

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

Carrera de Biología

EFFECTO NEUROPROTECTOR DEL EGb 761 EN LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA APOPTOSIS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A
O R L A N D O C A S A D O S D E L G A D O

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA ROJAS CASTAÑEDA
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"

ASESORA INTERNA: M. EN IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

DIRECTORA DE TESIS

ASESORA INTERNA



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.

Dedicatorias

A mi madre que ha sido fuente de vida, que sus enseñanzas y ejemplo perduraran para toda mi vida y sus cuidados los llevo en mi corazón, Te amo con todo mi corazón mi madre hermosa y te dedico esta tesis.

A mi padre que ha sido y será mi héroe personal porque a pesar de que la vida le ha dado una carga pesada él me ha enseñado valor y verdadera fortaleza, amo con todo mi corazón a mi papi querido y te dedico esta tesis.

A mi abuela Victoria Montiel que de seguro aun vela por mí, una verdadera buena persona, te extraño mucho.

Quiero dedicar muy especialmente esta tesis a mi hijo primogénito aunque aún no nace ha sido el hijo más esperado y seguro el más querido y del que seré el padre más orgulloso.

Dedico esta tesis a Julieta Guadarrama Martínez, mi mejor amiga, mi cómplice, la mujer que vela por mí y me mantiene cuerdo, el amor de mis amores y con la que quiero terminar mis días, a la cual AMO con toda mi alma, gracias mi angelito de luz.

Agradecimientos

Quiero agradecer antes que todo a mis padres: Rosa Delgado Vázquez y Eleazar Casados Montiel por darme la oportunidad de realizarme como estudiante apoyarme en todo momento, LOS AMO.

Esta tesis ha sido realizada con algunos contratiempos y con mucho esfuerzo, por lo que le tome especial afecto. Quiero agradecer principalmente a la Dra. Patricia Rojas Castañeda que aparte de directora de mi tesis, ha sido un ejemplo de disciplina, esfuerzo y superación. También quiero mencionar y agradecer a la futura doctora Elizabeth Ruiz Sánchez con quien desarrollé gran parte del procedimiento experimental del proyecto y en general a los compañeros y amigos del laboratorio de Neurotoxicología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velazco Suárez”.

Agradezco a la Maestra Angélica Flores Ramírez directora interna de mi tesis por haberse tomado el tiempo, la atención y amabilidad en mis revisiones de las cuales aprendí mucho.

A Ricardo Mar Rodríguez, por convertirse en una parte muy importante de mi vida y crecer junto a mí y ser un gran amigo.

Quiero agradecer al Dr. Aldo Reséndiz Albor por darme la oportunidad de terminar la tesis mientras estudiaba la maestría y también por abrirme las puertas de la ESM y el IPN.

También quiero agradecer a todas aquellas personas que creyeron en mí, amigos, familiares, profesores y personas que marcaron mi vida como estudiante.

A Davis y a Lichas que fueron parte fundamental de mi formación y me ayudaron a crear fuertes vínculos antropológicos. Por su puesto a Goku por enseñarme a no rendirme nunca aunque parezca imposible de lograr una meta y a Wikipedia y google traductor que si ellos yo no sería nada.

Por último y no menos importante, quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de conocer a excelentes personas y hacer grandes amigos.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Enfermedad de Parkinson	6
1.1.1 Síntomas	7
1.1.2 Tratamiento	8
1.1.2.1 Tratamientos farmacológicos	8
1.1.2.2 Tratamiento no farmacológico	12
1.1.3 Mecanismos propuestos de daño celular en la EP	14
1.1.3.1 Estrés oxidativo	15
1.1.3.2 Disfunción mitocondrial	16
1.1.3.3 Apoptosis	17
1.2 Modelos neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson	20
1.2.1 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)	20
1.2.2 Paraquat	21
1.2.3 6-OHDA (6-Hidroxidopamina)	21
1.2.4 Rotenona	22
1.3 Extracto de <i>Ginkgo biloba</i> (EGb 761)	22
2 JUSTIFICACIÓN	28
3 HIPÓTESIS	28
4 OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos particulares	29
5 MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 Animales	29
5.2 Formación de grupos	29
5.3 Grupos experimentales	26
5.4 Disección de las regiones cerebrales	30
5.5 Extracción de RNA total	30
5.6 Análisis estadístico	31
6 RESULTADOS	33
7 DISCUSIÓN	42
8 CONCLUSIONES	46
9 REFERENCIAS	47

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo crónico, caracterizado por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta (SNpc) y disminución de la concentración del neurotransmisor dopamina (DA) en el cuerpo estriado. La muerte de las neuronas dopaminérgicas por apoptosis es considerada como uno de los principales mecanismos que promueven la disminución en la concentración de DA y por consecuencia la aparición de los síntomas motores en la EP y en el modelo experimental de la EP inducido con la neurotoxina 1-metil-1-,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Por otra parte, el EGb 761 es una mezcla patentada de compuestos activos, la cual es extraída y estandarizada a partir de las hojas del árbol de *Ginkgo Biloba*. Se ha propuesto que el EGb 761 tiene efectos antiapoptóticos debido a que estimula la expresión de genes antiapoptóticos como Bcl-2 y reprime la expresión de genes proapoptóticos tal como Bax y Caspasa 3 además de poseer propiedades antioxidantes y atrapador de radicales libres; por ende tiene actividad neuroprotectora y antiapoptótica. En el presente estudio se analizó el papel antiapoptótico del EGb 761 ante el daño inducido por la neurotoxina MPTP, usado como modelo experimental la EP. Los experimentos fueron realizados con ratones machos de la cepa C-57 black (25-30 g), de 11 a 13 semanas de edad, a los cuales se administró la MPTP intraperitonealmente (30 mg/kg) durante 5 días. Posteriormente se les administró EGb 761 intraperitonealmente (40 mg/kg) a dos tiempos (7 y 18 días). Se analizó el cambio en la tasa de expresión de mRNA de Bax/Bcl-2 y el cambio de la expresión del mRNA de Caspasa 3 por medio de RT-PCR. Los resultados muestran que se presentó disminución significativa en la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 a 7 días en el grupo MPTP-EGb 761 en relación al grupo control (MPTP-Salina), lo que nos indica que el EGb 761 promueve la supervivencia neuronal dopaminérgica actuando como un compuesto antiapoptótico. Mientras que en la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 del grupo MPTP-EGb 761 no se observaron diferencias significativas en el cambio de la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en relación al grupo control (MPTP-Salina). También se observó disminución en los niveles de expresión del mRNA de Caspasa 3 a 7 días en el grupo MPTP-EGb 761 en relación al grupo control (MPTP-Salina). A 18 días no se observaron diferencias en los niveles de expresión del mRNA de caspasa 3 en el grupo MPTP-EGb 761 con respecto al grupo control (MPTP-Salina). Con base en los resultados, en el presente estudio, se demostró que el EGb 761 es capaz de modular la expresión de los genes relacionados con la cascada apoptótica y restablecer su expresión a los niveles basales, lo que proporciona un efecto de neuroprotección ante el daño provocado por la neurotoxina MPTP.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad de Parkinson

La Enfermedad de Parkinson (EP) afecta aproximadamente al 2 % de la población de adultos mayores de 60 años, hombres y mujeres por igual (Mayeux y col., 1995; Tandberg y col., 1995). En México según cifras dadas por la Secretaria de Salud (SSA) se ha estimado una prevalencia entre 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes/año, con una edad promedio inicial de 55 años, y se ha calculado una duración media de la enfermedad de 10 a 13 años (Schüpbach y col., 2007). Actualmente se desconocen las causas de la muerte neuronal que generan la EP, sin embargo, se postula que el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, toxinas exógenas, acumulación intracelular de metabolitos tóxicos, infecciones virales, excitotoxicidad y deficiencias de factores neurotróficos, pueden favorecer la aparición de la muerte neuronal y con ello los síntomas de la EP (Langston y col., 1987; Bronstein y col., 2010).

La EP es un padecimiento neurodegenerativo y progresivo que se caracteriza por desórdenes del movimiento con patología y clínica bien definida (Dauer y Przedborski, 2003), caracterizada por la pérdida neuronal que ocasiona la disminución en la producción y disponibilidad de dopamina (DA) y que se manifiesta con pérdida en el control del movimiento (Nikolova, 2012). En estudios postmortem se ha demostrado que la vía dopaminérgica es especialmente vulnerable a los efectos que se generan con la edad (Stark y Pakkenberg, 2004). La DA es un mensajero químico sintetizado principalmente en la sustancia nigra pars compacta (SNpc) que transmite las señales responsables del control del movimiento. La pérdida de DA provoca que las células nerviosas del cuerpo estriado (CE) actúen sin control, dejando a los pacientes incapaces de dirigir o controlar sus movimientos de forma normal (Orr y col., 2002). Los síntomas motores de la EP aparecen cuando la pérdida dopaminérgica en el CE es aproximadamente del 80% y la muerte neuronal en la SNpc es aproximadamente del 60% (Schulz y Falkenburger, 2004).

1.1.1. Síntomas

Los síntomas de la EP se pueden clasificar en síntomas motores y no motores.

1.1.1.1. Síntomas motores

La EP se manifiesta clínicamente por síntomas motores tales como temblor, inestabilidad de postura, lentitud al iniciar y realizar un movimiento voluntario (bradicinesia) y rigidez muscular (Cohen, 1999).

El temblor es el síntoma característico que afecta aproximadamente al 70% de los pacientes con EP. Se presenta principalmente en las extremidades superiores en estado de reposo y éste puede aumentar en presencia de problemas emocionales o cansancio y tiende a desaparecer durante el sueño. En pacientes jóvenes dicho temblor se manifiesta de manera asimétrica y en el grupo de edad avanzada es invariablemente bilateral y puede afectar otras partes del cuerpo incluyendo la cabeza o el cuello (Findley y col., 1981). El temblor en reposo es el síntoma más frecuente aunque no el más incapacitante (Utter y Basso, 2008)..

La bradicinesia es la lentitud en la ejecución del movimiento voluntario, los movimientos espontáneos están disminuidos o desaparecen (acinesia). La expresión facial disminuye o se pierde, se les dificulta iniciar y detener los movimientos. La combinación de la rigidez y la bradicinesia afecta el habla y la escritura, lo cual reduce considerablemente el volumen de la voz y pierde su variación rítmica (Utter y Basso, 2008).

La rigidez muscular es el aumento del tono muscular, hipertonía o aumento de resistencia a los movimientos pasivos de tipo plástico, es decir, se mantiene igual desde el principio hasta el final de la realización del movimiento pasivo y en ocasiones hay un desbalance en el tono muscular produciendo una postura flexionada anormal característica de la EP (Obeso y col., 2002). En la EP se pueden observar otros síntomas como la dificultad para realizar tareas finas como escribir y comer. El inicio de los síntomas motores es de forma asimétrica y paulatinamente va afectando al lado contrario de cuerpo.

1.1.1.2. **Síntomas no motores**

Los síntomas no motores descritos en la EP incluyen afecciones neuropsiquiátricas, desórdenes del sueño, fatiga, desórdenes sensoriales, disfunciones autonómicas y desórdenes gastrointestinales. Entre los síntomas secundarios inducidos por los medicamentos utilizados para el tratamiento de la EP se encuentran: fluctuaciones no motoras, hipersexualidad, diarrea, paranoia, entre otros (Bonnet, 2012).

1.1.2. **Tratamiento**

Las bases de los tratamientos actuales farmacológicos y no farmacológicos están enfocadas principalmente a obtener una mejoría sintomática, neuroprotectora o ambas (Richard, 2002). No existe ningún tratamiento preventivo definitivo, capaz de interferir con los mecanismos fisiopatológicos progresivos que originan la enfermedad.

