan como cebador. Además de que se requieren dinucleótidos trifosfatados (dNTP`s) que funcionan como sustratos para la transcriptasa reversa M-MLV 200 u/mL (Invitrogen), resultando una hebra de DNA complementaria o cDNA.

(<http://tools.invitrogen.com> accesado 11/11/2010)

El cDNA obtenido en este paso se empleo para las reacciones de qRT-PCR en tiempo real.

2.7.6 Reacción de Q-RT-PCR

EL PCR en tiempo real se realizó en el Corbbet Rotor Gene 6000, que tiene integrado una lámpara que detecta fluorescencia y un termociclador, este método combina un PCR convencional de ciclos rápidos con la monitorización de la fluorescencia en tiempo real (Pinilla et al., 2008). El software del equipo se encarga de analizar la fluorescencia en tiempo real durante la amplificación. Así mismo el PCR en tiempo real es un método poderoso que estima el número de copias, registrando la fluorescencia adquirida una vez por cada ciclo y posteriormente la cantidad de fluorescencia se expresa en una grafica.

Todas las muestras de todos los grupos se analizaron por triplicado. En este estudio se realizó una cuantificación relativa utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Utilizando como calibrador las muestras del grupo control (Salina + Salina). El control interno para normalizar los resultados fue el gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Para cada ensayo de cada gen se determinó eficiencia de reacción, rango dinámico y cálculos para cuantificación relativa. En la tabla 1 se resumen los genes analizados por RT-PCR, así como las sondas utilizadas para cada uno de ellos.

2.8. Análisis Estadístico

Se realizó el análisis de variancia de una vía (ANOVA), seguido por el análisis de Duncan para determinar la significancia en los cambios de expresión de genes en el modelo de la EP, utilizando la neurotoxina MPTP. Valores de $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$ fueron considerados como estadísticamente significativos. Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc).

Tabla 1. Características de los genes analizados por RT-PCR

GEN	NOMBRE	SECUENCIA	DETECCIÓN	LOCALIZACIÓN
<i>Th</i>	Tirosina hidroxilasa	NM_009377.1	Taqman	11p15.8
<i>Pitx3</i>	Homeobox pituitaria 3	NM_008852.4	Taqman	10q25
<i>Dat</i>	Transportador de dopamina	NM_010020.3	Taqman	5P15
<i>Vmat</i> 2	Transportador vesicular de monoaminas	NM_172523.2	Taqman	10q25.2
<i>GAP</i> <i>DH</i>	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	NM_001479322	Taqman	12p13
<i>Nurr1</i>	Receptor nuclear	NM_013613	Taqman	2q22-23
<i>GAP</i> <i>DH</i>	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	NM_001479322	SAYBER GREEN	12p13
<i>D2r</i>	Receptor de dopamina	NM_010077.2	SAYBER GREEN	11q23
<i>En1</i>	Engreiled	NM_010133.2	SAYBER GREEN	2q23-21

***GAPDH:** (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) es una enzima multifuncional involucrada en metabolismo celular. Posee una baja frecuencia de isoformas o pseudogenes que disminuye la posibilidad de reacción cruzada. Su expresión se ha visto alterada en hipoxia, líneas celulares cancerígenas, en ontogenia y pancreatitis aguda (Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrinol. 2002; 29:23–39).

3. RESULTADOS

Obtención del RNA total de tejido cerebral de ratón

Con el objetivo de determinar la correcta integridad del RNA total de los tejidos cerebrales de ratones tratados y controles para la posterior síntesis del cDNA, se realizó una electroforesis en agarosa. El RNA total obtenido en las muestras cerebrales no mostró contaminación de DNA genómico; así mismo su integridad fue óptima, al mostrar en el gel de agarosa las 2 bandas correspondientes al RNA ribosomal 18S y 28S de manera definida e integra (figura 17).

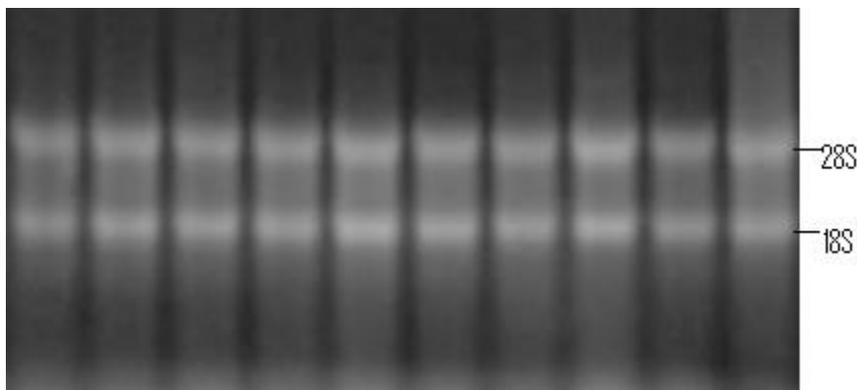


Figura 17. Gel de agarosa teñido con bromuro de elidió, muestra las bandas de RNA ribosómico 18 y 28S.

La cantidad y pureza del RNA total se obtuvo mediante espectrofotometría de luz ultravioleta. La concentración del RNA total en la mayoría de las muestras fue excelente al mostrar valores que oscilaba entre 300-400 $\mu\text{g/mL}$.

Así mismo, la pureza del RNA total fue buena, ésta se determinó a través de los parámetros de absorbancia (A) establecidos para proteínas ($A_{260/280}$) y compuestos aromáticos ($A_{230/260}$). Los valores obtenidos para estos parámetros fueron aproximadamente de 1.8 para $A_{260/280}$ y de 1.8 para $A_{230/260}$, mostrando que la pureza del RNA total obtenido en las muestras de tejido cerebral era óptima para el estudio.

Amplificación por RT-PCR de genes relacionados con las vías dopaminérgicas en un modelo experimental de la EP.

Se utilizó el método RT-PCR en tiempo real para analizar el efecto del EGb 761 en la expresión de genes relacionados con las vías dopaminérgica. Para este estudio se utilizaron 4 tratamientos distintos: grupo I Salina+Salina; Grupo II Salina+EGb 761; Grupo III MPTP+Salina; Grupo IV MPTP+EGb 761.

Para controlar la amplificación de los productos de PCR y normalizar los datos se utilizó como control interno el gen *GAPDH* que es ubicuo y constitutivo.

Se definieron los cambios en la expresión de 7 genes relacionados con las vías dopaminérgicas: *Nurr1*, *Dat*, *Vmat2*, *TH*, *D2r* y *En1*, *Pitx3* en las 6 regiones cerebrales (mesencéfalo, estriado, corteza prefrontal, hipotálamo, hipocampo y cerebelo). Solo en 3 genes se observó un efecto neurorestaurador del EGb 761. *Nurr1* y *En1* factores importantes para el desarrollo embrionario, mantenimiento y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas (Zhang et al., 2009). Mientras que el gen *D2r* que codifica para la proteína del receptor de dopamina D2R, implicada en la modulación motora, el aprendizaje y la memoria (Uziel et al, 2000). Así mismo el EGb 761 mostró una regulación diferencial por región cerebral de los genes en estudio, observándose cambios solo en 2 regiones cerebrales que forman parte de la vía nigroestriatal: mesencéfalo y estriado.

Los resultados en la expresión de genes como: *Dat*, *Vmat2*, *TH*, y *Pitx3*, en las 6 regiones antes mencionadas se muestra en el anexo de resultados.

Expresión del gen *Nurr1* en mesencéfalo

La expresión relativa del gen *Nurr1*, factor de transcripción de diferentes proteínas y enzimas (TH, DAT, Vmat2, etc) e importante en el metabolismo de la dopamina, presentó los siguientes resultados en el mesencéfalo (Figura 18):

1. Una disminución significativa ($p < 0.05$) del 58% en el grupo de ratones tratados con MPTP+Salina en comparación con el grupo de ratones tratados con Salina+Salina (control).

2. Así mismo el grupo de ratones tratados con MPTP+EGb 761 mostró una recuperación del 40% ($p < 0.05$) en la expresión del gen *Nurr1* en comparación con el grupo de ratones tratados con MPTP+Salina, mostrando un efecto de restauración en la expresión de este gen.
3. Por otro lado el grupo de Salina+EGb 761 no presentó diferencias significativas en comparación con el grupo tratado con Salina-Salina.

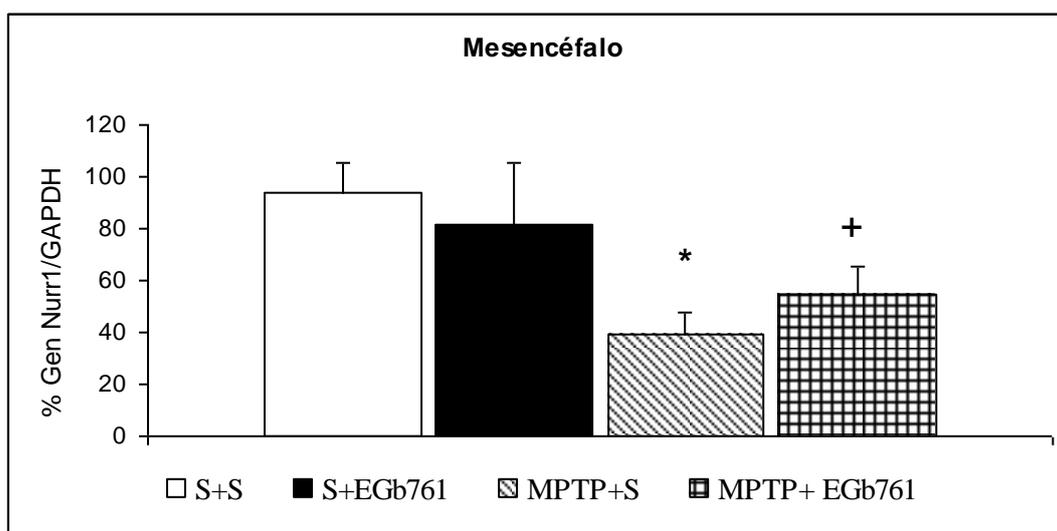


Figura 18. Expresión de los niveles de *Nurr1* en el mesencéfalo. La expresión relativa del mRNA del gen *Nurr1* presentó una disminución significativa ($p < 0.05$) del 58% en el grupo de ratones tratados con MPTP + Salina en comparación del control. Así mismo se observa una restauración ($p < 0.05$) del 40% del gen *Nurr1* en comparación con el grupo tratado con MPTP+Salina. Mientras que en el grupo tratado con Salina+EGb 761 en comparación con el grupo control Salina + Salina no mostró diferencias significativas. Para este análisis se utilizó como control endógeno el gen GAPDH. Los datos representados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con ANOVA de una vía seguido de un análisis de mínima diferencia de Duncan.* $P < 0.05$ comparada con el grupo Salina+Salina, + $P < 0.05$ comparada con el grupo MPTP+Salina.

Expresión del gen *Nurr1* en estriado.

La expresión relativa del gen *Nurr1* presentó los siguientes resultados en el estriado (figura 19):

1. La expresión del gen *Nurr1* en el grupo de ratones tratados con MPTP+Salina mostró un aumento del 45% ($p < 0.05$) en comparación con el grupo control (Salina+Salina).
2. La expresión del gen *Nurr1* en el grupo tratado con MPTP+EGb 761 mostró niveles significativamente menores del 57% ($p < 0.05$) con respecto al grupo tratado con MPTP+Salina. No existió diferencia significativa entre el grupo MPTP+EGb 761 y el grupo control, podemos decir que el MPTP+EGb 761 presentó un mantenimiento de niveles basales de la expresión de *Nurr1*.
3. Por otro lado el grupo de Salina+EGb 761 no presentó diferencias significativas en comparación con el grupo tratado con Salina-Salina.

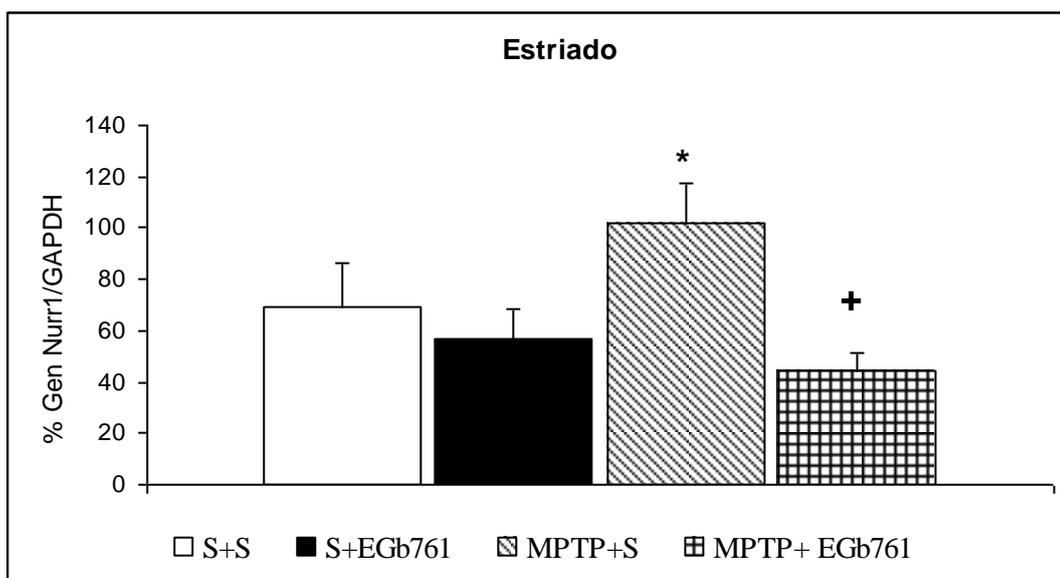


Figura 19. Expresión de los niveles de *Nurr1* en el estriado. La expresión relativa del mRNA del gen *Nurr1* presentó un aumento ($p < 0.05$) del 45% en el grupo de ratones tratados con MPTP+Salina en comparación del control. Mientras que no se observaron diferencias significativas con el grupo MPTP + EGb761 en comparación con el grupo control. Aunque se observa una disminución del 57% ($P < 0.05$) en cuanto a la expresión del Grupo tratado con MPTP + EGb 761 en comparación con el grupo MPTP + Salina .Por otro lado el grupo tratado con Salina+EGb 761 en comparación con el grupo control

Salina+Salina no mostraron diferencias significativas. Para este análisis se utilizó como control endógeno el gen GAPDH. Los datos representados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con ANOVA de una vía seguido de un análisis de mínima diferencia de Duncan. * $P < 0.05$ comparada con el grupo Salina+Salina, $^+P < 0.05$ comparada con el grupo MPTP+Salina.