1.1.1.1 **Tratamientos farmacológicos**

La decisión de utilizar un fármaco sobre otro, así como el momento de iniciar la terapia debe ser individualizada. Esto tomando en cuenta la edad, el impacto de la enfermedad, los posibles efectos adversos y los costos relacionados con la medicación (Olanow, 2001), aun así la Levodopa (L-dopa) es el fármaco más efectivo en el tratamiento de la EP.

1.1.1.1.1 **L-dopa**

La L-dopa es uno de los agentes antiparkinsonianos más eficaces, documentado por décadas de uso clínico, que ha sido utilizado como terapia de reemplazo de la DA. Es altamente eficaz en mejorar los síntomas de la enfermedad y sigue siendo el fármaco estándar con el que se comparan otras terapias (Fahn y col., 2004). La degeneración de los ganglios basales en el cerebro de pacientes con EP afecta principalmente a las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra que se traduce en la deficiencia de DA. La L-dopa es el precursor endógeno de la DA, el cual es captado por las neuronas dopaminérgicas restantes donde se somete a descarboxilación en la terminal presináptica para formar el neurotransmisor DA (Fig. 1), ya que este no puede ser suministrado directamente debido a que no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. La DA es una catecolamina de origen natural, estereoisómero L, que se libera en la sinapsis neuronal y se une uno de los 5 receptores dopaminérgicos (D1, D2, D3, D4, D5) otra neurona post-sináptica. Este proceso

permite el control y modulación adecuados del movimiento del cuerpo. Los síntomas que tienen más probabilidades de beneficiarse con la L-dopa incluyen: rigidez, temblor, bradicinesia, marcha, hipomimia, micrografía (Parkinson Study Group, 2000).

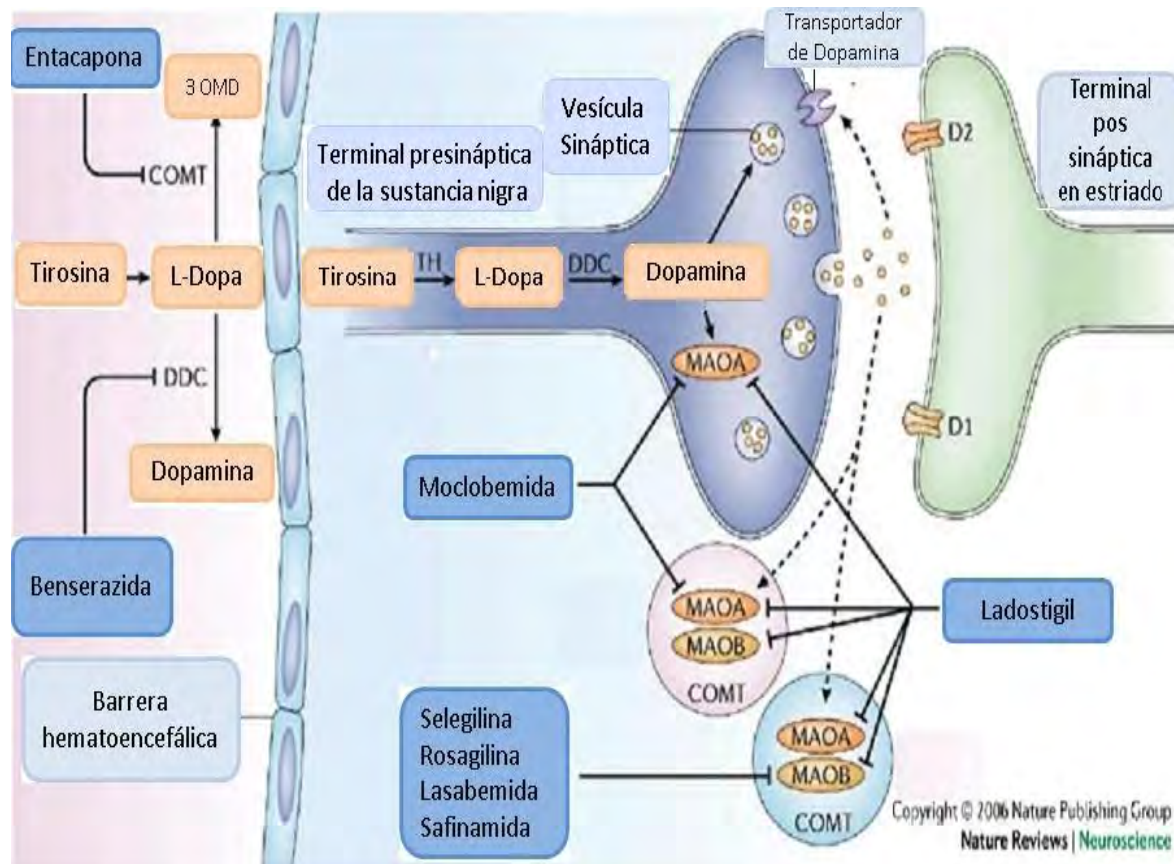


Figura 1. Síntesis y metabolismo de DA (Moussa y col., 2006)

Sin embargo, una gran mayoría de los pacientes tratados con L-dopa desarrollan efectos adversos, a pocos años de su uso, en forma de discinesias coreiformes y distonias, así como fluctuaciones motoras (Marsden y Parkes, 1977). También puede provocar sedación, pesadillas durante el sueño y problemas neuro-psiquiátricos como: alucinaciones, confusión, psicosis, manía e hipersexualidad. No mejora algunos síntomas como: congelación, inestabilidad postural, disfunción autonómica y demencia. No detiene la progresión de la enfermedad y algunos estudios han probado que los metabolitos oxidativos derivados de su catabolismo podrían acelerar la EP (Müller, 2011).

1.1.1.1.2 **Agonista dopaminérgicos**

Los agonistas de la DA se utilizan con frecuencia como monoterapia en las etapas iniciales de la EP o como terapia adyuvante en etapas más avanzadas, lo que permite a los pacientes tomar dosis más bajas de L-dopa, precursor de la síntesis de dopamina. Los agonistas dopaminérgicos son fármacos que actúan directamente sobre los receptores dopaminérgicos, independientemente de la síntesis y de la capacidad de almacenamiento presináptico de la DA. Aunque obtienen menos beneficio sintomático que la L-dopa, son útiles en la prevención y tratamiento de las fluctuaciones motoras y las discinesias, tienen una vida media más larga y menor incidencia de desarrollo de fenómeno wearing-off, on-off y discinesias (Leviney col., 2003; Clarke, 2005).

Se ha demostrado que el uso, en monoterapia, de los agonistas dopaminérgicos frente a la L-dopa reduce significativamente el riesgo de desarrollo de complicaciones motoras y discinesias (Miyasaki, 2002; Ramaker, 2005). El fenómeno on-off es una fluctuación de la actividad motora, y se caracteriza por periodos en los que el paciente alterna la actividad con un estado de dificultad motora e incluso congelación de duración variable. Con los agonistas dopaminérgicos se reducen los periodos "off" (aparecen con mayor frecuencia síntomas neuropsiquiátricos como alucinaciones, apatía, o ansiedad) en un 10-30%, aumentan los periodos "on" en un 30-60% en donde el paciente experimenta periodos de desinhibición, verborrea, o hiperactividad y se puede disminuir la dosis diaria de L-dopa en un 10-30%, dando como resultado la menor aparición de fluctuaciones y mayor capacidad en el desarrollo de tareas habituales (Clarke, 2005); aun así, aumentan las discinesias y los efectos secundarios adversos a la estimulación dopaminérgica; reacciones locales (44%), náuseas (41%), somnolencia (33%) y mareos (19%) (Watts, 2007).

1.1.1.1.3 **Anticolinérgicos**

Los anticolinérgicos fueron el primer tratamiento ampliamente aceptado para el parkinsonismo. Las plantas que contienen sustancias anticolinérgicas ya se utilizaban en la antigua medicina india para el tratamiento de una afección neurológica, que al parecer pudo haber sido un síndrome parkinsoniano (Manyam, 2000). En 1867, Ordenstein informó por primera vez su efecto antiparkinsoniano, que Charcot había descubierto por casualidad en la administración de tinturas de belladona (*Atropa belladonna*) para salivación excesiva en pacientes parkinsonianos (Lang y Blair,

1989). La Atropa Belladonna es usado como tratamiento alternativo debido a sus alcaloides de origen natural (atropina y escopolamina) y debido a su actividad anticolinérgica (Rajput, 2013).

El mecanismo preciso de acción de los anticolinérgicos aun no es claro, aunque en general se cree que funcionan mediante la corrección de los desequilibrios entre la DA estriatal y la actividad de la acetilcolina. Además son eficaces en el tratamiento de pacientes con sintomatología predominantemente tremórica, sobre la hipersialorrea y en el tratamiento de la distonía. Pueden utilizarse en monoterapia o en conjunto con otros fármacos utilizados en la EP. Son poco eficaces sobre otros síntomas y difíciles de suspender. Entre sus efectos adversos destacan la retención urinaria, visión borrosa, constipación, taquicardia y de índole mental como: pérdida de la memoria, confusión, delirio, ideas paranoides y alucinaciones (Jabbari y Pazdan, 2005).

1.1.1.1.4 **La amantadina y otros agentes anti-glutamatérgicos**

El primer reporte que se tiene acerca del uso en la amantadina en el tratamiento de la EP fue en 1969 (Schwab, 1969). Desde entonces, se han realizado varios ensayos clínicos para determinar la eficacia de la amantadina en comparación con anticolinérgicos y L-dopa, administrándola sola o en combinación con otros medicamentos administrados en la EP.

Existen diferentes vías de acción de la amantadina propuestas en la EP, pero el mecanismo exacto no está claro. La mayoría de los estudios de comportamiento y neuroquímicos indican que la amantadina interactúa con las catecolaminas, específicamente la DA. Ésta fue descrita inicialmente como antiviral y se utiliza para el tratamiento del control de la rigidez y la bradicinesia de la EP), particularmente en etapas iniciales (Crosby y col., 2003). Además, en los últimos años se ha demostrado que el uso de la amantadina es efectivo para el manejo de las discinesias relacionadas al uso de L-dopa (Silva-Junior, 2005). También se ha reportado que el tratamiento con amantadina recupera el contenido dopaminérgico en el cuerpo estriado aumentando los niveles de dopamina y ofrece una acción neuroprotectora ante el daño ejercido por la neurotoxina 1-metil-1-,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) en un modelo animal de la EP (Rojas y col., 1993). Su principal limitación consiste en que su beneficio suele ser de corta duración, restringido a algunos meses. Los efectos secundarios son: sequedad en la boca, alopecia, anorexia, edemas, nerviosismo, alucinaciones y ataques de paranoia (Lyons y Pahwa, 2005).

1.1.1.1.5 **Inhibidores de la Monoamino Oxidasa B**

Los inhibidores de la monoamino oxidasa tipo B (MAO-B), son medicamentos que ayudan a prevenir la descomposición de la DA cerebral en ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2); este último ha sido implicado en el daño oxidativo en las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra (Rascol, 2003). Los efectos secundarios son poco frecuentes, pero pueden incluir náuseas o dolores de cabeza. Cuando se añade a carbidopa-L-dopa puede aumentar el riesgo de alucinaciones. No se pueden utilizar en combinación con la mayoría de los antidepresivos o determinados narcóticos debido a su característica de potenciador químico. Se recomienda su utilización en pacientes mayores de 70 años con trastornos del ánimo o cognitivos (Schapira, 2005).

1.1.1.1.6 **Inhibidores de la catecol-o-metiltransferasa**

En el organismo, ya sea en el sistema nervioso central o periférico, la L-dopa se convierte en DA por la acción de la enzima dopa-descarboxilasa que es catabolizada por la monoamino oxidasa tipo B (MAO-B) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT) los cuales originan los metabolitos DOPAC y 3-metoxitiramina respectivamente. Sin embargo, en ausencia de un inhibidor periférico de la dopa-descarboxilasa, la L-dopa se transforma en el sistema periférico casi totalmente en DA y sólo una cantidad limitada (1-3%) del fármaco puede alcanzar el cerebro (Zappia, 2009). En la década de los setentas al suministrar L-dopa con un inhibidor de la dopa-descarboxilasa periférica, carbidopa y la benserazida, redujo de modo significativo los efectos colaterales periféricos en los pacientes tratados y permitió mayor biodisponibilidad cerebral de la L-dopa; cerca del 10% del fármaco suministrado por vía oral (Pletscher y Bartholini, 1971). Posteriormente, en la década de los noventas se comercializaron fármacos inhibidores de la COMT, como entacapona y la tolcapona, que aumentan la vida media plasmática del fármaco y la biodisponibilidad cerebral (Baas y col., 1997). Se han reportado efectos adversos tales como: trastornos hepáticos, diarrea y color amarillo brillante en la orina (Wahba y col., 2005).

1.1.1.2 **Tratamientos no farmacológicos**

Los tratamientos no farmacológicos de la EP (terapia física o cirugía) suelen estar orientados como apoyo o alternativa al tratamiento farmacológico y en el caso de la cirugía esta opción surge ante la

escasa o nula respuesta ante la administración de medicamentos contra dicha enfermedad, tomando en cuenta el costo-beneficio que el paciente obtendrá de la intervención quirúrgica.

1.1.1.2.1 **Tratamientos quirúrgicos**

El uso de la cirugía en la enfermedad se remonta a más de 60 años. A principios de 1950, los aspectos que se toman en cuenta para realizar la intervención quirúrgica en los pacientes con EP eran: buena respuesta inicial a la L-dopa, pacientes con EP idiopática menores de 50 años, sin deterioro cognitivo ni otros problemas comórbidos asociados, con periodo de evolución corto de la enfermedad y pacientes con síndrome “on-off” muy severo y que no responden a los ajustes farmacológicos orales (Suchowersky y col., 2006).

Los tratamientos quirúrgicos:

Cirugía ablativa: se realiza una lesión quirúrgica permanente e irreversible en donde se lesiona principalmente los ganglios basales, el globo pálido, tálamo y área subtálica. Se realiza por medio de estimulación eléctrica, lesiones térmicas por medio de calor o frío y administración de sustancias químicas como el alcohol, aunque recientemente se han usado otros ácidos débiles como el ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico. Esta cirugía tiene efecto inmediato entre los que se encuentran:

Palidotomía: mejora los trastornos motores y las escalas de valoración de las actividades de la vida diaria. Las alteraciones de la marcha, equilibrio e hipotonías empeoran más que otros síntomas. Puede realizarse de forma unilateral o bilateral, en cuyo caso ha de evaluarse la estimulación cerebral profunda. El riesgo de efectos generales adversos es del 14% (Levine, 2003; Clarke, 2005).

Talamotomía: la intervención unilateral del tálamo en donde se encuentra el prosencéfalo y tiene como fin controlar el temblor contralateral, la rigidez y las discinesias. Sin embargo, puede no ser efectivo para el tratamiento de la bradicinesia, trastornos de la postura, de la marcha y del habla. Tiene un 14-23% de complicaciones, cuyo porcentaje aumenta en las intervenciones bilaterales (Levine, 2003; Clarke, 2005).

Estimulación cerebral profunda (ECP): Esta intervención se realiza por medio del implante de electrodos, los cuales tiene la función de neuroestimular las áreas del cerebro causantes de los síntomas dominantes de la EP por medio de pequeños impulsos eléctricos. Esta estimulación puede realizarse a nivel de:

Tálamo: útil en el control del temblor al igual que la talamotomía, pero con menos efectos secundarios (Levine, 2003; Clarke, 2005).

Globus pallidus: útil en el control de las discinesias y las fluctuaciones motoras. Sus efectos secundarios son menores que con la palidotomía (Levine, 2003; Clarke, 2005).

Núcleos subtalámicos: útil en el control del temblor, acinesia, inestabilidad postural y trastornos de la marcha (Levine, 2003; Anderson, 2005; Capecchi, 2005; Pagni, 2005).

Trasplantes

De células adrenales autólogas de la médula: los estudios han demostrado baja eficacia y elevada morbilidad (Levine, 2003; Clarke, 2005).

De células fetales de tejido mesencefálico: su objetivo es implantar células productoras de DA en las proximidades de las zonas dañadas en la EP. Los trabajos más recientes ponen de manifiesto su baja eficacia y seguridad (Levine, 2003; Clarke, 2005).

1.1.2 **Mecanismos propuestos de daño celular en la EP**

Actualmente se desconocen las causas de la muerte neuronal que generan la EP. Sin embargo, se postula que el estrés oxidativo (Rojas, 2004), la disfunción mitocondrial, toxinas exógenas, acumulación intracelular de metabolitos tóxicos, infecciones virales, excitotoxicidad y deficiencias de factores neurotróficos, pueden favorecer la aparición de la muerte neuronal y con ello los síntomas de la enfermedad (Langston y col., 1987; Martínez-Lazcano, 2010).

1.1.2.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un proceso biológico que se presenta cuando se incrementa excesivamente la producción de radicales libres (RL), las especies reactivas del oxígeno (EROs), o ambas, y hay disminución de los sistemas antioxidantes endógenos (López y Rivas, 2008). El desbalance óxido-reducción en el organismo produce daño celular severo que puede llevar a la muerte celular. Este desempeña un rol trascendental en muchos padecimientos y enfermedades neurodegenerativos, incluyendo la EP (Halliwell, 2006).

La DA en la EP se comporta como un compuesto productor de radicales libres; puede auto-oxidarse a pH fisiológico, formando especies dopamina-quinonas tóxicas, especies reactivas de oxígeno como el superóxido y peróxido de hidrogeno (H_2O_2). (Graham, 1978). También puede ser desaminada enzimáticamente por la monoamino oxidasa (MAO) en el metabolito no tóxico ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y H_2O_2 , y por otros procesos oxidativos. Así, el metabolismo de la DA genera grandes concentraciones de especies reactivas de oxígeno (EROs), los que pueden activar las cascadas apoptóticas e inducir muerte neuronal (Mouradian, 2002). Las EROs en sí mismas son sumamente tóxicas ya que además de generar estrés oxidativo como consecuencia de la disminución de los agentes antioxidantes, causan aumento de la peroxidación lipídica de la membrana celular, daño del ADN y oxidación con alteración del plegamiento proteico (Rojas y col., 2004).

Además de los mecanismos toxicológicos y genéticos involucrados en la EP, los compuestos químicos liberados por neuronas dañadas pueden inducir la liberación de factores neurotóxicos como la neuromelanina, que es un fuerte quelante de hierro que a su vez forma un complejo y estimula la microglía, produciendo la liberación de compuestos neurotóxicos como interleucina-6 (IL-6), óxido nítrico (NO) y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), propiciando el inicio de la cascada apoptótica y como consecuencia la muerte celular (Venderova y col., 2012).

1.1.2.2 Disfunción mitocondrial

La mitocondria es el organelo celular que se encarga de metabolizar la glucosa para producir energía en forma de adenosín trifosfato (ATP). Para ello, utiliza al oxígeno que respiramos y produce H_2O_2 . No obstante, se sabe que del 0.1 al 0.5 del oxígeno consumido no genera agua, sino que se fuga en forma de radicales libres (Alarcon y col., 2010). La membrana mitocondrial contiene gran cantidad de enzimas encargadas de catalizar reacciones químicas propias del metabolismo mitocondrial. En este organelo se producen especies reactivas tales como el radical superóxido (O_2^-), el H_2O_2 y el peróxido de nitrito ($ONOO^-$). Las EROs, especies reactivas de nitrógeno (ERNs) y RL, *per se* son compuestos citotóxicos y esta citotoxicidad se hace más evidente en presencia de un desbalance detoxificante celular, lo que propicia daño y/o muerte celular (Perier, 2005).

Las EROs son moléculas capaces de provocar daños importantes en órganos y tejidos. Para combatirlos, el organismo presenta medios de defensa entre los que se encuentra el sistema de glutatión peróxidasa/glutatión reductasa. La glutatión reductasa es una enzima que cataliza la reducción del glutatión oxidado a glutatión reducido, que es utilizado por la glutatión peróxidasa para la reducción del peróxido y de lipoperóxidos, que son EROs (Perry y col., 1982). Pero si este sistema de glutatión peróxidasa/glutatión reductasa no funciona bien, el H_2O_2 puede transformarse en el radical OH^- lo que desencadena la peroxidación lipídica de la membrana y por ende la muerte de las neuronas dopaminérgicas en el caso de la EP. Se ha reportado que en cerebros de pacientes con grado avanzado de la EP la enzima se encuentra disminuida; este déficit es específico de la SNc y no se encuentra en otras regiones cerebrales ni en otras enfermedades neurodegenerativas que afectan a los ganglios basales (Fitzmaurice, 2003).

También se ha demostrado que la inhibición del complejo I mitocondrial puede ser la causa central de la EP esporádica, lo cual contribuye a la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Dicha anomalía está presente particularmente en la SNpc lo que provoca disminución de la actividad de la cadena respiratoria (Schapira y col., 1989). Muchas rutas conocidas de daño o muerte neuronal se encuentran involucradas con el complejo I mitocondrial en donde se ven involucradas: especies reactivas de oxígeno, excitotoxicidad, daño por inflamación, necrosis y apoptosis dependiente e independiente de caspasas (Arai y col., 2006).

1.1.2.3 Apoptosis

En la EP se ha propuesto que los mecanismos patogénicos involucran estrés oxidativo, excitotoxicidad, inflamación, disfunción mitocondrial y proteólisis alterada. Estos procesos forman una cascada compleja de eventos interrelacionados que dan lugar a la muerte neuronal por apoptosis; es el término más usado actualmente como referente de muerte celular programada (Kerr, 1972).

Regularmente consta de una serie de pasos ordenados de la siguiente manera: activación de los receptores de apoptosis, cambio en el potencial de la membrana mitocondrial, translocación y liberación del citocromo C, activación de las caspasas, condensación nuclear y citoplasmática, fragmentación celular, formación de cuerpos apoptóticos y fagocitosis sin inflamación. La mitocondria es la estructura de la neurona que tiene un papel central en la apoptosis, cuando hay acumulación de radicales libres se ha mostrado que en la mitocondria se dan cambios en su estructura y función (Desagher y Martinou, 2000). La disminución en el potencial de membrana de la mitocondria es la clave para iniciar el proceso de apoptosis en la vía intrínseca, generando ésta la activación de Bax, lo que provoca la liberación del "citocromo C" mitocondrial (proteína localizada en el complejo IV de la cadena respiratoria dentro de la mitocondria), hacia el citosol y éste activa otros factores que participan en la apoptosis tales como las caspasas (Nicholls y Budd, 2000).

En la EP se ha observado que la proteína Bax y las caspasas ejecutoras como la 3 y 7 se encuentran activadas (Hartmann y col., 2000; Reed, 2000; Tatton, 2000). El factor de necrosis tumoral (TNF) es un receptor localizado en la membrana celular, activa la vía extrínseca de la apoptosis por medio de la caspasa 8, que se encuentra activada en la EP (Hartmann y col., 2001), y ésta a su vez activa la caspasa 3. Tanto en muestras *postmortem* de tejido cerebral de pacientes con la EP, como en el modelo animal administrado con la MPTP se observa alto número de cuerpos apoptóticos con la técnica de TUNEL (Mochizuki y col., 1996; Tatton y Kish, 1997; Spooren y col., 1998). En 1996 se encontró que en ratones a los que se les administró MPTP había disminución de los niveles de la proteína Bax (Hassouna y col., 1996). En otros estudios, se ha reportado disminución de las proteínas que participan en el proceso de apoptosis después de la administración con MPTP/MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridinio) (Eberhardt y Schulz, 2003). Todas estas evidencias apoyan

la hipótesis de que la apoptosis tiene una gran participación en la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la EP.