Expresión de gen *En1* en el mesencéfalo

No se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos de ratones tratados con MPTP+Salina, MPTP+EGb 761 y Salina+EGb 761, cuando se realizaron las respectivas comparaciones con el grupo control, como se muestra en la figura 20.

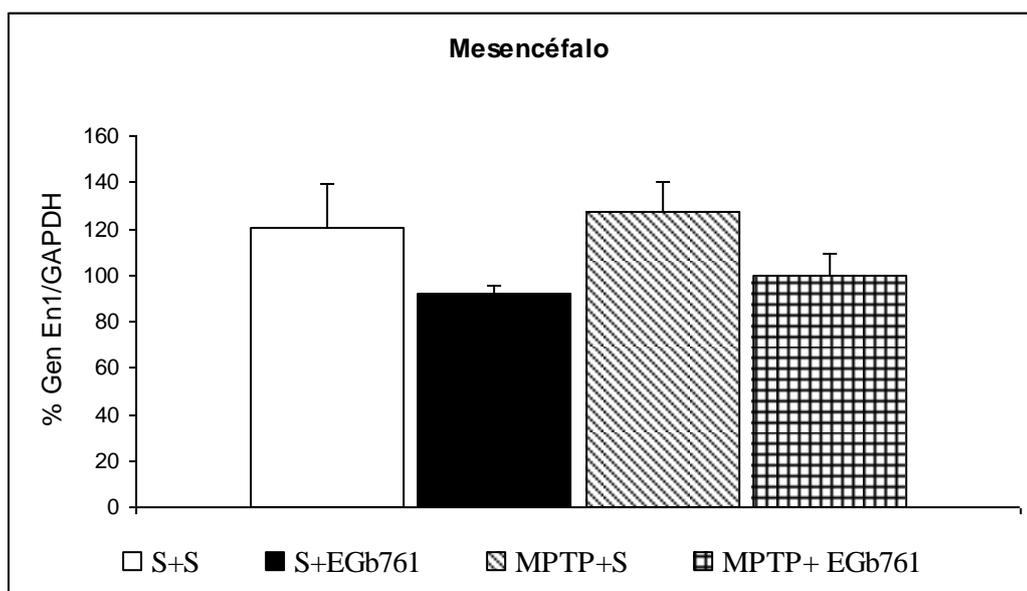


Figura 20. La expresión del gen *En1* en el mesencéfalo. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los ratones tratados con MPTP+ Salina, MPTP + EGb 761 y Salina + EGb 761, cuando se realizaron las respectivas comparaciones. Para este análisis se utilizó como control endógeno el gen GAPDH. Los datos representados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con ANOVA de una vía seguido de un análisis de mínima diferencia de Duncan

Expresión de gen *En1* en el estriado

En la figura 21 se presentan los resultados obtenidos en la expresión del gen *En1* en el estriado, encontrando lo siguiente:

1. Los niveles de expresión del gen *En1* disminuyeron significativa ($p < 0.001$) un 68% en el grupo de ratones tratados con MPTP+Salina en comparación del grupo de ratones control (Salina+Salina).
2. Se observó una recuperación ($p < 0.05$) de aproximadamente el 100% en la expresión del gen *En1* en el grupo de ratones tratados con MPTP+EGb761 en comparación con el grupo de ratones tratados con MPTP+Salina.
3. Así mismo los grupos de ratones tratados con MPTP+EGb 761 y Salina+EGb 761 no presentaron cambios significativos en comparación con el grupo Salina+Salina.

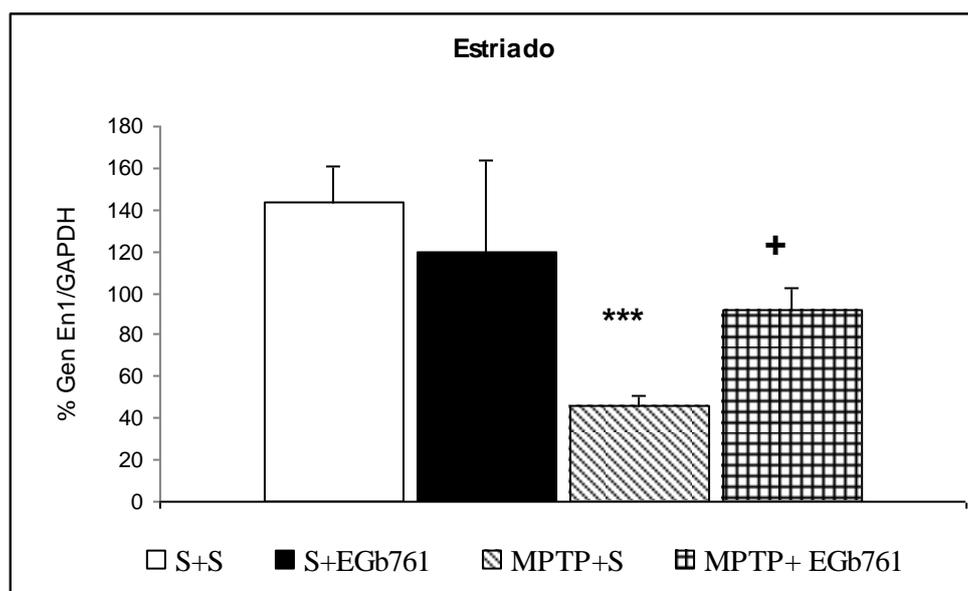


Figura 21. La expresión del gen *En1* en el estriado. La expresión del gen *En1* mostró una disminución significativa ($p < 0.001$) del 68% el grupo de ratones tratados con MPTP+Salina en comparación con el grupo Salina + Salina. En el grupo tratado con MPTP+EGb 761 se observa una recuperación ($p < 0.05$) del 100% en comparación con el grupo tratado con MPTP + Salina. Así mismo el grupo de ratones tratados con MPTP + EGb 761 y Salina + EGb761 no mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo Salina+Salina. Para este análisis se utilizó como control endógeno el gen

GAPDH. Los datos representados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con ANOVA de una vía seguido de un análisis de mínima diferencia de Duncan. *** $P < 0.001$ comparado con el grupo Salina+Salina, + $P < 0.05$ comparado con el grupo MPTP+Salina.

Expresión del gen *D2r* en el mesencéfalo

La expresión relativa del gen *D2r*, que codifica para el receptor de dopamina D2R, proteína importante para la coordinación motora, el aprendizaje y la memoria presentó los siguientes resultados en el mesencéfalo (ver Figura 22):

1. La expresión del gen *D2r* presentó una disminución significativa ($p < 0.01$) del 28% en el grupo tratados con MPTP + Salina en comparación con el grupo tratado con Salina + Salina (control).
2. El grupo de ratones tratado con MPTP+EGb 761 presentó una recuperación ($p < 0.01$) del 22% en comparación con el grupo de ratones tratado con MPTP+Salina.
3. Por otro lado el grupo tratado con Salina+EGb 761 no presentó diferencias significativas en comparación con el grupo tratado con Salina-Salina.

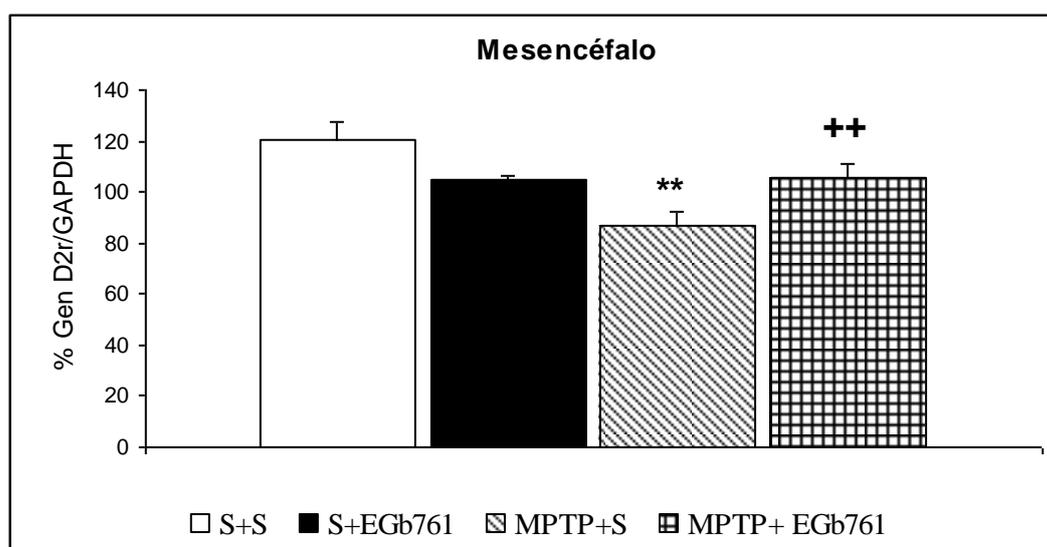


Figura 22. La expresión del gen *D2r* en el mesencéfalo. La expresión del gen *D2r* presentó una disminución significativa ($P < 0.01$) del 28% del grupo tratado con MPTP + Salina en comparación con el grupo Salina + Salina

(control). Mientras que el grupo tratado con MPTP+EGb 761 presentó una recuperación ($p < 0.01$) del 22% en comparación con el grupo MPT + Salina. Por otro lado el grupo tratado con MPTP+EGb 761 no mostró cambios significativos en comparación con el grupo Salina + Salina. Para este análisis se utilizó como control endógeno el gen GAPDH. Los datos representados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con ANOVA de una vía seguido de un análisis de mínima diferencia de Duncan. ** $P < 0.01$ comparado con el grupo Salina+Salina, ++ $P < 0.01$ comparado con el grupo MPTP+Salina.

Expresión del gen *D2r* en el estriado.

No se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos de ratones tratados con MPTP+Salina, MPTP+EGb 761 y Salina+EGb 761, cuando se realizaron las respectivas comparaciones con el grupo control, como se muestra en la figura 23.

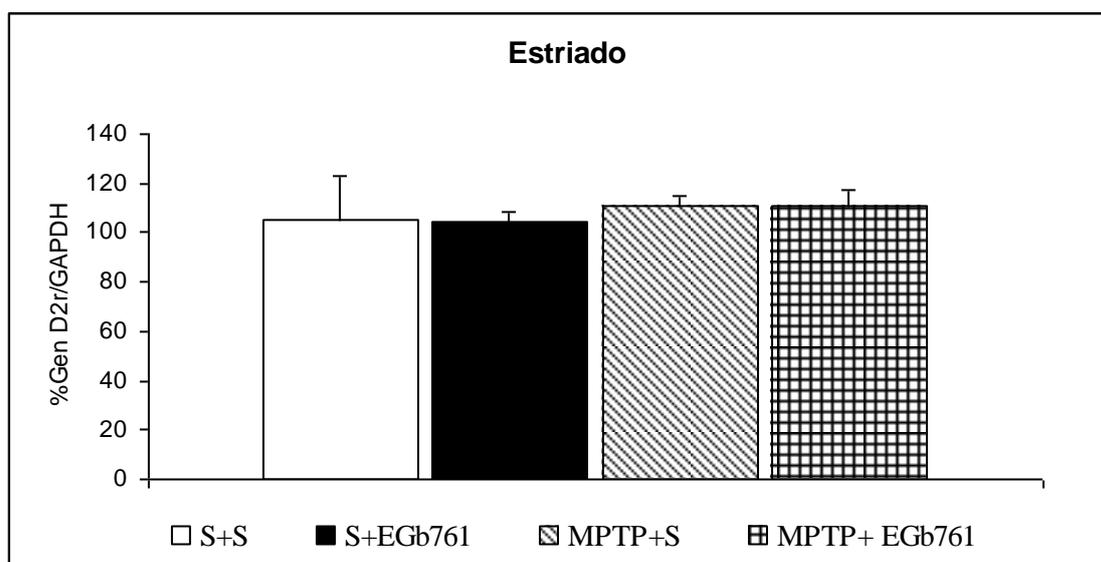


Figura 23. La expresión del gen *D2r* en el estriado. No se observaron cambios significativos en ninguno de los grupos de ratones tratados con MPTP+ Salina, MPTP + EGb 761 y Salina + EGb 761, cuando se realizaron las respectivas comparaciones. Para este análisis se utilizó como control endógeno el gen GAPDH. Los datos representados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con ANOVA de una vía seguido de un análisis de mínima diferencia de Duncan.