1.1.2.3.1 Vías apoptóticas

Múltiples eventos celulares, estímulos externos o ambos, pueden desencadenar el programa de apoptosis. Hay dos vías principales de apoptosis y una compartida: la vía intrínseca y la vía extrínseca y la vía común. Aunque cada vía emplea un conjunto diferente de caspasas iniciadoras, ambas vías tienen las mismas caspasas ejecutoras.

En el caso de la vía extrínseca, la apoptosis es desencadenada por la activación de receptores triméricos especializados de la superficie celular denominados "receptores de muerte". Estos receptores son miembros de la familia de los receptores de muerte para el Factor de Necrosis Tumoral (TNF-R) y se compone de un TNF, un receptor 1 (TNF-R1), Fas (también llamados CD95 o APO-1), DR3, DR6, y receptores tipo TRAIL. Sus ligandos son miembros de la superfamilia de TNF y se conocen como "ligandos de muerte (Figura 1) (Zamora y col, 2005; Venderova y col., 2012).

La vía intrínseca o mitocondrial se activa por factores estresantes como EROs o la pérdida de soporte trófico. El evento central en esta vía es la liberación de citocromo C junto con otras moléculas solubles desde el espacio intermembranal mitocondrial hacia el citosol. Este es el resultado de un proceso rápido, irreversible y progresivo llamado permeabilización mitocondrial de la membrana externa (PMME). La PMME puede desencadenar la formación de un poro en la membrana externa mitocondrial gracias a la participación de la familia proapoptótica Bcl-2 (especialmente BAX y BAK) debido a la apertura de un canal multiproteico específico del poro de transición de permeabilidad (PTP) que cruza a través de la membrana mitocondrial interna y externa. Esto conduce a la transición de la permeabilidad mitocondrial, también conocida como la despolarización mitocondrial, caracterizado por la disipación del potencial de membrana mitocondrial interna, la disminución de la síntesis de ATP, la producción de EROs, hinchamiento mitocondrial y su ruptura (Figura 1) (Edinger y Thompson 2004; Zamora y col., 2005; Venderova y col., 2012).

En la vía común o fase ejecutora, involucra la activación de una serie de caspasas. Las caspasas de la vía intrínseca es la caspasa 9, en tanto la de la vía extrínseca es la caspasa 8 como

su nombre lo indica, confluye en un punto la vía intrínseca y la vía extrínseca promoviendo así la muerte por apoptosis. Las vías intrínseca y extrínseca convergen en la caspasa 3. La caspasa 3, así, cliva al inhibidor de la desoxiribonucleasa activada por caspasa, que es responsable de la apoptosis nuclear (Figura 1) (De Sande, 2012).

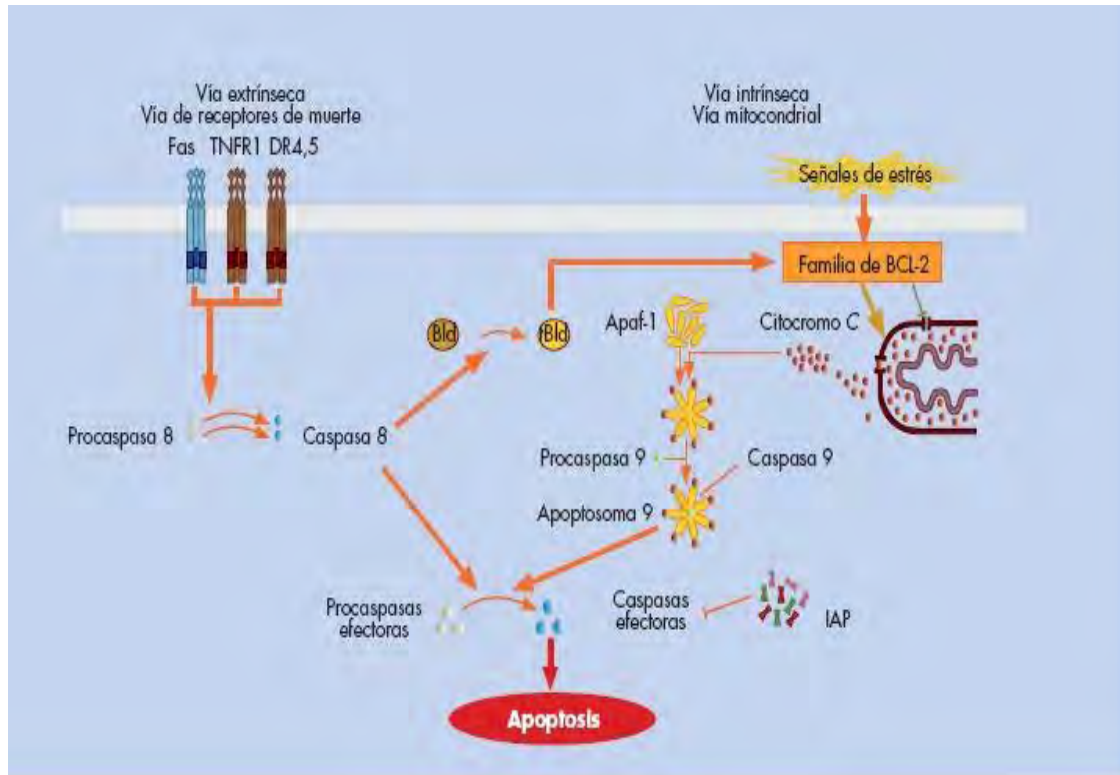


Figura 2. Esquema general de la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis y la vía común o compartida (De Sande, 2012).

1.1.2.3.2 Familia Bcl-2

Existen dos grupos principales de proteínas Bcl-2, las proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk) y las anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1). En tanto las proteínas anti-apoptóticas frenan la apoptosis al bloquear la liberación mitocondrial de citocromo C, las proteínas pro-apoptóticas promueven la liberación de citocromo C desde la mitocondria hacia el citoplasma. La integridad de la membrana mitocondrial es estrictamente regulada. Esta función la lleva a cabo la familia de proteínas Bcl-2 (Yang y col., 1997a).

Con base en su papel en la regulación de la apoptosis, los miembros de la familia Bcl-2 pueden dividirse en tres subfamilias:

Primera subfamilia: comprende las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Bax, Bak y Bok) causantes de la permeabilización mitocondrial de la membrana externa. Una vez insertada en la membrana mitocondrial, Bax se oligomeriza y forma poros en colaboración con el BID y Bak mitocondrial (Dewson y col., 2009). La activación de Bax ha sido reportada repetidas veces en ratones tratados con MPTP y en tejido de pacientes con la EP (Hassouna y col., 1996; Vila y col., 2001; Perir y col., 2005).

Segunda subfamilia: comprende las proteínas antiapoptóticas por ejemplo, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, que impiden la permeabilización mitocondrial de la membrana externa; específicamente, Bcl-2 que previene la oligomerización de Bax (Dlugosz y col., 2006). Por lo tanto, la sobre-expresión de Bcl-2 protege a varios tipos de neuronas de la apoptosis, mientras que la regulación a la baja las hace más susceptibles de entrar en algún proceso apoptótico. Se ha reportado que el tratamiento con MPTP disminuye la expresión de Bcl-2 en la sustancia nigra de ratones (Vila y col., 2001) y la sobre expresión de Bcl-2 protege frente a agentes citotóxicos como MPTP/MPP⁺ (Offen y col., 1998; Yang y col., 1998; Vila y col., 2001).

Tercera subfamilia: denominada BH3-only, promotora indirecta de la apoptosis por el secuestro de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2. Los elementos de BH3- incluyen Bid, Bad, Bim, Blk, Puma, Noxa, y Bnip3L. Bad puede heterodimerizarse con Bcl-xL o de Bcl-2, que neutraliza su efecto protector y promueve la muerte celular (Yang y col., 1995). Bid, Bim, y Puma pueden desencadenar la oligomerización de Bak o Bax y participar en PMME. Se ha reportado que la expresión de Bim se incrementa notablemente en respuesta al tratamiento con MPP⁺ (Liou y col., 2005).

1.2 Modelos neurotóxicos de la EP

1.2.1 MPTP

La neurotoxina MPTP es considerada como el mejor modelo experimental disponible de las secuelas neuroquímicas y motoras implicadas en la EP (Gerlach y col., 1991). Es una neurotoxina dopaminérgica que cuando se administra en primates no humanos y ratones provoca la pérdida celular en la SNpc y síntomas similares a los de la EP (Gerlach y col., 1991). Las altas

concentraciones de su metabolito activo (el ion MPP⁺), afectan la actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. La oxidación MPTP a MPP⁺ por la MAO-B en el cerebro genera la producción de RL (Zang y Misra, 1993).

La incubación de MPP⁺ con enzimas mitocondriales, induce la producción de enzimas mitocondriales (Adams y Klaidman 1993) y el aumento puede inhibir la función del complejo I mitocondrial. La toxicidad del MPTP y el MPP⁺ está relacionada a la producción de estrés oxidativo y la generación de EROs. Además se ha observado que el pretratamiento de ratones con un inhibidor de la superóxido dismutasa (SOD) aumenta la toxicidad inducida por el MPTP (Wong y col., 1999).

Con respecto a la hipótesis del estrés oxidativo, se ha reportado aumento de la peroxidación lipídica, un proceso dependiente de la sobreproducción de radicales libres y una consecuencia de la administración de MPP⁺ en ratones (Yurek y col., 1989). Se ha reportado que varios antioxidantes poseen la capacidad de proteger contra la neurotoxicidad inducida por el MPP⁺ y el MPTP (Park y col., 2004). Por lo tanto, es razonable proponer el uso de antioxidantes exógenos tales como el EGb 761.

1.2.2 **Paraquat (PQ)**

El paraquat (1,1-dimetil-4,4-dipiridinio) es un compuesto utilizado ampliamente como herbicida cuaternario de amonio el cual es sumamente tóxico para los seres humanos ya que genera cuadros clínicos parecidos a la EP. Su administración, mediante inyecciones directas en el cerebro, daña principalmente DA en la SNpc. Se caracteriza porque induce la sobreproducción de EROs y RL que aumenta la generación de estrés oxidativo (Hattori y col., 2009).

1.2.3 **6-Hidroxidopamina (6-OHDA)**

La 6-OHDA fue la primer neurotoxina dopaminérgica descubierta, y sigue siendo utilizada para obtener modelos animales de la EP (Ungerstedt, 1968). Es un análogo hidroxilado de la DA que no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que debe ser administrado intracerebralmente para poder alcanzar las células dopaminérgicas de la SNpc. Cuando es administrada por vía sistémica destruye las neuronas adrenérgicas de los ganglios simpáticos, pero

carece de acción tóxica. A nivel del sistema nervioso central es captado de forma específica por parte de células catecolaminérgicas a través de los transportadores de DA y noradrenalina, usándose desipramina para bloquear este último y provocar la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas. El mecanismo de acción de esta neurotoxina ha sido vinculado principalmente al estrés oxidativo a través de acumulación de EROS y RL como el radical hidroxilo o algunas quinonas que se producen durante la metabolización de esta toxina, lo que conduce a la alteración del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Przedborski y Ischiropoulos, 2005).