4. DISCUSIÓN

Esta tesis se ocupó del estudio de los efectos del EGb 761 en la regulación de genes relacionados con la función dopaminérgica en un modelo experimental de la EP. Esta enfermedad es un desorden neurodegenerativo caracterizado por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal en el cerebro. La muerte de estas neuronas producen una disminución del contenido de la dopamina estriatal, resultando en el deterioro del movimiento (bradicinesia, temblor en reposo y rigidez postural) (Le et al., 2010). La etiología de esta enfermedad no es del todo conocida, pero se atribuye a factores ambientales y genéticos.

Actualmente no se cuenta con un tratamiento farmacológico que detenga la progresión de la EP. Diversos fármacos empleados producen además diferentes efectos secundarios indeseables. Así, es importante la identificación de nuevas terapias que puedan contribuir a la disminución de la progresión de la enfermedad con menores efectos secundarios.

Con el fin de encontrar nuevas alternativas farmacéuticas, así como determinar las causas de la patología de la EP se han empleado una serie de modelos experimentales. Uno de los modelos que más se asemejan a las características bioquímicas, fisiológicas y patológicas de la EP es el uso de la neurotoxina MPTP. Esta neurotoxina induce una pérdida específica de las neuronas dopaminérgicas (Smeyne et al., 2004). Así mismo se ha demostrado que esta neurotoxina genera cambios en la expresión de genes relacionados con la dopamina en la SN y el cuerpo estriado (Xu et al., 2005; Pattarini et al., 2008).

El EGb 761, extracto estandarizado de las hojas de *Ginkgo biloba*, es una mezcla de compuestos con un amplio espectro de actividad farmacológica en el SNC. Esta actividad se presenta por diferentes mecanismos de acción. El EGb 761 ha mostrado un efecto neuroprotector y neurorestaurador en el modelo de MPTP de la EP (Ramassamy et al., 1990; Wu et al., 1999; Rojas et al., 2000; Rojas et al., 2004; Rojas et al., 2008). Este efecto es el resultado de la acción antioxidante del EGb 761. Por otra parte, se ha demostrado que el EGb 761 regula genes que codifican diferentes receptores de neurotransmisores (Su et al., 2009).

El presente estudio exploró si el efecto neuroprotector del EGb 761 está relacionado con la regulación de genes involucrados en la vía dopaminérgica en un modelo experimental de la EP inducido con la neurotoxina MPTP. Se indujo el parkinsonismo utilizando una dosis sub-aguda de MPTP (30 mg/kg vía i.p) y posteriormente una administración con EGb 761 en ratones de la cepa C57BL/6J. Se identificaron los cambios en la expresión de 7 genes relacionados con las vías dopaminérgicas: *Nurr1*, *Dat*, *Vmat2*, *TH*, *D2r*, *En1* y *Pitx3* en 6 regiones cerebrales (mesencéfalo, estriado, corteza prefrontal, hipotálamo, hipocampo y cerebelo).

Nuestro estudio mostró que el EGb 761 restableció los niveles de expresión de tres genes (*Nurr1*, *En1* y *D2r*) en el modelo animal de la MPTP. Los genes *Nurr1* y *En1* codifican a factores de transcripción importantes para el desarrollo embrionario, mantenimiento y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en el adulto (Alavian et al., 2008). Mientras que el gen *D2r* codifica el receptor de dopamina D2R, implicado en la modulación motora, el aprendizaje y la memoria (Usiello et al., 2000). Así mismo, el restablecimiento en la expresión de estos genes por el EGb 761 se presentó únicamente en las regiones cerebrales que forman parte de la vía nigroestriatal (SN (localizada en el mesencéfalo) y cuerpo estriado). Este efecto de regulación diferencial por región del EGb 761 se ha observado en el cuerpo estriado y la corteza en la regulación de diferentes receptores de neurotransmisores, como son los receptores de dopamina (Su et al., 2009).

4.1 Efecto del EGb761 en la expresión del gen *Nurr1* en el modelo experimental de la MPTP.

Nurr 1 es un factor de transcripción que pertenece a la súper familia de receptores nucleares huérfanos. Este factor regula la expresión de diferentes genes que codifican proteínas y enzimas involucradas en el metabolismo de la dopamina. Entre estos genes se encuentran: *TH*, *VMAT2*, *DAT* (Xu et al, 2005), *AADC*, *Bdnf*, entre muchos otros. Estudios han demostrado que *Nurr1* no solamente es crítico para la diferenciación temprana de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, sino también para el mantenimiento funcional de dichas neuronas (Banafsheh et al., 2009; Xu et al., 2004).

4.1.1 Restauración de la expresión del gen *Nurr1* en el mesencéfalo

Nuestros resultados identificaron que el empleo del MPTP disminuye la expresión del gen *Nurr1* (58%). Esta reducción en la expresión de éste gen se podría relacionar con la disminución en la expresión de genes relacionados con la cascada dopaminérgica en la SN por la neurotoxina MPTP. Los genes que se han reportado disminuidos en su expresión por la neurotoxina MPTP se encuentran: Tirosina Hidroxilasa (Th), Transportador de dopamina (Dat) y vesicular de monoaminas (Vmat) (Kûhn et al., 2003; Xu et al., 2005).

El tratamiento del EGb 761 en animales administrados con MPTP (grupo MPTP+EGb 761) mostró una recuperación (40%) en los niveles de expresión del gen *Nurr1* cuando se comparó con el grupo MPTP+Salina (figura 6). Este hallazgo nos hace suponer que el efecto neurorestaurador del EGb 761 está dado en parte por la recuperación de los niveles de expresión del gen *Nurr1* ante la neurotoxicidad de la MPTP. Esta hipótesis es apoyada con los estudios que demuestran que el EGb 761 produce una recuperación en el contenido de dopamina del cuerpo estriado y de la actividad de la TH (Rojas et al., 2004). La proteína TH es la enzima limitante en la síntesis de dopamina y su expresión está regulada por el factor de transcripción *Nurr1*. Una recuperación en la expresión del gen *Nurr1* en mesencéfalo puede estar relacionada con una mayor producción y liberación de la dopamina. Adicionalmente, la reducción en la expresión *Nurr1* (ratones heterocigotos, *Nurr1+/-*) incrementa la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas ante el daño inducido por la neurotoxina MPTP (Le et al., 2008). Además, se ha identificado una disminución en la expresión de este gen en pacientes con EP (Le et al., 2008). Estos estudios demuestran la importancia de la preservación de la expresión del gen *Nurr1* en la fisiopatología de la EP.

4.1.2 Mantenimiento de la expresión del gen *Nurr1* en el estriado

Nuestros resultados mostraron un aumento significativo (47%) en la expresión del gen *Nurr1* en el estriado en el grupo tratado con MPTP+Salina en comparación con el grupo control (Salina+Salina) (Figura 7). El incremento en la expresión de este factor de transcripción podría reflejar un mecanismo compensatorio para la estimulación de la supervivencia de las neuronas ante la neurotoxicidad del MPTP. Este efecto compensatorio se ha observado en la

expresión de factores de crecimiento como el BDNF y GDNF en el modelo experimental de la MPTP (Mandel et al., 2002; Zhao et al., 2010). Este aumento en la expresión de estos factores se relaciona con una disminución de la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Zhao et al., 2010). El aumento en la expresión de *Nurr1* podría relacionarse con el aumento en la expresión de *Bdnf*, debido a que *Nurr1* es uno de los factores de transcripción que regula la expresión de *Bdnf* (Volpicelli et al., 2007).

El EGb 761 preservó los niveles de expresión del gen *Nurr1* al disminuir (57%) la expresión de éste gen en ratones administrados con MPTP (MPTP+EGb 761) al compararlo con el grupo MPTP+Salino (Figura 9). Este mantenimiento en la expresión del gen *Nurr1* podría relacionarse con un mecanismo de neuroprotección del EGb 761 ante el inicio del estrés oxidativo producido por el ión tóxico MPP^+ (Rojas et al., 2004)

4.2 Efecto del EGb 761 en la expresión del gen *En1* en el modelo experimental de la MPTP

En1 es un factor de transcripción Homobox, juega un papel importante en el desarrollo y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas. La pérdida de este gen conduce a la apoptosis de neuronas dopaminérgicas mediante la activación de la caspasa 3 (Haubenberger et al., 2009).

4.2.1 Análisis de la expresión del gen *En1* en el mesencéfalo no tuvo cambios en ningún grupo experimental

El análisis de expresión del gen *En1* no mostró diferencias significativas en los niveles de mRNA para ninguno de los grupos investigados (figura 8). En este caso se esperaba que el grupo tratado con MPTP (MPTP+Salina) disminuyera la expresión de este gen por la neurotoxicidad generada. Este efecto no se observó, sugiriendo que se presentó una recuperación rápida ante la neurotoxicidad de la MPTP o bien que la expresión de este gen en el estriado no es afectada por esta toxina a esta dosis y tiempo de exposición a la toxina. Esto podría representar el efecto del cambio en la expresión de los genes por la MPTP. Un ejemplo de esto es la expresión del gen *ND4*, que codifica para una subunidad del complejo I de la fosforilación oxidativa. Este subunidad forma parte del complejo respiratorio de la mitocondria (Kühn et al.,

2003). Nuevas investigaciones serían necesarias para aclarar el posible papel del MPTP en la expresión del gen *En1*.

4.2.2 Restauración de la expresión del gen *En1* en el estriado

La expresión del gen *En1* en el estriado presentó una disminución significativa (68%) en los ratones tratados con MPTP (MPTP+salina) en comparación con el grupo control (Salina+Salina). La disminución del gen *En1* converge con la toxicidad del MPTP y el mecanismo que involucra daño a las mitocondrias, ya que se ha relacionado la reducción de la expresión de *EN1* con la disfunción mitocondrial (Alavian et al., 2009). Se han reportado que la expresión en la reducción de *En1* incrementa la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo, observándose una disminución de este tipo de neuronas por mecanismos apoptóticos (Albéri et al., 2004).

En nuestro estudio el grupo de ratones tratados EGb 761 después de administrar MPTP (MPTP+EGb 761) mostró una recuperación (aproximadamente 100%) en los niveles de la expresión del gen *En1* al compararlo con grupo tratado con MPTP+Salina (figura 9). Este efecto en la recuperación de la expresión de *En1* podría ser atribuido al efecto neurorestaurador del EGb 761 vía preservación funcional de la mitocondria. Esta hipótesis puede ser sustentada con diferentes estudios que han demostrado que la supervivencia de neuronas dopaminérgicas depende de la expresión de genes *En1* (Sgado et al., 2006; Albéri et al., 2004). Además de que el efecto neuroprotector del EGb 761 ante la neurotoxicidad del MPTP se asocia con el bloqueo de la peroxidación de lípidos y una reducción de la producción de radicales superóxido (indicado por la reducción en la actividad de la SOD-Mn) (Rojas et al., 2008). En nuestro grupo se ha reportado que estos dos parámetros son un índice del estrés oxidativo, en donde la SOD-Mn, enzima antioxidante, se localiza en la membrana mitocondrial. La disminución en la actividad de esta enzima antioxidante se relaciona con un efecto protector a la mitocondrial y que podría estar relacionada también con la restauración en la expresión del gen *En1*.

4.3 Efecto del EGb 761 en la expresión del gen *D2r* en el modelo experimental de la MPTP.

El gen *D2r* codifica para el receptor de dopamina D2 (D2R). Éste se ha relacionado con la modulación de la actividad motora, el aprendizaje y la memoria; así como en la fisiopatología de los trastornos neuropsiquiátricos como la EP y la Esquizofrenia (Usiello et al., 2000).

4.3.1 Restauración de la expresión del gen *D2r* en el mesencéfalo

La expresión del gen *D2r* en el mesencéfalo en el grupo de ratones tratados con MPTP+Salina fue disminuida significativamente (28%) en comparación con el grupo Salina-Salina. La neurotoxina MPTP genera una lesión selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, donde se ha demostrado una abundante presencia de este receptor (isoforma D2L) (Meredith et al., 2008; Wang et al., 2000). Esta pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas pudiera relacionarse con la disminución de la expresión del gen *D2r* debida al efecto de la MPTP.

En este estudio se demostró una recuperación (22%) en el grupo tratado con MPTP+EGb 761 en comparación con el grupo tratado con MPTP+Salina (figura 10). Esta recuperación en la expresión del gen *D2r* puede ser relacionado con el efecto neurorestaurador del EGb 761 ante el daño ocasionado por la neurotoxicidad del MPTP. Esto podría ser sustentado dado que el receptor D2R participa en numerosas e importantes funciones fisiológicas como el control de la actividad motora. En este sentido el déficit locomotor observado en la neurotoxicidad por MPTP fue restaurado después de la administración del EGb 761 (Rojas et al., 2004). Adicionalmente se ha observado la normalización de la denervación relacionada con la sensibilidad de los receptores de dopamina D2R por el EGb 761 en diferentes modelos experimentales de la EP, la MPTP y la 6-HODA (Ahmad et al., 2005; Rojas et al., 2008). Está bien documentado que la sobrerregulación relacionada con la denervación de estos receptores es un mecanismo compensatorio por el déficit de dopamina. Adicionalmente, estudios realizados demuestran que el EGb 761 aumenta la transcripción de proteínas cerebrales relacionadas con la protección neuronal y plasticidad sináptica ante la neurotoxicidad producida por la MPTP (Gohil y Packer., 2002). El receptor D2R podría ser una de estas

proteínas relacionadas con la protección neuronal y con la plasticidad sináptica regulada por el EGb 761.

4.3.2 El análisis de la expresión del gen *D2r* en el estriado no tuvo cambios en ningún grupo experimental

En ninguno de los grupos estudiados se observó una diferencia significativa en la expresión del *D2r* en el estriado (figura 11). Aproximadamente el 80% de la dopamina en el cerebro se encuentra en el estriado, donde está unido a los receptores de dopamina (Flores et al., 2003). Así, las neuronas en estriado expresan especialmente el receptor de dopamina D2R. Por esta razón se esperaba un mayor daño en el grupo de ratones tratados con la neurotoxina MPTP+Salina, debido a la oxidación de la dopamina generada por ROS, producidas por el metabolismo de la MPTP. Resultaría interesante cuantificar la proteína para identificar si a este nivel se encuentran diferencias en la expresión del receptor de dopamina, y así poder evaluar si se presenta una modulación del EGb 761 ante el daño generado por el MPTP. En apoyo a esto se ha identificado un mecanismo compensatorio de sobre regulación a nivel proteico del receptor de D2R post-sináptico en estriado de ratones con la administración de MPTP (Ishiwata et al., 2001).

En el presente estudio se observó que la administración del EGb 761 por sí solo no moduló la expresión de los genes analizados, en cambio se observó que ejerce un efecto neurorestaurador en respuesta a la neurotoxicidad del MPTP en el mesencéfalo y en el cuerpo estriado. Este hallazgo coincide con estudios que demuestran que el tratamiento único con EGb 761 no produce cambios significativos de la expresión de genes en el estriado (Su et al., 2009).

5. CONCLUSIONES

La extracción de los ácidos nucleicos fue óptima, con una excelente calidad, pureza y concentración.

Se estandarizaron los parámetros de la técnica qRT-PCR en tiempo real para medir la expresión de los 6 genes de interés en nuestro estudio.

Se demostró que el EGb 761 regula la expresión de genes relacionados con la cascada dopaminérgica ante el daño producido por la neurotoxina MPTP. En consecuencia se observó una restauración en la expresión de factores de transcripción que están involucrados en el desarrollo y mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas en etapas adultas, como *Nurr1* y *En1*.

Así mismo, el EGb 761 ejerció efecto neuroprotector al restaurar la expresión del gen *D2r* en el mesencéfalo después del daño ocasionado por la neurotoxina MPTP. En el estriado éste gen no presentó cambio en cuanto a su expresión, esto nos hace pensar que probablemente se tiene un aumento en la cantidad de proteína D2R, que del gen.

El presente estudio demostró que el EGb 761 restablecer los niveles de expresión ante el daño producido a las neuronas dopaminérgicas por la neurotoxina MPTP. Estos efectos pueden estar correlacionados con la actividad polivalente del extracto para revertir la neurotoxicidad inducida por el MPTP, aumentando la expresión de factores de transcripción que están ampliamente comprometidos en la regulación y mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas, como son *En1* y *Nurr1*

PERSPECTIVAS

Actualmente no hemos encontrado información en la literatura científica sobre el tratamiento con *EGb761* en pacientes que sufren EP, por lo que al ser este un estudio original, sirve de base para generar nuevos proyectos al respecto. Además, sería importante determinar la efectividad farmacológica del EGb 761 como tratamiento complementario en pacientes con EP, que tendría como objetivo, evitar la aceleración de la neurodegeneración del SNC y los efectos secundarios ocasionados por los fármacos que actualmente se emplean para el tratamiento de la enfermedad.

En conclusión el *EGb761* puede representar una nueva terapia para pacientes con EP debido a que tiene un efecto en la regulación de genes neuronales. Así mismo tiene una potencial aplicación en el tratamiento de desórdenes asociados con la deficiencia central de la dopamina.

Un aumento en la regulación de genes relacionados con las vías dopaminérgicas, así como factores neurotróficos, podrían prevenir el progreso de la EP. Sin embargo emplear una terapia directa con estas moléculas, no es viable debido a la dificultad para ser administradas en regiones específicas del cerebro. Por lo que es importante la búsqueda de fitofármacos que ayuden a la regulación de genes que contribuyan a la restauración de las vías dopaminérgicas, para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como es el caso de EP. Así mismo el empleo del *EGb761* en el tratamiento de problemas neurosensoriales, desordenes neuropsiquiátricos, enfermedades cerebro vasculares, demencias neurodegenerativas asociadas a la edad y AD, han dado la pauta para explorar el efecto que ejerce el *EGb761* en la expresión de genes en el cerebro.

6. Bibliografía

- Aarsland D, Marsh L, and Schrag A. Neuropsychiatric Symptoms in Parkinson's disease. (2009) *Movement Disorders* 24(15); 2175-2186.
- Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. (2006) *Nature reviews Neuroscience* 7(3):207-219.
- Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondria, and cellular Bioenergetics. (2001) *Journal of pineal research* 30(2); 65–74.
- Adams D, Chang L, Klaidman L. Parkinson's disease-redox mechanisms. (2001) *Current Medicinal Chemistry* 8(7); 809-814.
- Ahlemeyer B, Möwes A, Krieglstein J. Inhibition of serum deprivation and staurosporine-induced neuronal apoptosis by *Ginkgo biloba* extract and some of its constituents. (1999) *European journal of pharmacology* 367(2-3); 423–430.
- Ahlemeyer B, Krieglstein J. Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* extract. (2003) *Cellular and molecular life sciences* 60(9); 1779-1792.
- Ahmad M, Saleem S, Ahmad AS, Yousuf S, Ansari MA, Khan MB, Ishrat T, Chaturvedi RK, Agrawal AK, Islam F. *Ginkgo biloba* affords dose-dependent protection against 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats: neurobehavioural, neurochemical and immunohistochemical evidences. (2005) *Journal of Neurochemistry* 93(1); 94–104.
- Ahlskog JE, Muenter MD. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. (2001) *Movement Disorders* 16(3); 448–458.
- Alavian KN, PhD, Scholz C, Biology MS, Horst HS. Transcriptional Regulation of mesencephalic dopaminergic Neurons: The full circle of life and death. (2008) *Movement Disorders* 23(3); 319-328.
- Alavian KN, Sgadò P, Alberi L, Subramaniam S, Simon HH. Elevated P75NTR expression causes death of engrailed-deficient midbrain dopaminergic neurons by Erk1/2 suppression. (2009) *Neural development* 14; 4-11.

- Albèri L, Sgadò P, Simon HH. *Engrailed* genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons. (2004) *Development* 131(13); 3229-3236.
- Anderson D, Bradbury K, Schneider J. Neuroprotection in Parkinson models varies with toxin administration protocol. (2006) *The European Journal of Neuroscience* 24(11); 3174-3182.
- Applied Biosystem. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. (2004) Pag 1-60.
- Augustin S, Rimbach G, Augustin K, Cermak R, and Wolffram S. Gene Regulatory Effects of *Ginkgo biloba* Extract and Its Flavonol and Terpenelactone Fractions in Mouse Brain. (2009) *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 45(3); 315–321.
- Backman C, Perlmann T, Wallen A, Hoffer, BJ, Morales M. A selective group of dopaminergic neurons express Nurr1 in the adult mouse brain. (1999) *Brain research* 851(1-2); 125-132.
- Backman C, You ZB, Perlmann T, Hoffer BJ. Elevated locomotor activity without altered striatal dopamine contents in Nurr1 heterozygous mice after acute exposure to methamphetamine. (2003) *Behavioural brain research* 143(1); 95–100.
- Banafsheh K, Takehito I, Eliza J, Bengt M, Claude R, Manolo C, Shin-Ichi M, Chiho SI, Takahide N, Daniel M, Pierre C, Eva L, Nils-G, Lars Olson, Anders Bjoörklund, Hiroshi Ichinose, Thomas Perlmann. Nurr1 Is Required for Maintenance of Maturing and Adult Midbrain Dopamine Neurons. (2009) *The Journal of Neuroscience* 29(50); 15923–15932.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee R. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. (1999) *Current Science* 77; 5(10); 659-666.
- Barzilai A, Melamed E. Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. (2003) *Trends in molecular medicine* 9(3); 126-132.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. (2005) *Cell* 120(4); 483–495.

- Ben-Shanchar D, Youdim MB. Intranigral iron injection induces behavioral and biochemical “parkinsonism” in rats. (1991) *Journal Neurochemistry* 56(6); 2133-2135.
- Benmoyal-Segal L, Soreq H. Gene-environment interactions in sporadic Parkinson’s disease. (2006) *Journal Neurochemistry* 97(6); 1740-1755.
- Bermang O, Hakansson A, Westberg L, Nordenström K, Carmine Belin A, Sydow O, Olson L, Holmberg B, Eriksson E, Nissbrandt H. PITX3 polymorphism is associated with early onset Parkinson’s disease. (2010) *Neurobiology of Aging* 31(1); 114-117.
- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal Models of Parkinson’s disease. (2002) *Handbook of clinical neurology* 24(4); 308-318.
- Björklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. (2007) *Trend in neurosciences* 30(5); 194-202.
- Blandini F, Armentero Marie-Therese, Martignoni E. The 6-hydroxydopamine model: News from the past. (2008) *Parkinsonism and Related Disorders* 14(2); 124-129.
- Blasi G, Lo Bianco L, Taurisano P, Gelao B, Romano R, Fazio L, Papazacharias A, Di Giorgio A, Caforio G, Rampino A, Masellis R, Papp A, Ursini G, Sinibaldi L, Popolizio T, Sadee W, Bertolino A. Functional variation of the dopamine D2 receptor gene is associated with emotional control as well as brain activity and connectivity during emotion processing in humans. (2009) *Journal Neuroscience* 29(47); 14812-14819.
- Blecharz-Klin K, Piechal A, Joniec I, Pyrzanowska J, Widy-Tyszkiewicz E. Pharmacological and biochemical effects of Ginkgo biloba extract on learning, memory consolidation and motor activity in old rats. (2009) *Acta neurobiologiae experimentalis* 69(2); 217–231.
- Bohlen OV, Haalbach. Animal Models of Parkinson’s disease. (2005) 2; 313-320.
- Bosboom J L, Stoffers D, Wolters E. Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson’s disease. (2004) *Journal of neural transmission* 111(10-11); 1303–1315.

- Bridi R, Crossetti FP, Steffen VM, Henriques AT. The antioxidant activity of standardized extract of Ginkgo biloba (EGb 761) in rats. (2001) *Phytoterapy research* 15(5); 449-451.
- Brochier C, Gaillard Marie-Claude, Diguet E, Caudy N, Dossat C, Segurens B, Wincker P, Roze E, Caboche J, Hantraye P, Brouillet E, Elalouf Jean-Marc, de Chaldee M. Quantitative gene expression profiling of mouse brain regions reveals differential transcripts conserved in human and affected in disease models. (2008) *Physiological genomics* 33(2); 170–179.
- Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. (2002) *Journal of Molecular Endocrinology* 29(1); 23–39.
- Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. (2005) *Clinical Science* 109(4); 365–379.
- Cicchetti F, Drouin-Ouellet J, Gross RE. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? (2009) *Trends in Pharmacological Sciences* 30(9); 475-482.
- Calabresi P, Saiardi A, Pisani A, Baik JH, Centonze D, Mercuri N, Bernardi G, Borrelli E. Abnormal Synaptic Plasticity in the Striatum of Mice Lacking Dopamine D2 Receptors. (1997) *The Journal of Neuroscience* 17(12); 4536–4544.
- Castello P, Drechsel D, and Patel M. Mitochondria Are a Major Source of Paraquat-induced Reactive Oxygen Species Production in the Brain. (2007) *The Journal of Biological Chemistry* 282(19); 14186-14193.
- Coulon V, L'Honore A, Ouimette JF, Dumontier M, Munckhof P, Drouin J. A Muscle-specific Promoter Directs Pitx3 Gene Expression in Skeletal Muscle Cells. (2007) *Journal of biological Chemistry* 282(45); 33192-33200.
- Chen W, Wang Q, Wei C, Shi M, Chan S. Chinese herbs and herbal extracts for neuroprotection of dopaminergic neurons and potential