1.2.4 **Rotenona**

La rotenona es un isoflavonoide de origen vegetal que fácilmente se descompone con la luz solar. Debido a su extrema capacidad lipofílica, atraviesa fácilmente las membranas biológicas y no depende de transportadores de membrana (Betarbet y col., 2000). Es un compuesto conocido como inhibidor de la NADH deshidrogenasa, o complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, daña selectivamente a las neuronas dopaminérgicas de animales de laboratorio y en cultivos celulares de experimentación, que se atribuye al estrés oxidativo resultante de la generación de RL como el superóxido, con la consecuente inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Dukes y col., 2005).

1.3 **Extracto de *Ginkgo Biloba* (EGb 761).**

Los diversos fármacos utilizados hasta la fecha para combatir la EP y sus síntomas han demostrados poca eficacia y/o efectos colaterales severos en la salud del paciente, desde esta perspectiva y en busca de una alternativa segura y viable, se propone al EGb 761 como una alternativa para el tratamiento de la EP, ya que ha demostrado tener importantes propiedades para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, demencia, así como en la disminución del envejecimiento celular. Entre sus propiedades más notables se encuentran; regulador apoptótico, reduce el estrés oxidativo, captador de radicales libres, reducen el daño celular mediante la reducción de las concentraciones de Ca²⁺ intracelular, disminuye la producción de EROs, por lo cual se considera que es potencial agente terapéutico para el tratamiento de la EP.

El árbol de *Ginkgo biloba* es una de las especies de árbol más antiguas que se ha descrito como un fósil viviente y sus efectos benéficos se conocen hace aproximadamente 5000 años en la

medicina China. El EGb 761 es un extracto estandarizado del árbol de *Ginkgo biloba* para asegurar la consistencia de su composición, confiabilidad, seguridad y eficacia. Fue desarrollado hace más de 20 años y ha ganado gran popularidad en los países europeos y en USA (DeFeudis, 1998).

1.3.1 Composición del EGb 761

El extracto EGb 761 es una mezcla definida de los compuestos activos extraídos de las hojas de *Ginkgo biloba* conforme a un procedimiento estandarizado (Drieu, 1986). Contiene dos grupos principales de compuestos activos: flavonoides (~24%) y terpenoides (~6%) (Drieu, 1986).

La fracción flavonoide está compuesta principalmente de tres flavonoles: quercetina, kaempferol e isoramnetina, que están unidos a un azúcar. Estos flavonoles presentan propiedades antioxidantes, atrapador de RL e inhibidor enzimático, además tienen quelantes de cationes, antialérgicos, antiinflamatorios, y efectos antiproliferativos, antivirales y anticancerígenas (DeFeudis, 1998).

La fracción de terpenoide (~6%), se compone de ginkgólidos (~3.1%) y bilobálicos (~2.9%), que se encuentran exclusivamente en el árbol de *Ginkgo biloba*. Los ginkgólidos son diterpenos son responsables del sabor amargo de EGb 761. Cinco ginkgólidos se han identificado como constituyentes de EGb 761 (ginkgólidos A, B, C, J, y M) (DeFeudis, 1998). Otros componentes del EGb 761 son ácidos orgánicos (~5-10%), que incluyen 3-metoxi-4-hidroxibenzoico (ácido vinílico), ácido 4-hidroxibenzoico (ácido p-hidroxibenzoico), ácido 3,4-dihidroxibenzoico (ácido protocatéquico), ácido acético, ácido shikímico, ácido 6-hidroxikinurenico, ácido quinurénico, y ácido ascórbico. Estas sustancias le dan carácter ácido al extracto, lo que aumenta la solubilidad en agua de la fracción flavonoides y sus componentes terpénicos; esto facilita su biodisponibilidad y absorción (DeFeudis, 1998). EGb 761 también contiene proantocianidinas (> 0,5%)(DeFeudis, 1998).

1.3.2 Farmacocinética del EGb 761

Las propiedades farmacocinéticas de EGb 761 son difíciles de especificar debido a la complejidad del extracto. En estudios con voluntarios sanos se ha demostrado que los flavonoides son absorbidos en el intestino delgado (Kleijnen y Knipschild, 1992). El pico de concentraciones en

plasma es de 2 a 3 horas con una eliminación media de 2 a 4 horas. La eliminación completa se produce 24 horas después de la ingestión del extracto (DeFeudis, 1998). Con respecto a la fracción de terpenoide, se ha informado que la biodisponibilidad de ginkgólidos A y B es prácticamente completa, independientemente de la dosis, mientras que la del ginkgólido C es muy baja (DeFeudis, 1998). Los ginkgólidos A y B alcanzan concentraciones plasmáticas máximas 1.4 a 2 horas después de la administración y tienen una vida media de 3.9 y 7 horas, respectivamente. La biodisponibilidad de los bilobalidos es del 72%, con una vida media de 3.2 horas después de la administración oral. Los ginkgólidos A y B se eliminan con la orina (DeFeudis, 1998).

1.3.3 Toxicología EGb 761 y efectos adversos

El extracto EGb 761 es perfectamente tolerado por el organismo y a dosis farmacológicamente activa no influye en la hemostasia (Bilia, 2002). Se ha demostrado que es un extracto seguro y los efectos adversos; como náuseas, vómitos, dolores de cabeza y mareos, son poco frecuentes, leves, transitorios y reversibles (Diamond y col., 2000; Bilia, 2002). No se han reportado efectos cancerígenos, teratogénicos o embriotóxicos.

1.3.4 Dosis del EGb 761

Los experimentos farmacológicos han concluido que la dosis de 50 a 100 mg/kg por día de EGb 761 es generalmente activa (aunque 10 mg/kg ha ejercido efectos beneficiosos en algunos modelos) (Rojas y col., 2001, 2008). En los seres humanos, la dosis diaria más común es de 120 mg (EGb 761 40 mg tres veces al día) o 240 mg.

1.3.5 Mecanismos de protección del EGb 761

Dentro de los diferentes mecanismos de protección celular que ejerce el EGb 761 se encuentran su efecto antioxidante, captación de radicales libres, regulación del estrés oxidativo, efecto antiinflamatorio y antiapoptótico, entre otros (Rojas y col., 2012).

1.3.6 Efecto antioxidante del EGb 761

El extracto EGb 761 posee propiedades antioxidantes importantes (Marcocci y col., 1994). Además tiene la capacidad de secuestrar EROs, tales como el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), peroxilo, el radical oxoferril, el anión superóxido (O_2^-) y el óxido nítrico, *in vitro* (Marcocci y col., 1994; Maitra y col., 1995). La acción antioxidante del EGb 761 se debe principalmente a la fracción flavonoide que secuestra los aniones O_2^- , $\text{OH}\cdot$ y radicales peroxilo (Gardes-Albert y col., 1992; Marcocci y col., 1994). Los flavonoides también previenen la peroxidación lipídica en la membrana celular, debido a su capacidad de interactuar y penetrar en las bicapas lipídicas (Saija y col., 1995, Rojas y col., 2001). La fracción terpenoide tiene efectos antioxidantes en modelo de neurodegeneración en rata (Shi y col., 2009b). También los terpenos pueden potenciar la acción antioxidante de los flavonoides del EGb 761 (Rojas y col., 2012).

El extracto EGb 761 también puede ejercer acciones antioxidantes indirectamente; por ejemplo, reduce la generación de H_2O_2 en el cerebro y el hígado (Sastre y col., 1998), aumenta la superóxido dismutasa (SOD) y la actividad de la catalasa en el hipocampo, cuerpo estriado y la sustancia nigra (Bridi y col., 2001). EGb 761 también disminuye la actividad de la monoamino oxidasa B relacionada con la edad, que es otra fuente de EROs (Pardon y col., 2000) y se ha sugerido que EGb 761 protege la cadena respiratoria mitocondrial contra la producción de radicales libres (Eckert y col., 2003).

La acción antioxidante del EGb 761 hace que sea un excelente candidato como un fármaco anti-envejecimiento, incluyendo la EP. También puede modular la respuesta a una amplia variedad de estímulos extracelulares a través de la inhibición de los factores de transcripción activados por el estrés oxidativo. También se ha reportado que en un esquema pretratamiento realizado con MPP+ intracerebroventricularmente se encontró aumento significativo en los niveles de DA e inhibición de la peroxidación de lípidos (Rojas, 2001), y regulación de la actividad de

enzimas MAO y tirosina hidroxilasa (Rojas, 2004). Las vías de transducción de señales relacionadas con la apoptosis son de particular importancia para la supervivencia celular, por lo tanto, las acciones antioxidantes de EGb 761 puede contribuir a la prevención de la muerte celular, en particular la apoptosis (Ni y col., 1996).

1.3.7 Efecto antiapoptótico del EGb 761

Las propiedades anti-apoptóticas de EGb 761 son multifuncionales y pueden actuar sinérgicamente en múltiples vías de señalización intracelulares implicadas en la apoptosis. Como posibles mecanismos subyacentes a su acción antiapoptótica, el EGb 761 puede mantener la integridad de la membrana mitocondrial que impide la liberación de citocromo-c (Liu y col., 2008; Nevado y col., 2010), bloqueando de esta manera la formación del apoptosoma y la cascada de caspasas (Lu y col., 2006; Nevado y col., 2010). El EGb 761 también aumenta la transcripción de la subfamilia antiapoptótica Bcl-2, e inhibe el factor proapoptótico Bax (Lu y col., 2006; Li y col., 2011), atenúa la transcripción de caspasa 7 y 8 (Yeh y col., 2009; Nevado y col., 2010), e inactiva a c-Jun N-terminal quinasa (Shi y col., 2009b). El EGb 761 además inhibe la escisión de la proteasa efectora caspasa 3, bloqueando así la ejecución de la apoptosis y previniendo la fragmentación del ADN nuclear, el sello distintivo molecular en la apoptosis (Liu y col., 2008; Shi y col., 2009b; Lim y col., 2011). Los efectos antiapoptóticos del EGb 761 se han observado en modelos animales de la EP: 6-OHDA (Wang y col., 2011), paraquat (Kang y col., 2007) y MPTP (Yang y col., 2001; Rojas y col., 2012a).

1.3.8 Efectos adversos del EGb 761

Con base en los datos clínicos obtenidos del EGb 761 se ha concluido que es un fitofármaco seguro. En el 98% de los estudios clínicos de tolerancia son muy bueno y los efectos adversos muy leves, temporales y reversibles. En ensayos clínicos no se tiene registro de algún efecto nocivo serio atribuible al tratamiento con EGb 761. Además se ha reportado con poca frecuencia el desarrollo de reacciones alérgicas cutáneas, trastornos gastrointestinales suaves y dolor de cabeza derivados del tratamiento con EGb 761 (Kleijneand y Knipschild, 1992; Bilia, 2002). Tampoco se ha observado que el EGb 761 sea mutagénico, carcinogénico, teratogénico o embriotóxico (Rojas y col., 2012).

1.4 Tratamiento con EGb 761 en el modelo animal de la EP inducido con MPTP

En el laboratorio en donde se realizó esta tesis, se ha reportado el efecto de recuperación neuronal inducida por el EGb 761 administrado posteriormente a la última administración de MPTP, cuando los mecanismos neurodegenerativos están activados. Estos datos demostraron que EGb 761 puede proporcionar una protección eficaz contra el daño a las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, que surge de los efectos neurotóxicos del MPTP *in vivo* (Rojas y col., 2012b)

Se ha sugerido que el EGb 761 puede actuar como atrapador de RL producidos por neurotoxicidad de MPTP (Rojas y col., 2008). También incrementa la actividad de la Manganese superóxido dismutasa (Mn-SOD) en respuesta a la neurotoxicidad por el MPTP y en disminución en el grupo tratado con MPTP + EGb 761. Por lo tanto, se propuso que la neuroprotección del EGb 761 contra la neurotoxicidad de la MPTP se debe principalmente a la captación los RL O_2^- y la disminución en la actividad de la Mn-SOD. Esto sugiere que EGb 761 inhibe la producción de O_2^- producida por la neurotoxicidad del MPTP (Rojas y col., 2008). Estos resultados son acordes con otros resultados que muestran que el EGb 761 regula otras enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa y glutatión reductasa (Rimbach y col., 2001; Sasaki 2001). Se ha reportado que otros extractos de *Ginkgo biloba* restauran la actividad de las enzimas dependientes de glutatión, catalasa y SOD en el estriado, después de la administración de 6-OHDA (Ahmad y col., 2005). EGb 761 puede poseer propiedades neurotróficas y/o neuritogénicas que mejoran la recuperación funcional después de una lesión neuronal (Rojas y col., 2012).