- therapeutic treatment of Parkinson's disease. (2007) *CNS Neurology Disorders Drug Targets* 6(4); 273–281.
- Chinopoulos Christos , Adam-Vizi Vera. Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal Pathology. (2006) *European journal of biochemistry / FEBS* 273(3); 433–450.
 - Chinta JS, Anderson JK. Dopaminergic neurons. (2004) *The international journal of biochemistry & cell biology* 37(5); 942-946.
 - Cho CH, Kang SG, Choi JE, Park YM, Lee HJ, Kim L. Association between Antipsychotics-Induced Restless Legs Syndrome and *Tyrosine Hydroxylase* Gene Polymorphism. (2009) *Department of Psychiatry* 6(3); 211-215.
 - Chun S, Jun L, Wu F, David T. *Ginkgo biloba* Extract in Alzheimer's disease: From Action Mechanisms to Medical Practice. (2010) *International journal of molecular sciences* 11(1); 107-123.
 - Chu Y, Le W, Kompolti K, Jankovic J, Mufson E, Kordower J. Nurr1 in Parkinson's disease and related disorders. (2006) *The Journal of comparative neurology* 494(3); 495–514.
 - Daubner S, Lohse D, Fitzpatrick P. Expression and characterization of catalytic and regulatory domains of rat tyrosine hydroxylase. (1993) *Protein science* 2(9); 1452–1460.
 - Deckelbaum R, Majithia A, Booker T, Henderson J, Loomis C. The homeoprotein engrailed 1 has pleiotropic functions in calvarial intramembranous bone formation and remodeling. (2006) *Development* 133(1); 63-74.
 - DeFeudis F V. *Ginkgo Biloba* extract (EGb 761) from chemistry to the clinic. (1998) Ullstein Medical.
 - DeFeudis FV and Drieu K. *Ginkgo Biloba* Extract (EGb 761) and CNS functions: Basic Studies and Clinical Applications. (2000) *Current Drug Targets* 1; 25-58.
 - DeFeudis FV. Bilobalide and neuroprotection. (2002) *International journal of clinical pharmacology research* 46(6); 565–568.
 - DeFeudis FV. Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on gene expression: Possible relevance to neurological disorders and age-

- associated cognitive impairment. (2002) *Drug Development Research* 57(4); 214-235.
- DeFeudis FV. A brief History of EGb 761 ® and its Therapeutic Uses. (2003) *Pharmacopsychiatry* 36(1); 1-7.
 - Dhawan V, Medcalf P, Stegie F, Jackson G, Basu S, Luce P, Odin P, Chaudhuri KR. Retrospective evaluation of cardio-pulmonary fibrotic side effects in symptomatic patients from a group of 234 Parkinson's disease patients treated with cabergoline. (2005) *Journal Neural Transmission* 112(5); 661-668.
 - Diamond BJ, Shiflett SC, Feiwel N, Matheis RJ, Noskin O, Richards JA, Schoenberger NE. *Ginkgo biloba* extract: Mechanisms and clinical indications. (2000) *Archives Physical Medical and Rehabilitation* 81(5); 668-678.
 - Drechsel DA, Patel M. Role of Reactive Oxygen Species in the Neurotoxicity of Environmental Agents Implicated in Parkinson's disease. (2008) *Free radical biology & medicine* 44(11); 1873–1886.
 - Duchemin AM, Zhang H, Neff NH, Hadjiconstantinou M. Increased expression of VMAT2 in dopaminergic neurons during nicotine withdrawal. (2009) *Neuroscience Letter* 467(2); 182-186.
 - Eubanks JH, Djabali M, Selleri L, Grandy DK, Civelli O, McElligott DL, Evans GA. Structure and linkage of the D2 dopamine receptor and neural cell adhesion molecule genes on human chromosome 11q23 . (1992) *Genomics* 14(4); 1010-1018.
 - Expósito-Rodríguez M, Borges A, Borges-Pérez A, Pérez JA. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. (2008) *BMC Plant Biology* 22(8); 131.
 - Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, Olanow CW, Tanner C, Marek K; Parkinson Study Group. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. (2004) *The New England Journal* 351(24);2498-2508.
 - Fahn S. Clinical Aspects of Parkinson Disease. (2008) *Molecular and Therapeutic Insights From model System* Pag 3-8.

- Flórez J. y Pazos A, Armijo JA, Mediavilla A. Neurotransmisión en el sistema nervioso central. En: Farmacología Humana, Ed Masson 4ª edición, Barcelona (2003) 435-460.
- Furuya T, Hayakawa H, Yamada M, Yoshimi k, Hisahara S, Miura M, Mizuno Y, Muchizuki H. Caspase-11 mediates inflammatory dopaminergic cell death in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahidroxipiridine mouse model of Parkinsons`s disease. (2004) Journal of Neuroscience 24(8); 1865-1872.
- Fitzpatrick PF. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. (1999) Annual review of biochemistry 68; 355–381.
- Fitzpatrick PF. Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation. (2003) Biochemistry 42(48); 14083–14091.
- Fleckenstein Annette E, Volz Trent J, Hanson Glen R. Psychostimulant-induced Alterations in Vesicular Monoamine Transporter-2 Function: Neurotoxic and Therapeutic Implications. (2009) Neuropharmacology 56(1); 133-138.
- Foster S, Yue CX. Herbal Emissaries: Bringing Chinese Herbs to the West. Rochester, VT: Healing. (1992) Arts Press 200-207.
- Gao FB. Posttranscriptional control of neuronal development by microRNA networks. (2008) Trends Neuroscience 31(1); 20-26.
- German DC, Liang CL, Manaye KF, Lane K, Sonsalla PK. Pharmacological inactivation of the vesicular monoamine transporter can enhance 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced neurodegeneration of midbrain dopaminergic neurons, but not locus coeruleus noradrenergic neurons. (2000) Neuroscience 101(4); 1063-1069.
- German DC, Sonsalla PK. A role for the vesicular monoamine transporter (VMAT2) in Parkinson's disease. (2003) Advances in behavioral biology 54:131-137.
- Gibran C, Saint-Pierre M, Bousquet M, Levesque D, Rouillard, Ciechetti F. Differences between subacute and chronic MPTP mice models: investigation of dopaminergic neuronal degeneration and α -synuclein inclusions. (2009) Journal of neurochemistry 109(5); 1469–1482.

- Gibson E, Heid A, Williams M. A Novel method for real time quantitative RT-PCR. (1996) *Genome research* 6(10); 995-1001.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. (2001) *Methods* 25(4); 386–401.
- Gjerden P, Bramness J, and Slordal L. The use and potential abuse of anticholinergic antiparkinson drugs in Norway: a pharmacoepidemiological study. (2008) *British journal of clinical pharmacology* 67(2): 228–233.
- Goetz CG, Poewe W, Rascol O, Sampaio C. Evidence-based medical review update: pharmacological and surgical treatments of Parkinson's disease: 2001 to 2004. (2005) *Movement disorders* 20(5);523-539.
- Goh LM, Barlow PJ. Flavonoid recovery and stability from *Ginkgo biloba* subjected to a simulated digestion process. (2004) *Food chemistry* 86; 95–202.
- Gohil K and Packer L. Global gene expression analysis identifies cell and tissue specific actions of *Ginkgo biloba* extract, EGb 761. (2002) *Cellular and Molecular Biology* 48(6); 625-631.
- Goldstein M, Deutch AY. Dopaminergic mechanisms in the pathogenesis of schizophrenia. (1992) *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6(7); 2413-2421.
- Gozal E, Shah Z, Pequignot JM, Pequignot J, Sachleben J, Czyzyk-Krzeska M, Li R, Guo ZH, and Gozal D. *Tyrosine hydroxylase* expression and activity in the rat brain: differential regulation after long-term intermittent or sustained hypoxia. (2005) *Journal of Applied Physiology* 99; 642-649.
- Group P.S. Pramipexole v/s levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a randomized controlled trial. Parkinson Study Group. (2000) *J Am Med Assoc* 284; 1931-1938.
- Guenin Se, Mauriat M, Pelloux J, Van O, Bellini C, Gutierrez L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic,

- experimental conditions-specific, validation of references. (2009) *Journal of Experimental Botany* 60(2); 487–493.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, and Mathieu C. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. (2001) *Methods* 25(4); 386–401.
 - Headley D, Suhan N, and Horn J. Different subcellular distributions of the vesicular monoaminetransporter, VMAT2, in subclasses of sympathetic neurons. (2007) *Brain Research* 1129(1);156-160.
 - Holt Ben F, Rothwell GW. "Is *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae) Really an Oviparous Plant?" . (1997) *American Journal of Botany*. 84(6); 870–872.
 - Holloway RG, Shoulson I, Fahn S, Kieburtz K, Lang A, Marek K, McDermott M, Seibyl J, Weiner W, Musch B, Kamp C, Welsh M, Shinaman A, Pahwa R, Barclay L, Hubble J, LeWitt P, Miyasaki J, Suchowersky O, Stacy M, Russell DS, Ford B, Hammerstad J, Riley D, Standaert D, Wooten F, Factor S, Jankovic J, Atassi F, Kurlan R, Panisset M, Rajput A, Rodnitzky R, Shults C, Petsinger G, Waters C, Pfeiffer R, Biglan K, Borchert L, Montgomery A, Sutherland L, Weeks C, DeAngelis M, Sime E, Wood S, Pantella C, Harrigan M, Fussell B, Dillon S, Alexander-Brown B, Rainey P, Tennis M, Rost-Ruffner E, Brown D, Evans S, Berry D, Hall J, Shirley T, Dobson J, Fontaine D, Pfeiffer B, Brocht A, Bennett S, Daigneault S, Hodgeman K, O'Connell C, Ross T, Richard K, Watts A; Parkinson Study Group. Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: A 4-year randomized controlled trial. (2004) *Archives of Neurology* 61(7); 1044–1053.
 - Horst S, Harald S, Wolfgang W, Martyn G, Dennis O. Fate of Midbrain Dopaminergic Neurons Controlled by the Engrailed Genes. (2001) *The Journal of Neuroscience* 21(9); 3126-3134.
 - Hranilovic D, Bucan M, and Wang Y. Emotional response in dopamine D2L receptor-deficient mice. (2008) *Behavioural brain research* 195(2); 246–250.
 - Hung H, Lee E. The mesolimbic dopaminergic pathway is more resistant than the nigrostriatal dopaminergic pathway to MPTP and MPP+

- toxicity: role of BDNF gene expression. (1996) *Molecular Brain Research* 41(1-2); 16-26.
- Ichinose H, Ohye T, Suzuki T, Sumi-Ichinose C, Nomura T, Hagino Y, Nagatsu T. Molecular cloning of the human Nurr1 gene: characterization of the human gene and cDNAs. (1999) *Gene* 230(2); 233–239.
 - Ishikawa Y, Kitamura M. Anti-apoptotic effect of quercetin: Intervention in the JNK-and ERK mediated apoptotic pathways. (2000) *Kidney international* 58(3); 1078–1087.
 - Ishiwata K, Koyanagi Y, Saitoh T, Taguchi K, Toda J, Sano T, Senda M. Effects of single and repeated administration of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline analogs on the binding of [11C] raclopride to dopamine D2 receptors in the mouse brain. (2001) *Journal of neural transmission* 108(10);1111-1125
 - Jakowec M, Nixon K, Hogg E, McNeill T, and Petzinger GM. Tyrosine hydroxylase and dopamine transporter expression following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced neurodegeneration of the mouse nigrostriatal pathway. (2004) *Journal of Neurosciense Research* 76(4); 539-550.
 - Jankovic J, Chen S, Le WD. The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. (2005) *Progress in Neurobiology* 77(1-2); 128–138.
 - Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. (2008) *Journal Neurol Neurosurg Psychiatry* 79(4); 368-376.
 - Kambiz N, Alavian, PhD, Christian Scholz, MS Biology, Horst H, Simon PhD. Transcriptional Regulation of Mesencephalic dopaminergic Neurons: The Full Circle of Life and Death. (2008) *Movement Disorders* 23(3); 319–328.
 - Kanga JM, Gil JS, Koha CH. Paraquat induces alternation of the dopamine catabolic pathways and glutathione levels in the *substantia nigra* of mice. (2009) *Toxicology Letters* 188(2); 148–152.
 - Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, Hannon G, A Abeliovich. A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine

- neurons. (2009) *The European Journal Neuroscience* 29(12); 2264-2275.
- Kim MS, Lee JI, Lee WY, Kim SE. Neuroprotective effect of Ginkgo biloba L. extract in a rat model of Parkinson's disease. (2004) *Phytotherapy Research* 18(8); 663–666.
 - Köhler A, Logan C, Joynea AL, Muenke N. Regional assignment of the human homeobox-containing gene EN1 to chromosome 2q13-q21. (1993) *Genomics* 15(1); 233-235.
 - Korotkova T, Ponomarenko A, Haas HL. Sergeeva O. Differential expression of the homeobox gene Pitx3 in midbrain dopaminergic neurons. (2005) *European Journal of Neuroscience* 22(6); 1287-1293.
 - Kubis N, Faucheux BA, Ransmayr G, Damier P, Duyckaerts C, Henin D, Forette B, Le Charpentier Y, Hauw JJ, Agid Y, Hirsch EC. Preservation of midbrain catecholaminergic neurons in very old human subjects. (2000) *Brain* 123(2); 366–373.
 - Kubista M, Andrade J, Bengtsson M, Forootan A, Jona'k J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. (2006) *Molecular Aspects of Medicine* 27(2-3); 95–125.
 - Kuemerle B, Gulden F, Cherosky N, Williams E, Herrup K.. The mouse Engrailed genes: a window into autism. (2007) *Behavioural brain research* 176(76); 121-132.
 - Kûhn K, Wellen J, Link N, Maskri L, Lûbbert H, Stichel CC. The mouse MPTP model; gene expression changes in dopaminergic neurons. (2003) *European Journal of Neuroscience* 17(1); 1-12.
 - Kumer SC, Vrana KE. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. (1996) *Journal of neurochemistry* 67(2); 443-462.
 - Lanfumey L, Hamon M. 5-HT1 receptors. *Current Drug Targets CNS*. (2004) *Neurology Disorders* 3(1); 1-10.
 - Le W, Pan T, Huang M, Xu P, Xie W, Zhu W, Zhang X, Deng H and Jankovic J. Decreased *NURR1* gene expression in patients with Parkinson's disease. (2008) *Journal of the neurological sciences* 273(1-2); 29-33.