Los déficits locomotores producidos por la neurotoxicidad de la MPTP mejoraron después de las exposición al EGb 761, probablemente debido a la protección parcial de los niveles de DA del cuerpo estriado (Rojas y col., 2008).

El EGb 761 no solo proporciona mejora funcional en la capacidad locomotora sino que también se ha demostrado que invierte el proceso de degeneración de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales producida por la neurotoxicidad de la MPTP. Esto es apoyado por el mayor número de neuronas y fibras estriadas positivas a tirosina hidroxilasa encontradas en las SNpc (Rojas y col., 2008). Esta recuperación puede deberse a que el EGb 761 activa la transcripción de genes que codifican péptidos importantes en la función y el crecimiento celular (Gohil y Packer, 2002), lo cual puede contribuir a la restauración o regeneración de las neuronas dañadas después de la

neurotoxicidad ejercida por la MPTP. También se ha reportado que el EGb 761 disminuye la neurodegeneración asociada con el envejecimiento (DeFeudis y Drieu, 2000), lo que también podría ocurrir en la neurotoxicidad inducida por el MPTP/MPP⁺.

En resumen, y de acuerdo con los estudios realizados con el fitofármaco EGb 761, se puede decir que posee propiedades neuroprotectoras y neuroregenerativas, gracias a su capacidad de atrapador de radicales libres, que originan el estrés oxidativo tanto en pacientes con la EP y en modelos animales administrados con MPTP/MPP⁺.

2 JUSTIFICACIÓN

El EGb 761 es uno de los fitofármacos más utilizado en Europa para el tratamiento de enfermedades vasculares, neurodegenerativas, demencia y desórdenes del equilibrio, entre otras. También se ha reportado que tiene propiedades antiapoptóticas, regulando la expresión de la familia Bcl-2 y evitando la activación de las Caspasas. Estas cualidades son proporcionadas por los componentes del extracto: flavonoides, terpenoides y ginkgólidos. Además posee propiedades antioxidantes y de atrapador de radicales libres, lo que provee mecanismos de protección a la membrana mitocondrial y evita la activación de la cascada apoptótica que culmina con la muerte celular. Otra gran ventaja del EGb 761 ante otros fármacos, es que carece de efectos adversos severos. Por tales motivos, el extracto de *Ginkgo biloba* puede ejercer efectos antiapoptóticos en el modelo experimental de la EP inducido con la MPTP, en la que la muerte neuronal por apoptosis es la causa principal de la pérdida de neuronas dopaminérgicas, y ofrece una nueva alternativa terapéutica para los pacientes con EP.

3 HIPÓTESIS

Si el EGb 761 posee propiedades antiapoptóticas entonces será capaz de restablecer los niveles de la expresión del mRNA de Bax, Bcl-2, y Caspasa 3 en un modelo experimental de la EP inducido con la neurotoxina MPTP, evitando la apoptosis de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y el cuerpo estriado, característico de la EP.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto antiapoptótico del EGb 761 sobre la expresión del mRNA de Bax, Bcl-2, Caspasa 3 en el mesencéfalo y el cuerpo estriado en dos esquemas de tratamiento: agudo y crónico.

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto del EGb 761 en los niveles de la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en el modelo experimental agudo y crónico inducido con MPTP.
- Analizar el efecto del EGb 761 en los niveles de expresión del mRNA de Caspasa 3 en el modelo experimental agudo y crónico inducido con MPTP.
- Evaluar si existen diferencias significativas en los niveles de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 y caspasa 3 entre los grupos (MPTP-Salina) y (MPTP-EGb 761) en el modelo experimental agudo y crónico inducido con MPTP.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales

Los experimentos fueron realizados con ratones machos de la cepa C-57 black (25-30 g), de 11 a 13 semanas de edad, que se mantuvieron en condiciones estándar (12/12 h de ciclo luz/obscuridad, $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa 40%), con acceso al agua y alimento *ad libitum*. Los experimentos se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062ZOO-1999, para especificaciones técnicas para de producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

5.2 Formación de grupos

Para demostrar el efecto anti-apoptótico del EGb 761 se realizaron dos tipos de tratamiento: un esquema de tratamiento a 7 días grupo agudo y otro a 18 días (crónico) (Ortiz y col., 2001; Kuhlmann y Guilarte, 1999). Cada esquema de tratamiento estuvo formado por cuatro grupos; de 6 animales cada uno: control (salina+salina), salina+EGb 761, MPTP+salina y MPTP+EGb 761. La administración de la solución salina, EGb 761 (40mg/kg) y MPTP (30 mg/kg) fue intraperitoneal (i.p.). En previos estudios, el grupo de estudio donde se realizó esta tesis reportó que la dosis de EGb 761 (40mg/kg) es la óptima en la recuperación neuronal en la SNpc (Rojas y col., 2008), así también se reporta que la dosis de MPTP (30 mg/kg) es la que más asemeja a la sintomatología y progresión de la EP, así como en la regulación significativa de concentración de DA en la vía nigroestriatal compuesta por la SNpc y el cuerpo estriado. Los animales se sacrificaron 24 horas después de la última administración de solución salina o EGb 761.

5.3 Grupos experimentales

Administración de EGb 761: tratamiento agudo

Grupo 1: se administró solución salina por 5 días y al siguiente día se comenzó a administrar nuevamente solución salina por 7 días (Salina+Salina).

Grupo 2: se administró solución salina por 5 días y al siguiente día se administró EGb 761 por 7 días (Salina+EGb 761).

Grupo 3: se administró MPTP por 5 días y al siguiente día se administró solución salina por 7 días (MPTP+Salina).

Grupo 4: se administró la MPTP por 5 días y al día siguiente se administró el EGb 761 por 7 días (MPTP+EGb 761).

Administración de EGb 761: tratamiento crónico

Grupo 1: se administró solución salina por 5 días y al siguiente día se administró nuevamente solución salina por 18 días (Salina+Salina).

Grupo 2: se administró solución salina por 5 días y al siguiente día EGb 761 por 18 días (Salina+EGb 761).

Grupo 3: se administró MPTP por 5 días y posteriormente solución salina por 18 días (MPTP+Salina).

Grupo 4: se administró la MPTP por 5 días y posteriormente EGb 761 por 18 días (MPTP+EGb 761).

5.4 **Disección de regiones cerebrales**

Los animales se sacrificaron inmediatamente después de la última administración del vehículo (EGb 761 o sol. Salina) por dislocación cervical (Glowinski y Iversen, 1966). Se obtuvieron las áreas del interés (mesencéfalo y cuerpo estriado) en condiciones estériles con agua dietil pirocarbonatada (DEPC) e inhibidor de RNAsas. El tejido obtenido fue pesado de inmediato en la Balanza Analítica Explorer (OHAUS) y congelados inmediatamente en hielo seco y se almacenaron a -70°C hasta su posterior procesamiento en frío y en condiciones estériles y libres de RNAsas.

5.5 **Extracción de RNA total**

Al trizol se le agregó glicógeno a una concentración de $200\mu\text{g/mL}$. De esta mezcla se agregaron $801\mu\text{L}$ por cada tejido cerebral y el tejido se homogenizó por sonicación (Cole Parmer). El pistilo fue previamente lavado con RNAsa (CONTINENTAL LAB. PRODUCTS S.A. DE C.V.) y enjuagadas con agua DEPC (dietilpirocabamato SIGMA-ALDRICH) al 1.0 %. Al homogenizado se agregaron $160\mu\text{L}$ de cloroformo grado molecular (SIGMA-ALDRICH), agitando durante 15 minutos vigorosamente en el VORTEX- GENIE2 (Scientific Industries), para su posterior reposo durante tres minutos a temperatura ambiente y posteriormente la muestra se centrifugó 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 interface que contiene el DNA y la fase superior acuosa la cual contiene el RNA total. La fase acuosa se transfirió a un tubo Ependorf de 1.5 mL , adicionando 500 mL de isopropanol grado molecular (SIGMA-ALDRICH) para precipitar el RNA total. Se dejó por una hora a -20°C para que se lleve a cabo la precipitación del RNA, y posteriormente se centrifugó a 10500g por 10 min a 4°C ; el precipitado del RNA total obtenido fue lavado con etanol al 75% y se centrifugó durante 5 minutos a 7500 x g a 4°C Posteriormente, el botón se secó durante 10 minutos a temperatura ambiente y después el botón de RNA total se disolvió en $50\text{-}100\text{ }\mu\text{L}$ de agua libre de RNAsas (Fluka). La cantidad de agua dependió del tamaño del botón, se agitó y se tomó una alícuota de $10\text{ }\mu\text{L}$ para determinar y cuantificar la cantidad del RNA total. El resto del RNA se almacenó a -20°C para ensayos posteriores.

5.5.1 Determinación de la concentración, pureza e integridad del RNA total

Para conocer la concentración del RNA total se midió la absorbancia 260nm/280nm en un espectrofotómetro. Para determinar la integridad del RNA total extraído, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 0.45% teñido con bromuro de etidio 0.2mg/mL. El RNA se observó en un transiluminador con luz ultravioleta a 260nm (Maniatias y col., 1989).

5.5.2 Reacción de la transcriptasa reversa

El cDNA se sintetizó a partir del RNA total de las dos regiones cerebrales en estudio en ambos esquemas de tratamiento (agudo y crónico), utilizando Random Primer 3 µg/µL (invitrogen) y oligo dT 5µg/µL (invitro). Las moléculas de mRNA actuaron como molde, mientras que los oligos al azar (random primers) y el oligo dT como cebador. Además de que se requirieron dinucleótidos trifosfatos (dNTP's) que funcionaron como sustrato para la transcriptasa reversa M-MLV 200ug/mL (invitrogen), de lo que resultó la hebra de DNA complementaria o cDNA. Mientras que el oligo Dt utilizado (invitro) se adhirió a la cola poliA de mRNA. Posteriormente se procedió a realizar los caculos utilizando 2 µg de RBA total.

Se adicionaron los siguientes compuestos en tubo de micro centrífuga libres de nucleasas: 1µL de oligo (dT) 0.5 mg/mL (Roche o invitrogen) o bien Random primer 3 µg/µL (invitrogen) 2µg de RNA total, 0.4mL de d'NTPs 25 mM mezcla (10mM cada dATP, dGTP, dTTP, dCTP, a pH neutro), agua destilada estéril. 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 o invitrogen) con la cola poly-A del RNA mensajero. Rápidamente se pasó a hielo en el cual estuvo un minuto, lo cual permitió que las cadenas complementarias se mantuvieran desnaturalizadas.

Posteriormente, se preparó la segunda mezcla con los siguientes reactivos: 5µL de Buffer 5X FS (invitrogen), 1 µL de DDY 0.1M (invitrogen), 1µL de RNasa OUT 40u/µL (invitrogen). Se mezcló el contenido del tubo gentilmente y se incubó durante 2 minutos a 37° C, se adicionó 1µL de transcriptasa Reversa M-MLV RT 200u/ml mezclando por pipeteo arriba y abajo. En las reacciones donde se utilizó el oligo al azar (Random primer) 3µg/µL (invitrogen) se incubó a 25° C por diez minutos y después de haber agregado 1µL de la enzima M-MLVRT 200u/mL (invitrogen) incubamos

50 minutos a 37°C, se inactivó la reacción por incubación por 15 minutos a 70°C (al desactivar la transcriptasa) y posteriormente se colocó en hielo.

5.5.3 Reacción de Q-RT-PCR

La amplificación y cuantificación se llevó a cabo mediante RT-PCR, utilizando sondas Taqman para los genes Bax, Bcl-2 y Casp 3, las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador de la marca Corbet 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 15 µL debido a que se utilizaron sondas Taqman. Los reactivos fueron: 0.8 µL de cDNA obtenido de la transcriptasa reversa con concentración 2µg/mL, 8 µL de Master Mix de la marca (Applied Biosystems), 6.4 µL de agua libre de RNAsas (Fluka), 0.8 µL de la sonda TaqMan (Applied Biosystems) y una sonda específica para cada gen a analizar en nuestras muestras. Las reacciones se incubaron en el carrusel del Rotor Gene 6000, con capacidad de 36 tubos.

5.6 Análisis estadístico

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

6 RESULTADOS

Determinación de la integridad, pureza y concentración del ARN total del tejido cerebral del ratón

Para determinar la integridad del ARN total extraído del tejido cerebral, en ratones tratados y controles, se realizó una electroforesis de agarosa. El ARN no mostró contaminación de ADN genómico, además la integridad fue la adecuada ya que tanto la banda 18S y 28S de mARN total se observaron bien definidas e íntegras, sin observarse fragmentación.

Para determinar la cantidad y pureza del ARN total se utilizó espectrometría de luz ultravioleta. La concentración de ARN total en la mayoría de las muestras fue de 300-400 µg/mL.

Por otra parte, la pureza fue determinada a través de parámetros de absorbancia (A) establecidos para proteínas ($A_{260/280}$), y compuestos aromáticos ($A_{230/260}$). Los valores obtenidos para estos ambos parámetros fue de 1.8, valores adecuados para la realización del estudio.

Amplificación mediante la reacción de la cadena de la polimerasa en transcripción inversa (RT-PCR) de genes relacionados con la apoptosis en un modelo experimental de la EP inducido con la Neurotoxina MPTP

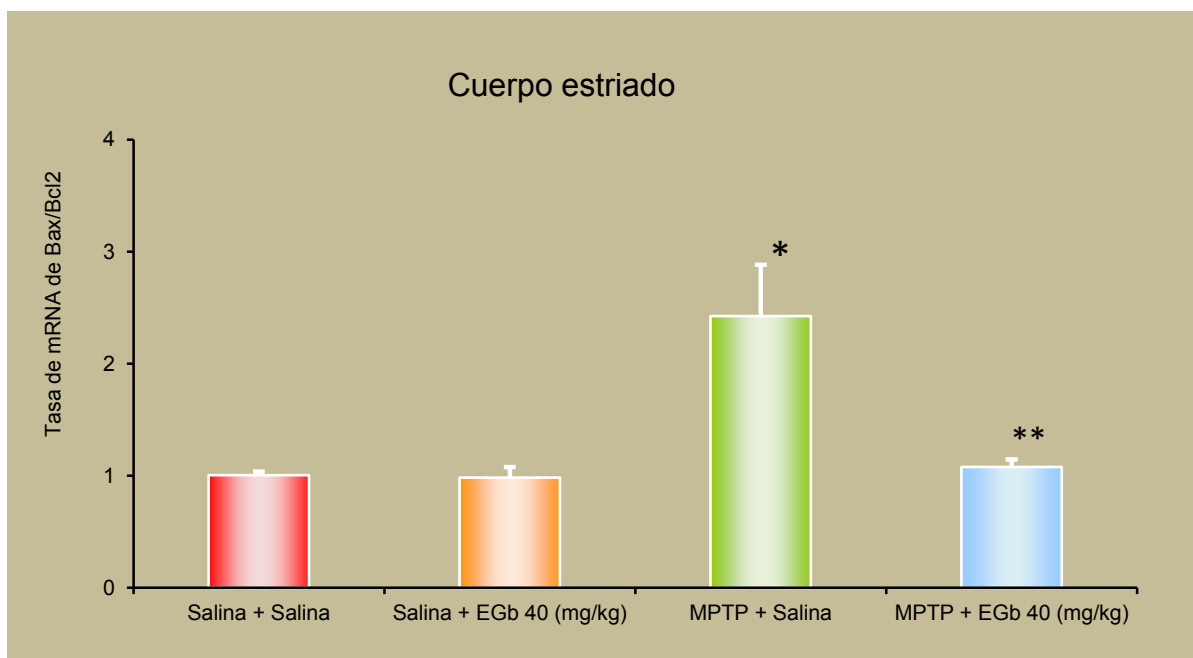
Para analizar el efecto del EGb 761 en la expresión de genes relacionados con la apoptosis se utilizó la técnica de RT-PCR. Los grupos utilizados fueron: Salina+Salina, Salina+EGb 761, MPTP+Salina y MPTP+EGb 761.

En el presente estudio se analizó los cambios en la expresión la tasa de expresión de mRNA de Bax/Bcl-2 y Caspasa 3, en el mesencéfalo y el cuerpo estriado. Se observó disminución significativa en los niveles de la tasa e expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en el grupo agudo (MPTP-EGb 761) en relación al grupo agudo (MPTP-Salina) tanto en cuerpo estriado como en sustancia nigra. El grupo crónico a 18 días en el grupo MPTP+Salina en relación al grupo Salina+Salina, no observo diferencias estadísticamente significativas tanto en estriado como sustancia nigra.

Recambio de la expresión de los genes Bax/Bcl-2 en el cuerpo estriado, en el esquema con tratamiento agudo

En la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en el cuerpo estriado se observaron los siguientes resultados en el esquema con tratamiento agudo a 7 días (Gráfica 1):

En el grupo Salina+EGb761 no se observaron aumentos estadísticamente significativos en la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en relación al grupo Salina+Salina en el cuerpo estriado. El grupo Salina+EGb761 no registró cambio estadísticamente significativo en la expresión de la tasa del mRNA de Bax/Bcl-2 en relación al grupo Salina+Salina. La relación de la expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en el cuerpo estriado del grupo de ratones tratados con MPTP+Salina mostró aumento estadísticamente significativo del 141.25% ($p < 0.05$) en comparación con el grupo Salina+Salina. Del mismo modo, la relación de la expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en el grupo tratado con MPTP+EGb 761 registro una disminución estadísticamente significativa del 55.55% ($p < 0.05$) en relación al grupo con MPTP+Salina. Por otra parte, no existió diferencia significativa entre el grupo MPTP+EGb 761 y el grupo control (Salina+Salina); se puede decir que en los ratones tratados con EGb 761 se restableció los niveles basales de expresión del mRNA de Bax/bcl-2 posterior a la administración de la neurotoxina MPTP.

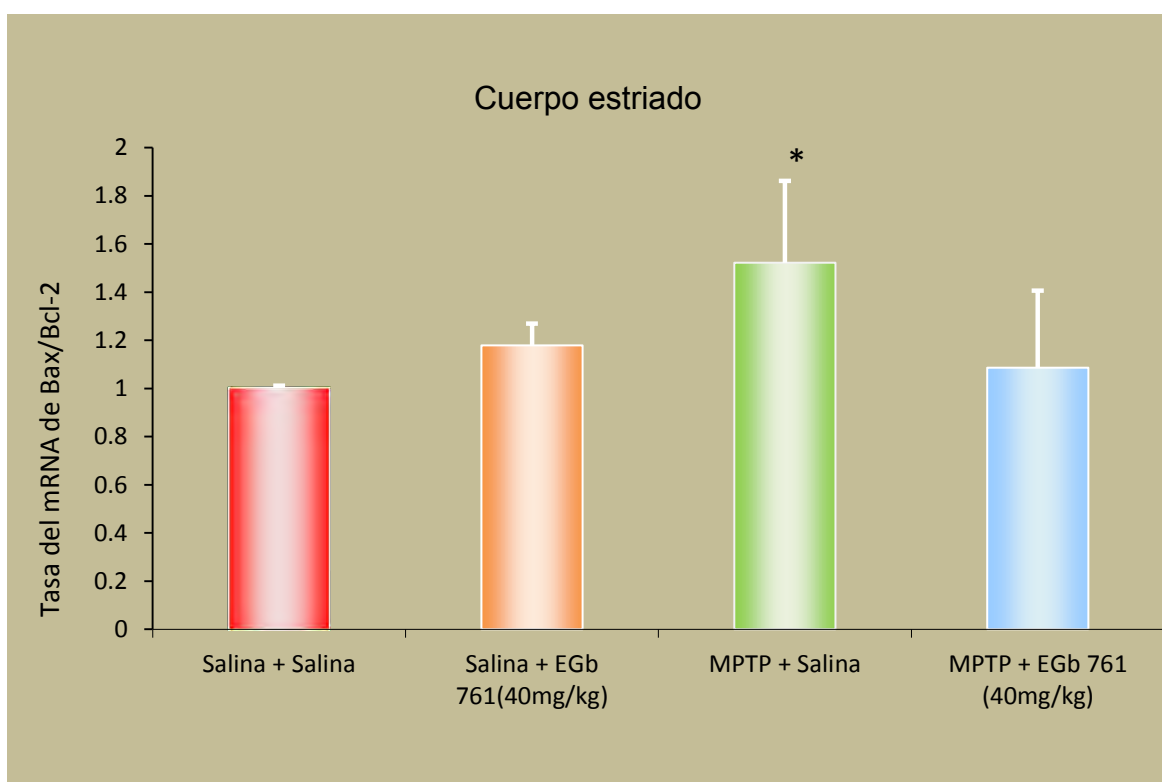


Gráfica 1. Media \pm e.e.m. de la Tasa de mRNA de Bax y Bcl-2 en el cuerpo estriado de animales sometidos al tratamiento agudo (7 días) con EGb 761. * $p < 0.05$ vs. grupo Salina+Salina; ** $p < 0.05$ vs. MPTP+Salina (ANOVA- Tukey). EGb 761= Extracto del *Ginkgo biloba*. MPTP= 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

Recambio de la expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en el cuerpo estriado, en el esquema con tratamiento crónico

En la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en el cuerpo estriado se observaron los siguientes resultados en el esquema con tratamiento de 18 días (Gráfica 2):

En el grupo Salina+EGb761 no se observaron aumentos estadísticamente significativos en la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en relación al grupo Salina+Salina en el cuerpo estriado. La tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en el grupo de ratones tratados con MPTP+Salina mostró aumento estadísticamente significativo del 51.90% ($p < 0.05$) en comparación con el grupo control (Salina+Salina). Además, la relación de la tasa de expresión de mRNA de Bax/Bcl-2 en el grupo tratado con MPTP+EGb 761 no mostró cambios estadísticamente significativos en relación al grupo con el esquema de tratamiento MPTP-Salina. No existió diferencia significativa entre el grupo MPTP+EGb 761 y el grupo control (Salina+Salina).