- Lee DS. Real-time PCR Machine System Modeling and a Systematic Approach for the Robust Design of a Real-time PCR-on-a-Chip System. (2010) *Sensors* 10; 697-718.
- Lewis CM. Genetic association studies: design, analysis and interpretation. (2002) *Briefing in Bioinformatics* 3(2); 146-153.
- Lewis JV, Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. (2006) *Nature Protocol* 2(1); 141-151.
- Limón D, Patricio A, Mendieta L, Venegas B, Martínez JI. Mal de Parkinson: Un fragmento no tóxico de la toxina tetánica: probable alternativa en la terapéutica de esta enfermedad. (2008) *Articles the divulgation* 21-25.
- Lüdecke B, Bartholomé K. Frequent sequence variant in the human tyrosine *hydroxylase* gene. (1995) *Human Genetics* 95(6); 716.
- MacLennan KM, Cynthia LD, Smith PF. The CSN effects of *Ginkgo biloba* extracts and ginkgolide B. (2002) *Progress in Neurobiology* 67(3); 358-362.
- Mahadevan S, Park Y. Multifaceted Therapeutic Benefits of *Ginkgo biloba* L. Chemistry, Efficacy, Safety, and Uses. (2008) *Journal of food Science* 73(1); 14-19.
- Mandel S, Grunblatt E, Maor G, Youdim M. Early and Late Gene Changed in MPTP Mice Model of Parkinson's Disease Employing cDNA microarray. (2002) *Neurochemical Research* 27(10); 1231-1243.
- Marsden AC. Dopamine: the rewarding years. (2006) *British Journal of Pharmacology* 147(1); 36-144.
- Dale Martin. Sistema nervioso central: Otros neurotransmisores y neuromoduladores: Dopamina en Farmacología. Ed Harcourt, 4ª edición, Barcelona. 2000 Page: 517-535.
- Martinat C, Bacci J, Leete T, Kim J, Vanti W, Newman A, Cha J, Gether U, Wang H, Abeliovich A. Cooperative transcription activation by Nurr1 and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. (2006) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(8); 2874–2879.

- Maxwell S, Ho H, Kuehner E, Zhao E, Li M. Pitx3 regulates tyrosine hydroxylase expression in the *substantia nigra* and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development. (2005) *Developmental Biology* 282(2); 467- 479.
- McKenna DJ, Jones K, Hughes K. Efficacy, safety, and use of *Ginkgo biloba* in clinical and preclinical applications. (2001) *Alternative therapies in health and medicine* 7(5); 70-86, 88–90.
- Meredith G, Sonsalla P, Chesselet Marie-Francoise. Animal Models of Parkinson's disease Progression. (2008) *Acta neuropathologica* 115(4); 385-398.
- Miller R, Callahan L, Casaceli C, Chen L, Kiser GL, Chui Buena, Kaysser-Kranich TM, Sendera TJ, Palaniappan C, Federoff HJ. Dysregulation of Gene Expression in the 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Lesioned Mouse *Substantia Nigra*. (2004) *The Journal of Neuroscience* 24(34); 7445-7454.
- Missale C, Nash R, Robinson S, Jaber M, AND Caron M. Dopamine Receptors: From Structure to Function. (1998) *PHYSIOLOGICAL REVIEWS* 78(1); 189-225
- Miyamoto E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. (2006) *Journal of Pharmacological Science* 100(5); 433–442.
- Mizuno M, Droy-Lefaix MT, Packer L. *Ginkgo biloba* extract EGb 761 is a suppresser of AP-1 transcription factor stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate. (1996) *Biochemistry and molecular biology international* 39(2);395-401
- Moldzio Rudolf, Piskernik Christina, Radad Khaled, Rausch Wolf-Dieter. Rotenone Damages Striatum Organotypic Slice Culture. (2008) *Annals of the New York Academy of Sciences* 1148; 530–535.
- Morgan R. Engrailed: Complexity and economy of a multi-functional transcription factor. (2006) *Federation of European Biochemical Societies* 580; 2531-2533.

- Noble EP. D2 Dopamine receptor gene in psychiatric and neurologic disorders and its phenotypes. (2003) American Journal of Medical Genetics 16(1); 103-125.
- Numis A, Unger E, Sheridan D, Chisnell A, Andrew A. The Role of Membrane and Vesicular Monoamine Trnsporters in the Neurotoxic and Hipothermuc Effects of 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine. (2004) Molecular pharmacology 22(66); 718-727.
- Packer, L, Haramaki N, Kobuchi H, Christen Y, Droi Lefaix M . Antioxidant Properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761 and clinical implication. In: Natural Antioxidants Molecular Mechanisms and Health Effects. (1996) AOCS Press, Camping Illinois 472-487.
- Papanikolaou T, Amano T, Lennington J, Sink K, Farrar MA, Salamone J Yang, Conover JC. In-vitro analysis of Pitx3 in mesodiencephalic dopaminergic neuron maturation. (2009) The European Journal of Neuroscience 29(12); 2264–2275.
- Pattarini R, Rong Y, Qu2 C, Morgan J. Distinct mechanisms of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine resistance revealed by transcriptome mapping in mouse striatum. (2008) Neuroscience 155(4); 1174–1194.
- Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. (2003) Nucleic acids research 31(14); 73.
- Perrone-Capano C, Di P. Genetic and epigenetic control of midbrain dopaminergic neuron development. (2000) The International journal of developmental biology 44(6); 679–687.
- Perrone-Capano C, Pozzo PD, Di P. Epigenetic cues in midbrain dopaminergic neuron development. (2000) Neuroscience and biobehavioral reviews 24(1); 119-124.
- Piencemail J, Dupuis M, Nasr C, Hans P, Haag-Berrurier M, Anton R, Deby C. Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of *Ginkgo biloba* extract. (1989) Experimentia 45(8); 708-712.
- Pinilla G, Cubillos K, Rodríguez M. Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (2008) NVA - Publicación Científica en

- ciencias biomédicas. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 6(9); 1794-2470.
- Pfaffl M, Hageleit M. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. (2001) *Biotechnology letters* 23; 275–282.
 - Prasad TK, Anderson MD, Stewart CR. Acclimation, hydrogen peroxide, abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. (1994) *Plant physiology* 105(2); 619-627.
 - Prasad K, Winnik B, Thiruchelvam M, Buckley B, Mirochnitchenko, Richfield E. Prolonged Toxicokinetics and Toxicodynamics of Paraquat in Mouse Brain. (2007) *Environ Health Perspective* 115(10); 1448–1453.
 - Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini A, Jakowec M, Petzinger G, Miller R, Akram M. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. (2001) *Journal of Neurochemistry* 76(5); 1265-1274.
 - Przedborski, S. Vila M. The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydroxipiridine mouse model: A tool to explore the pathogenesis of Parkinson`s disease. (2003) *Annals of the New York Academy of Sciences* 991; 189-198.
 - Ramassamy C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. (2006) *European Journal of Pharmacology* 545(1); 51-64.
 - Rao, F, Zhang L, Wessel J, Zhang K, Wen G, Kennedy B, Rana B, Das M, Rodriguez-Flores J, Smith D, Cadman P, Salem R, Mahata S, Schork N, Taupenot L, Ziegler M, O'Connor D. Tyrosine hydroxylase, the rate-limiting enzyme in catecholamine biosynthesis: discovery of common human genetic variants governing transcription, autonomic activity, and blood pressure in vivo. (2007) *Circulation* 116(9); 993-1006.
 - Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE, Lang, AE. A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group. (2000) *The New England Journal of Medicine* 342(20); 1484–1491.

- Rawal N. Wnt/b-catenin Signaling in Midbrain Dopaminergic Neurons. (2006) Karolinska Institutet.
- Rimbach G, Wolfram S, Watanabe C, Packer L, Gohil K. Effect of *Ginkgo biloba* EGb 761®) on Differential Gene Expression. (2003) *Pharmacopsychiatry* 36(1); 95-99.
- Rojas P, Garduño B, Rojas C, Viguera RM, Castañeda-Rojas J, Ríos C, Serrano-García N. EGb761 Blocks MPP⁺ Induced Lipid Peroxidation in Mouse Corpus Striatum. (2001) *Neurochemical Research* 26(11); 1245-1251.
- Rojas P, Rojas C, Ebadi M, Montes S, Monroy-Noyola A, Serrano-García N. EGb 761 Pretreatment Reduces Monoamine Oxidase Activity in Mouse Corpus Striatum During 1-Methyl-4-Phenylpyridinium Neurotoxicity. (2004) *Neurochemical Research* 29(7); 1417-1423.
- Rojas P, Serrano-García N, Mares-Sámano J, Medina-Campos, Pedraza-Chaverri J, Ögren S. EGb761 protects against nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice: role of oxidative stress. (2008) *European Journal of Neuroscience* 28(1); 41-50.
- Royo M, Daubner C, and Fitzpatrick P. Effects of Mutations in Tyrosine Hydroxylase Associated With Progressive Dystonia on the Activity and Stability of the Protein. (2005) *Proteins* 58(1);14-21.
- Rudow G, O'Brien R, Savonenko AV, Resnick SM, Zonderman AB, Pletnikova O, Marsh L, Dawson TM, Crain BJ, West MJ, Troncoso JC. Morphometry of the human *substantia nigra* in ageing and Parkinson's disease. (2008) *Acta neuropathologica*. 115(4); 461–470.
- Rutledge R. G. Sigmoidal curve-fitting redefines quantitative real-time PCR with the prospective of developing automated high-throughput applications. (2004) *Nucleic Acids Research* 32(22); 178.
- Rutledge RG, Stewart D. A kinetic-based sigmoidal model for the polymerase chain reaction and its application to high-capacity absolute quantitative real-time PCR. (2008) *BMC Biotechnology* 8(8); 47.

- Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. (1995) *Free radical biology & medicine* 19(4); 481–486.
- Salvatore MF, Pruett SB, Spann SL, Dempsey C. Aging Reveals a Role for Nigral Tyrosine Hydroxylase ser31 Phosphorilation in locomotor Activity Generation. (2009) *PLoS One* 4(12); 8466.
- Samad T, Krezel W, Chambon P, Borrelli E. Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoic acid receptor-retinoid X receptor family. (1997) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(26); 14349-14354.
- Santini E, Valjent E, Fisone G. Parkinson's disease: levodopa-induced dyskinesia and signal transduction. (2008) *European journal of biochemistry / FEBS* 275(7); 1392-1399.
- Sastre J, Lloret A, Borrás C, Pereda J, Garcia-Sala D, Droy-Lefaix MT, Pallardo FV, Viña J. *Ginkgo biloba* extract EGb 761 protects against mitochondrial aging in the brain and in the liver. (2002) *Cellular and molecular biology* 48(6): 685-692.
- Saueressig H, Burrill J, Goulding M. Engrailed-1 and netrin-1 regulate axon pathfinding by association interneurons that project to motor neurons. (1999) *Development* 126: 4201-4212.
- Scearces M, Laz T, Hazel T, Lau L F, and Taub R. RNR-1, a Nuclear Receptor in the NGFI-B/Nur77 Family That Is Rapidly Induced in Regenerating Liver. (1993) *The Journal of biological chemistry* 268(12):8855-61.
- Schmidt N. and Ferger B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. J. (2001) *Journal of neural transmission* 108(11):1263-1282.
- Schmittgen T and Livak K. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. (2008) *Nature Protocols* 3; 1101-1108.
- Schneider J S, Anderson D W, and Decamp E. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydroxipridine induced mammalian models of Parkinson's

- disease: potential uses and misuses of acute, sub-acute, and chronic models. (2008) *The European journal of neuroscience* 28 (3); 610-7.
- Schrag A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease an update. (2004) *Journal of Neurology* 251(7); 795-804.
 - Sgado P, Albèri L, Gherbassi D, Galasso L, Ramakerd M, Alavian K, Smidt P, DycK R, and Simon H. Show progressive degeneration of nigral dopaminergic neurons in postnatal *Engrailed* mutant mice. (2006) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(41):15242-15247.
 - Sigma-Aldrich MSDS database, Product M1021, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine MSDS
 - Simola N, Morelli M, Carta A. The 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease. (2007) *Neurotoxicity Research* 11(3-4); 151-167.
 - Su SY, Hsieh CL, Wud SL, Cheng WY, Li CC, Lo HY, Ho TY, Hsiangf CY. Transcriptomic analysis of EGb 761-regulated neuroactive receptor pathway in vivo. (2009) *Journal of Ethnopharmacology* 4; 123(1) 68–73.
 - Shi C, Zhao L, Zhu B, Li Q, Yew T, Yao Z, and Xu J. Dosage effects of EGb761 on hydrogen peroxide-induced cell death in SH-SY5Y cells. (2009) *Chemico-biological interactions* 180 (3), 389–397.
 - Shi C, Zhao L, Zhu B, Li, Yew Q, Yao Z, Xu J. Protective effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb761) and its constituents quercetin and ginkgolide B against beta-amyloid peptide-induced toxicity in SH-SY5Y cells. (2009) *Chemico-biological interactions* 181(1); 115–123.
 - Shioda N, Takeuchi Y, and Fukunaga K. Advanced Research on Dopamine Signaling to Develop Drugs for the Treatment of Mental Disorders: Proteins interacting With the Third Cytoplasmic Loop of Dopamine D2 and D3 Receptors.(2010) *Journal of Pharmacological Sciences* 114(1);25-31
 - Shults W, Oakes D, Kieburtz K, Beal M, Haas R, Plumb S, Juncos J, Nutt J, Shoulson I, Carter J, and Kompoliti K, Perlmutter J, Reich S, Stern M, Watts R, Kurlan R, Molho E, Harrison M, Lew M, and Parkinson Study Group., Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of

- slowing of the functional decline. (2002) Archives of Neurology 59(10): p. 1541-50.
- Simon H, Saueressig H, Wurst W, Goulding M, and O'Leary D. Fate of Midbrain Dopaminergic Neurons Controlled by the *Engrailed* Genes. (2001) Journal Neuroscience 21(9): 3126-3134.
 - Singh K, Singh S, Singhal NK, Sharma A, Parmar D. Nicotine- and caffeine-mediated changes in gene expression patterns of MPTP-lesioned mouse striatum: Implications in neuroprotection mechanism. (2010) Chemico-Biological Interactions 185(2); 81-93.
 - Smeyne JR, Lewis JV. The MPTP model of Parkinson's disease. (2005) Molecular brain research 134(1); 57-66
 - Smith J, Luo Y. Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by *Ginkgo biloba* extract EGb 761. (2003) Journal Alzheimer Disease 5(4); 287–300.
 - Smith JV, Luo Y. Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract. (2004) ApplMicrobiol Biotechnol 64(4); 465–72.
 - Sofiyan Saleem, Hean Zhuang, Shyam Biswal, Yves Christen, Sylvain Dore. *Ginkgo Biloba* Extract Neuroprotective Action Is Dependent on Heme Oxygenase 1 in Ischemic Reperfusion Brain Injury. (2008) Stroke 39(12); 3389-3396.
 - Somayajulu-Nițu M, Sandhu J, Cohen J, Sikorska M, Sridhar T, Matei A, Borowy-Borowski H, Pandey S. Paraquat induces oxidative stress, neuronal loss in *substantia nigra* region and Parkinsonism in adult rats: Neuroprotection and amelioration of symptoms by water-soluble formulation of Coenzyme Q10. (2009) BMC Neuroscience. 27(10); 88.
 - Spencer P, Rice-Evans C, and Williams J. Modulation of Pro-survival Akt/Protein Kinase B and ERK1/2 Signaling Cascades by Quercetin and Its in vivo Metabolites Underlie Their Action on Neuronal Viability. (2003) The Journal of Biological Chemistry 278(37), 34783–34793.
 - Stanley F. Clinical aspect of Parkinson Disease. Department of Neurology, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, New York, NY. 2008. 3-10.

- Guenin S, Mauriat M, Pelloux J, Wuytswinkel O, Bellini C, and Gutierrez L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. (2009) *Journal of Experimental Botany* 60, (2); 487–493.
- Su S-Y, Ching-Liang, Shin-Lu W, Wen-Yu, Chian-Cheng L, Hsin-Yi L, Tin-Yun H and Chien-Yun H. Transcriptomic analysis of EGb 761-regulated neuroactive receptor pathway in vivo. 2009 *Journal of Ethnopharmacology* 123(1); 68-73.
- Surratt C, Persico M, Yang X-D, Edgar S, Bird S, Hawkins L, Griffin A, Li X, Jabs W, Uhl R. A human synaptic vesicle monoamine transporter cDNA predicts posttranslational modifications, reveals chromosome 10 gene localization and identifies TaqI RFLPs. (1993) *FEBS Letters* 318(3); 325-330
- Sy HN, Wu SL, Wang WF, Chen CH, Huang YT, Liou YM, Chiou CS, Pawlak CR, Ho YJ. MPTP-induced dopaminergic degeneration and deficits in object recognition in rats are accompanied by neuroinflammation in the hippocampus. (2010) *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 95(2); 158-165.
- Tanji H, Araki T, Nagasawa H and Itoyama Y. Differential vulnerability of dopamine receptors in the mouse brain treated with MPTP. (1999) *Brain Research* 824(2); 224-231
- Tank W, Xua L, Chenb X, Radcliffec P, and Sterlinga C. Post-transcriptional Regulation of Tyrosine Hydroxylase Expression in Adrenal Medulla and Brain. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 December ; 1148: 238–248
- Tchanchou F, Xu Y, Wu Y, Christen Y, and Luo Y. EGb 761 enhances adult hippocampal neurogenesis and phosphorylation of CREB in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. (2007) *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21(10); 2400-2408.
- Terzioglu M and Galter D. Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent Models. (2008) *European journal of biochemistry* 275(7); 1384–1391.

- Thomas A, Lacono D, Luciano AL, Armellino K, Di Lorio A, Onofrj M. Duration of amantadine benefit on dyskinesia of severe Parkinson's disease. (2004) J Neurol Neurosurg Psychiatry 75(1); 141–143
- Tolwani RJ, Jakowec MW, Petzinger GM, Green S, Waggle K. Experimental Models of Parkinson's disease: Insights from Many Models. (1999) Laboratory Animal Science 49(4); 363-371.
- Tredici Del P. Ginkgos and multituberculates: evolutionary interactions in the Tertiary. (1989) Biosystems 22(4):327-337.
- Turrens J. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. (2003) The Journal of physiology 552.2; 335–344.
- Ulrich D, Bettler B. GABA (B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. (2007) Current Opinion in Neurobiology 17(3); 298–303.
- Usiello A, Baik JH, Rouge-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. (2000) Nature 408(6809); 199–203.
- Valasek M and. Repa J. The power of real-time PCR. (2005) Advances in physiology education 29: 151–159
- Vallote D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. (2000) Neuroscience and Biobehavioral Review 24(1); 125-132.
- Van G, Vrana K, Freeman W. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. (2008) BioTechniques 44(5); 619-626.
- Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D, Korsmeyer SJ, Przedborski S. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl- 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease.(2001) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98(5); 2837-2842
- Vitalis T, Cases O, Parnavelas JG. Development of the dopaminergic neurons in the rodent brainstem. (2005) Experimental neurology 191(Suppl 1); S104-S112
- Volpicelli F, Caiazzo M, Greco D, Consales C, Leone L, Perrone-Capano C, D'Amato L, and Porzio U . *Bdnf* gene is a downstream target of Nurr1

- transcription factor in rat midbrain neurons in vitro. (2007) *Journal of Neurochemistry* 102(2), 441–453.
- Vukhac K-L, Sankoorikal E-B, Wang Y. Dopamine D2L receptor- and age-related reduction in offensive aggression. (2001) *NeuroReport* 12(5); 1035–1038.
 - Wang Y, Xu R, Sasaoka T, Tonegawa S, Kung MP, Sankoorikal EB. Dopamine D2 long receptordeficient mice display alterations in striatum-dependent functions. (2000) *Journal of Neurosciences* 20(22); 8305–8314.
 - Wang, L.; Matsushita, K.; Araki, I.; Takeda, M. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase ameliorates apoptosis induced by hydrogen peroxide in the kidney tubule epithelial cells (NRK-52E). (2002) *Nephron* 91(1); 142–147
 - Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, Xu H, Walker P, Perlmann T. Structure and function of *Nurr1* identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. (2003) *Nature* 423(6939); 555–560.
 - Wang X and Seed B. A PCR primer bank for quantitative gene, expression analysis. (2003) *Nucleic Acids Research* 31 (24); e154.
 - Wang J, Duhart HM, Xu Z, Patterson TA, Newport GD, Ali SF. Comparison of the time courses of selective gene expression and dopaminergic depletion induced by MPP⁺ in MN9D cells. (2008)*Neurochemistry international* 52(6); 1037-43.
 - Watanabe M, Wolfram S, Ader P, Rimbach G, Packer L, Maguire J, Schultz G, Gohil K. The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine *Ginkgo biloba*. (2001) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(12); 6577–6580.
 - Winnik B, Barr D, Thiruchelvam M, Montesano M, Richfield R and Buckley B. Quantification of Paraquat, MPTP, and MPP⁺ in brain tissue using microwave-assisted solvent extraction (MASE) and high-performance liquid Chromatography–mass spectrometry. (2009) *Analytical and bioanalytical chemistry* 395(1); 195–201.
 - Wise R.A. Neurobiology of addiction. (1996) *Current Opinion in Neurobiology* 6(2); 243-251.

- Xin W, Wei T, Chen C, Ni Y, Zhao B, Hou J. Mechanisms of apoptosis in rat cerebellar granule cells induced by hydroxyl radicals and the effects of EGb761 and its constituents. (2000) *Toxicology* 148(2-3); 103–110.
- Xu Y, Le D. Novel splicing variant of the human orphan nuclear receptor *Nurr1* gene. (2004) *Chinese medical journal* 117(6); 899–902.
- Xu Z, Cawthon D, McCastlain A, Slikker W and Ali F. Selective Alterations of Gene Expression in Mice Induced by MPTP. (2005) *Synapse* 55:45-51.
- Yelin R, Schuldiner S. Vesicular neurotransmitter transporters: pharmacology, biochemistry, and molecular analysis. In: Reith MEA, ed. *Neurotransmitter Transporters; Structure, Function, and Regulation*. (2002) 2nd Totowa, NJ : Humana Press 313- 354.
- Yao Z, Drieu K, Papadopoulos V. The *Ginkgo biloba* extract EGb 761 rescues the PC12 neuronal cells from β -amyloid-induced cell death by inhibiting the formation of β -amyloid-derived diffusible neurotoxic ligands. *Brain Research* 889(1-2); 181-190.
- Yuan J, Reed A, Chen F, Stewart N. Statistical analysis of real-time PCR data. (2006) *BMC Bioinformatics* 7(85); 1-12.
- Zec N, Rowitch DH, Bitgood MJ, Kinney HC. Expression of the homeobox-containing genes *EN1* and *EN2* in human fetal midgestational medulla and cerebellum. (1997) *Journal of neuropathology and experimental neurology* 56: 236-242
- Zhang T, Wang P, Ren H, Fan J and Wang G. (2009) NGFI-B Nuclear Orphan Receptor *Nurr1* Interacts with p53 and Suppresses Its Transcriptional Activity. *Molecular cancer research* 7(8):1408-15.
- Zhao Q, Gao J, Li W, Cai D. Neurotrophic and neurorescue effects of Echinacoside in the subacute MPTP mouse model of Parkinson's disease. (2010) *Brain Research* 30 (1346); 224-236
- Zheng G, Dwoskin L, and Crooks A. Vesicular Monoamine Transporter 2: Role as a Novel Target for Drug. (2006) *The AAPS Journal* 8(4); E682-E692.
- Zhou Z, Zheng S. "Palaeobiology: The missing link in *Ginkgo* evolution". (2003). *Nature* 423 (6942): 821.

Sitios Web Consultados

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/21823> accesada el 11/11/2010
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/18742> accesada el 11/11/2010
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/214084> accesada el 11/11/2010
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13798> accesada el 11/11/2010
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13489> accesada el 11/11/2010
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/18227> accesada el 11/11/2010
- <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/15596018%20pps%20Trizol%20Reagent%20061207.pdf> accesada el 11/11/2010
- http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mmlv_rt_man.pdf accesada el 11/11/2010

7. ANEXOS

7.1 Anexo Resultados

Resultados de los genes en porcentaje.

Gen Nurr 1

Región cerebral	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Mesencéfalo	100% _{NSC}	87% _{NCSC}	42% _{NCSC}	58% _{AMSIII*}
Estriado	100% _{NSC}	82% _{NCSC}	147% _{AMSC*}	64% _{DMSCIII*}
Corteza prefrontal	100% _{NSC}	175% _{AMSC***}	72% _{DMSC**}	45% _{DMSIII**}
Hipocampo	100% _{NSC}	268% _{AMSC***}	137% _{NCSC}	88% _{NCSC}
Hipotálamo	100% _{NSC}	167% _{NCSC}	47% _{DMSC***}	104% _{DMSIII**}

Gen Pitx 3

Región cerebral	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Mesencéfalo	100% _{NSC}	70% _{NCSC}	55% _{NCSC}	29% _{DSMSIII*}
Estriado	100% _{NSC}	111% _{NCSC}	74% _{NCSC}	63% _{NCSC}
Corteza prefrontal	100% _{NSC}	32% _{DMSC*}	50% _{DMSC*}	26% _{DMSC*}
Hipocampo	100% _{NSC}	84% _{NCSC}	110% _{NCSC}	49% _{NCSC}
Hipotálamo	100% _{NSC}	93% _{NCSC}	17% _{DMSC***}	27% _{DMSC***}

Gen Th

Región cerebral	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Mesencéfalo	100% _{NSC}	54% _{DSMSC***}	52% _{DSMSC***}	51% _{DSMSC***}
Estriado	100% _{NSC}	79% _{NCSC}	66% _{NCSC}	43% _{DSMSIII***}
Corteza prefrontal	100% _{NSC}	82% _{DSMSC*}	82% _{NCSC}	32% _{DSMSIII*}
Hipocampo	100% _{NSC}	77% _{NCSC}	66% _{NCSC}	70% _{NCSC}
Hipotálamo	100% _{NSC}	164% _{NCSC}	160% _{AMSC**}	95% _{DSMSIII**}

Gen D2R

Región cerebral	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Mesencéfalo	100% _{NCS}	87% _{NCSC}	72% _{DSMSC**}	88% _{AMSIII**}
Estriado	100% _{NCS}	99% _{NCSC}	105% _{NCSC}	105% _{NCSC}
Corteza prefrontal	100% _{NCS}	24% _{NCSC}	57% _{NCSC}	99% _{NCSC}
Hipocampo	100% _{NCS}	281% _{NCSC}	119% _{NCSC}	117% _{NCSC}
Hipotálamo	100% _{NCS}	122% _{NCSC}	101% _{NCSC}	126% _{NCSC}

Gen DAT

Región cerebral	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Mesencéfalo	100% _{NCS}	68% _{NCSC}	43% _{NCSC}	46% _{NCSC}
Estriado	100% _{NCS}	203% _{NCSC}	269% _{NCSC}	209% _{NCSC}
Corteza	100% _{NCS}	53% _{NCSC}	23% _{DSMSC**}	32% _{DSMSC**}

prefrontal				
Hipocampo	100% _{NCS}	116% _{NCSC}	12% _{DSMSC*}	62% _{AMSIII**}
Hipotálamo	100% _{NCS}	106% _{NCSC}	18% _{DSMSC***}	35% _{NCSC}

Gen *Vmat 2*

Región cerebral	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Mesencéfalo	100% _{NCS}	117% _{NCSC}	87% _{NCSC}	88% _{NCSC}
Estriado	100% _{NCS}	116% _{NCSC}	69% _{NCSC}	54% _{NCSC}
Corteza prefrontal	100% _{NCS}	100% _{NCSC}	177% _{AMSC**}	60% _{DSMSIII**}
Hipocampo	100% _{NCS}	96% _{NCSC}	162% _{NCSC}	148% _{NCSC}
Hipotálamo	100% _{NCS}	119% _{NCSC}	83% _{NCSC}	75% _{NCSC}

Gen *EN 1*

Región cerebral	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Mesencéfalo	100% _{NCS}	77% _{NCSC}	106% _{NCSC}	83% _{NCSC}
Estriado	100% _{NCS}	83% _{NCSC}	32% _{DSMSC***}	64% _{AMSIII*}
Corteza prefrontal	100% _{NCS}	447% _{AMSC***}	129% _{NCSC}	88% _{NCSC}
Hipocampo	100% _{NCS}	171% _{AMSC**}	71% _{NCSC}	90% _{NCSC}
Hipotálamo	100% _{NCS}	155% _{NCSC}	120% _{NCSC}	132% _{NCSC}

Grupo 1: Salina-Salina; Grupo II EGb 761-Salina; Grupo III MPTP-Salina; Grupo IV MPTP-EGb 761. NCS (no hay diferencia significativa); NCSC (no hay diferencia significativa con el control); AMSC (aumento significativo con el control); AMSCIII (aumento significativo con el grupo III); DSMSC (Disminución significativa con el control); DSMSCIII (disminución significativa con el grupo III); control (grupo Salina-Salina); EGb 761 (Ginkgo Biloba); MPTP(1-metil-4-Fenil-2,3,6-tetrahidropiridina), significancia estadística $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** y $p < 0.001$ *** prueba estadística de Duncan.

7.2 Anexo 1 Metodología

Extracción de RNA total

1. Al Trizol se le agregó glicógeno a una concentración de 200µg/mL, el cual al ser un acarreador permitió obtener una mayor cantidad de RNA total.
2. De esta mezcla se agregaron 801µL por cada tejido cerebral y se realizó sonicación mediante homogenizador (Cole Parmer). El pistilo fue previamente lavado con RNAsa (CONTINENTAL LAB. PRODUCTS S.A DE C.V.) y enjuagadas con agua DEPC (dietilpirocarbamato SIGMA-ALDRICH) al 1.0%.
3. Al homogeneizado se agregaron 160µL de cloroformo grado molecular (SIGMA-ALDRICH), agitando durante 15 segundos vigorosamente en el VORTEX-GENIE2 (Scientific Industries), para su posterior reposo durante 3 minutos a temperatura ambiente.
4. Posteriormente la muestra se centrifugo a 10500 g por 15 minutos a 4°C, eliminando los restos celulares. En este paso se formaron tres fases por diferencia de densidad: la fase fenólica-orgánica que contiene las proteínas, la interfase que contiene al DNA y la fase superior acuosa la cual contiene el RNA total.
5. La fase acuosa se transfirió a un tubo ependorf de 1.5mL, adicionando 500µL de isopropanol grado molecular (SIGMA-ALDRICH) para precipitar el RNA total.
6. Se dejó por una hora a -20°C para que se llevara a cabo la precipitación del RNA, y posteriormente se centrifugo a 10500g por 10 minutos a 4°C.
7. El precipitado del RNA total obtenido fue lavado con etanol al 75% y se centrifugo por 5 minutos a 7500 x g a 4°C. Posteriormente el botón se seco al aire durante 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Al final el botón de RNA se disolvió de 50-100µL de agua libre de RNAsas (Fluka), la cantidad de agua dependió del tamaño del botón, se agito y se tomo una alícuota de 10µL para cuantificar y determinar la integridad del RNA total. El resto del RNA total se almaceno a -20°C para los subsecuentes ensayos.

7.2 Anexo 2

Determinación de la concentración, pureza en integridad del RNA total

Se mezclaron 5mL de la mezcla de RNA total con el buffer de carga (el cual contiene 30% de glicerol, 0.25% de azul de bromo fenol). La electroforesis se llevo a 100 voltios durante 45 minutos en una cámara de electroforesis (Thermo SCIENTIFIC OWL EASYCAST™ BIA). El RNA se observó en el transiluminador Electronic U.V. (ULTRA-LUM) con luz ultravioleta a 260nm. La radiación UV es absorbida por el RNA y emitida al bromuro de etidio que a su vez remite la radiación a 590nm en la región rojo-naranja del espectro visible.

Para preparar el gel se requirieron los siguientes reactivos:

- Agarosa (AMIRESSCO, AGAROSE I™)
- Solución amortiguadora de corrida TAE al 1% (triz pH 8.3, ácido acético glacial y EDTA 2mM)
- Bromuro de etidio 2mg/mL

7.3 Anexo 3

Reacción de transcriptasa reversa

El CDNA se sintetizó a partir del RNA total obtenido de las 6 regiones cerebrales en estudio utilizando oligos al azar (Random Primer) 3 µg/µL (invitrogen) y oligo dT 5µg/µl (Invitro). Las moléculas de mRNA actúan como molde, mientras que los oligos al azar (random primer) y oligo dT actúan como cebador. Además de que se requieren dinucleótidos trifosfatados (dNTP`s) que funcionan como sustratos para la transcriptasa reversa M-MLV 200u/mL (invitrogen), de lo que resulta una hebra de DNA complementaria o cDNA. Mientras que el oligo dT utilizado (invitro) se adhiere a la cola poliA del mRNA. Posteriormente se procedió a realizar los cálculos utilizando 2µg de RNA total obtenido para la reacción de transcriptasa reversa

El proceso de la transcriptasa reversa se llevo en dos pasos:

Reacción de transcriptasa reversa para un volumen de 20µl usando 2µg de RNA total

1. Se adicionaron los siguientes compuestos en tubos de microcentrifuga libres de nucleasas:

1µl de oligo (dT) 0.5mg/mL (Roche o invitrogen) ó bien oligo al azar (Random Primer) 3 µg/µL (invitrogen)

2µg de RNA total

0.4mL de d`NTPs 25mM mezcla (10mM cada dATP, dGTP, dCTP, y dTTP a pH neutro)

Agua destilada estéril

2. La mezcla se incubó a 65°C por 5 minutos en ACCU BLOCK™ Digital Dry BaTh (Labnet International) para permitir el alineamiento del oligo (dT) (Roche ó invitrogen) con la cola poly-A del RNA mensajero. Y rápidamente se pasó a hielo en el cual estuvo 1 minuto, la cual permitió que las cadenas se mantuvieran desnaturalizadas.

Posteriormente se preparó la segunda mezcla la cual contenía

5µL de Buffer 5X FS (invitrogen)

1µL de DDT 0.1M (invitrogen)

1µL de Rnasa OUT 40u/µl (invitrogen).

3. Se mezcló el contenido del tubo gentilmente y se incubó por 2 minutos a 37°C,
4. Se adicionó 1µL de transcriptasa Reversa M-MLV RT 200u/ml mezclando por pipeteo arriba y abajo. En las reacciones en donde se utilizó oligos al azar (Random Primer) 3µg/µL (Invitrogen) se incubó a 25°C por 10 minutos después de haber agregado 1µl de la enzima M-MLVRT 200u/ml (invitrogen) Incubamos 50 minutos a 37°C.
5. Se inactivó la reacción incubando por 15 minutos a 70°C (al desactivar la transcriptasa) y posteriormente se colocaron en hielo.

REACCION DE QRT-PCR

La amplificación y cuantificación se llevó a cabo mediante RT-PCR, utilizando sondas Taqman para los genes *TH*, *Pitx 3*, *Vmat 2*, *DAT*, *Nurr 1* y *GAPDH*; mientras que para los genes tales como *D2R*, *EN 1* y *GAPDH* se utilizó el SYBR GREEN; las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador de la marca Corbert 6000.

Para la reacción se utilizaron tubos de PCR libres de RNasas (CONTINENTAL LAB. PRODUCTS S.A DE C.V.), con un volumen final de reacción de 15µl. Debido a que se utilizaron sondas TaqMan, como colorantes

inespecíficos como el SYBR Green, se emplearon dos reacciones utilizando reactivos distintos por lo que, se citará para cada caso los reactivos utilizados en el proceso experimental.

La reacción utilizando Sondas TaqMan, los reactivos empleados fueron:
 -0.8µl de cDNA obtenido de la transcriptasa reversa con concentración 2µg/mL
 -8µl de Master Mix de la marca (Applied Biosystems)
 -6.4µl de agua libre de RNasas (Fluka)
 -0.8µl de la sonda TaqMan (Applied Biosystems); en este caso se empleo una sonda específica para cada gen a analizar en nuestras muestras.

La reacción utilizando SYBR Green, los reactivos empleados fueron:
 -0.8µl de cDNA obtenido de la transcriptasa reversa con concentración 2µg/mL
 -8µl de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Byosistem) y SYBR® Green I (TAKARA BIO INC)
 -5.6µl de agua libre de RNasas (Fluka)
 -0.8µl del oligo (*D2R*, *EN 1*, *GAPDH*) a una concentración de 50ng/µL (XX IDT); en este caso se empleo el oligo correspondiente a la reacción.

El tejido utilizado en cada reacción comprendió a los grupos tratados y los grupos controles, de las que se analizaron las 6 regiones cerebrales (Me,St, Cx,Hyp,Hp,y Cer)

Las reacciones se incubaron en el carrusel del Rotor Gene 6000, con capacidad de 36 tubos. Los perfiles editados fueron los siguientes:

Perfiles para Sondas TaqMan

	Temperatura	Tiempo (minutos)
Hold1	50°C	2 minutos
Hold2	95°C	10 minutos

Ciclaje

Gen	Desnaturalización		Ciclaje 40 ciclos		
	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo	
<i>Th-Pitx 3</i>	95°C	15 segundos	60°C	60 segundos	Green
<i>Vmat 2-DAT</i>	95°C	15 segundos	60°C	60 segundos	Green
<i>GAPDH</i>	95°C	15 segundos	60°C	60 segundos	Yellow
<i>Nurr 1-GAPDH</i>	95°C	15 segundos	60°C	60 segundos	Green Yellow

Perfiles para SYBR Green
 Utilizando SYBR Green (Applied Biosystem)

	Temperatura	Tiempo (minutos)
Hold1	50°C	2 minutos
Hold2	95°C	2 minutos

Ciclaje

	Desnaturalización		Ciclaje 40 ciclos				
Gen	Desnaturalización		Alineamiento		Melting		
<i>D2R</i>	95°C	30s	58°C	40s	72°C	40s	Green
<i>En 1</i>	94°C	20s	59°C	30s	72°C	30s	Green
<i>GAPDH</i>	95°C	30s	58°C	40s	72°C	40s	Green

Perfiles para SYBR Green
 Utilizando SYBR Green (TAKARA INC)

	Temperatura	Tiempo (minutos)
Hold2	95°C	2 minutos

Ciclaje

	Desnaturalización		Ciclaje 40 ciclos				
Gen	Desnaturalización		Alineamiento		Melting		
<i>D2R</i>	95°C	15s	58°C	40s	72°C	40s	Green
<i>En 1</i>	94°C	20s	59°C	30s	72°C	30s	Green
<i>GAPDH</i>	95°C	15s	58°C	40s	72°C	40s	Green