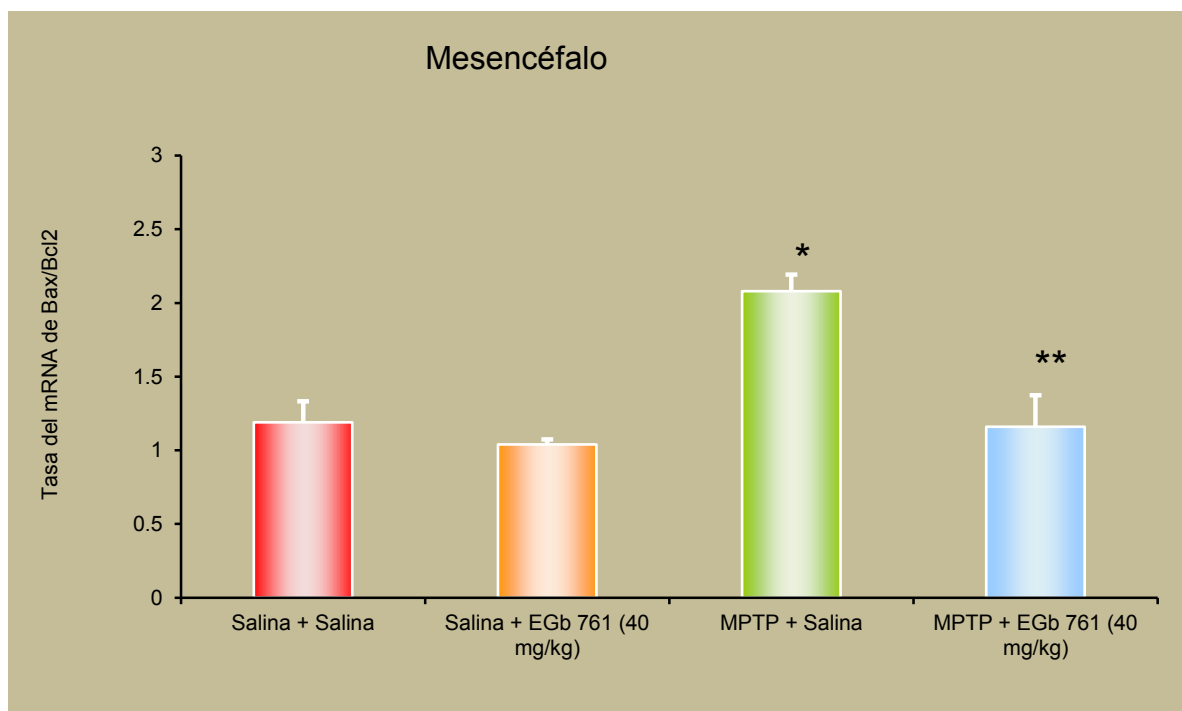


Gráfica 2. Media \pm e.e.m. de la Tasa de mRNA de Bax/ Bcl-2 en el cuerpo estriado de animales sometidos al tratamiento crónico (18 días) con EGb 761. EGb 761= Extracto del *Ginkgo biloba*. MPTP= 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

Expresión de los genes Bax/Bcl-2 en el mesencéfalo, en el esquema con tratamiento agudo

El recambio en la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en el mesencéfalo a 7 días del tratamiento se observaron los siguientes resultados (Gráfica 3):

En el grupo Salina+EGb761 no se observaron aumentos estadísticamente significativos en la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en relación al grupo Salina+Salina en el mesencéfalo. En relación a la tasa de expresión de mRNA Bax/Bcl-2 en el grupo de ratones tratados con MPTP+Salina se observó un aumento significativo del 74.78 % ($p < 0.05$) en relación con el grupo Salina +Salina. Los niveles de expresión de los mRNA Bax/Bcl-2 en el grupo tratado con MPTP+EGb 761 mostró una disminución estadísticamente significativa del 44.23% respecto al grupo con el esquema de tratamiento MPTP-Salina. No existió diferencia significativa entre el grupo MPTP+EGb 761 y el grupo control (Salina+Salina), se puede decir que el EGb 761 restableció los niveles basales de expresión de los genes Bax/bcl-2 posterior a la administración de la neurotoxina MPTP.

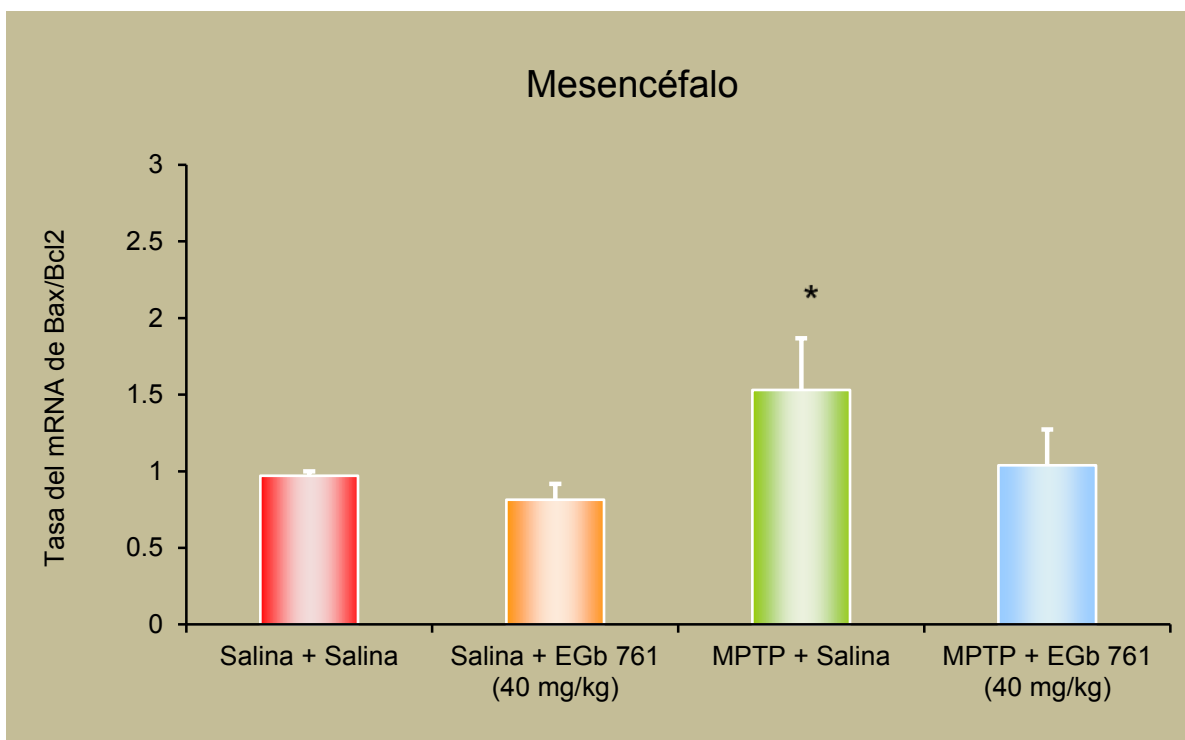


Gráfica 3. Media \pm e.e.m. de la Tasa de mRNA de Bax/Bcl-2 en el cuerpo mesencéfalo de animales sometidos al tratamiento agudo (7 días) con EGb 761. * $p < 0.05$ vs. grupo Salina+Salina; ** $p < 0.05$ vs. MPTP+Salina (ANOVA- Tukey). EGb 761= Extracto del *Ginkgo biloba*. MPTP= 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

Expresión de los genes Bax/Bcl-2 en el mesencéfalo, en el esquema con tratamiento crónico

La tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en el mesencéfalo se observaron los siguientes resultados en el esquema con tratamiento a 18 días (Gráfica 4):

En el grupo Salina+EGb761 no se observaron aumentos estadísticamente significativos en la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en relación al grupo Salina+Salina en el mesencéfalo. En relación a la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en el grupo de ratones tratados con MPTP+Salina se registró un aumento estadísticamente significativo del 57.68 % ($p < 0.05$) en relación con el grupo control (Salina +Salina). También en la relación de la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en el grupo tratado con MPTP+EGb no se observaron cambios estadísticamente significativos en lo niveles de expresión e Bax/Bcl-2 con respecto al grupo con el esquema de tratamiento MPTP-Salina. No existió deferencia significativa entre el grupo MPTP+EGb 761 y el grupo control (Salina+Salina).

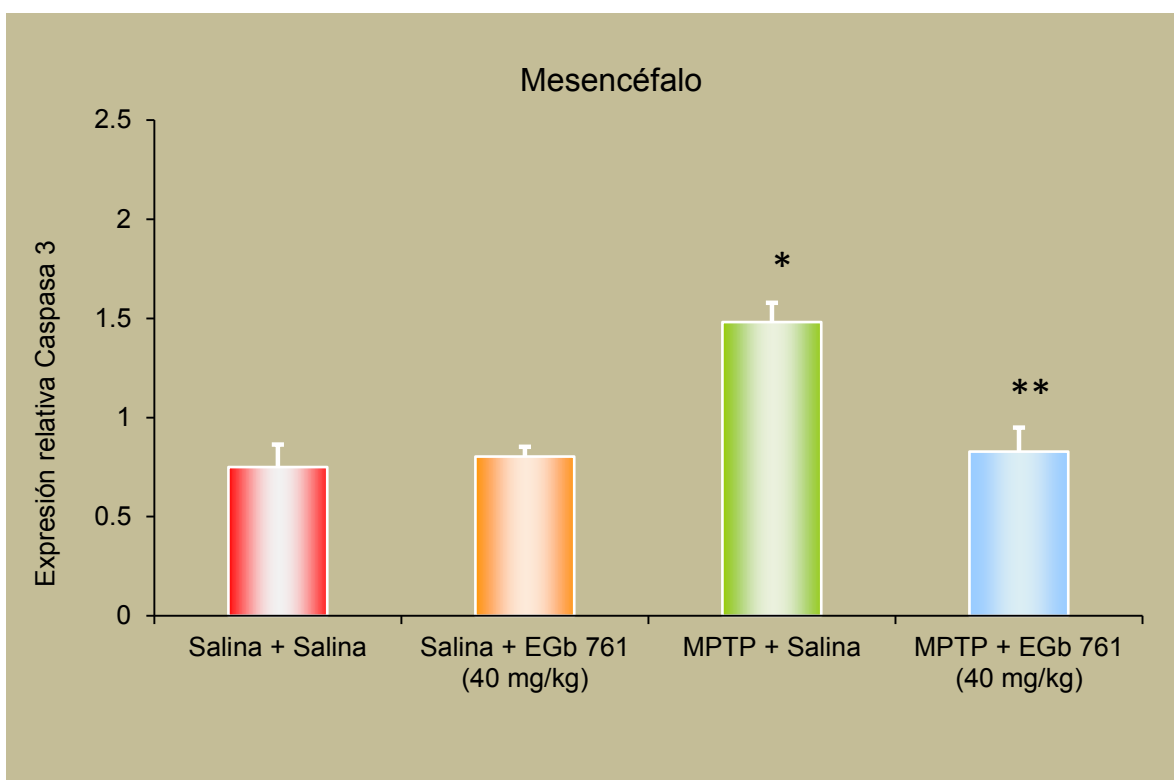


Gráfica 4. Media \pm e.e.m. de la Tasa de mRNA de Bax y Bcl-2 en el mesencéfalo de animales sometidos al tratamiento crónico (18 días) con EGb 761. EGb 761= Extracto del *Ginkgo biloba*. MPTP= 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

Expresión del gene Casp 3 en el mesencéfalo, en el esquema con tratamiento agudo

En la Gráfica 5 se presentan los resultados obtenidos de la expresión del mRNA de Caspasa 3 en el mesencéfalo en el esquema con tratamiento a 7 días.

En el grupo Salina+EGb761 no se observaron aumentos estadísticamente significativos en los niveles de expresión del mRNA de Caspasa 3 en relación al grupo Salina+Salina en mesencéfalo. En los niveles de expresión del mRNA de Caspasa 3 en el grupo de ratones tratados con MPTP+Salina se registró un aumento estadísticamente significativo del 97.46 % ($p<0.05$) en relación con el grupo control (Salina+Salina). Por último, en los niveles de expresión del mRNA de Caspasa 3 en el grupo tratado con MPTP+EGb 761 se observó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de expresión del mRNA de Caspasa 3 del 44.09% ($p<0.05$) en relación al grupo con el esquema de tratamiento MPTP+Salina. No existió diferencia significativa entre el grupo MPTP+EGb 761 y el grupo control (Salina+Salina).

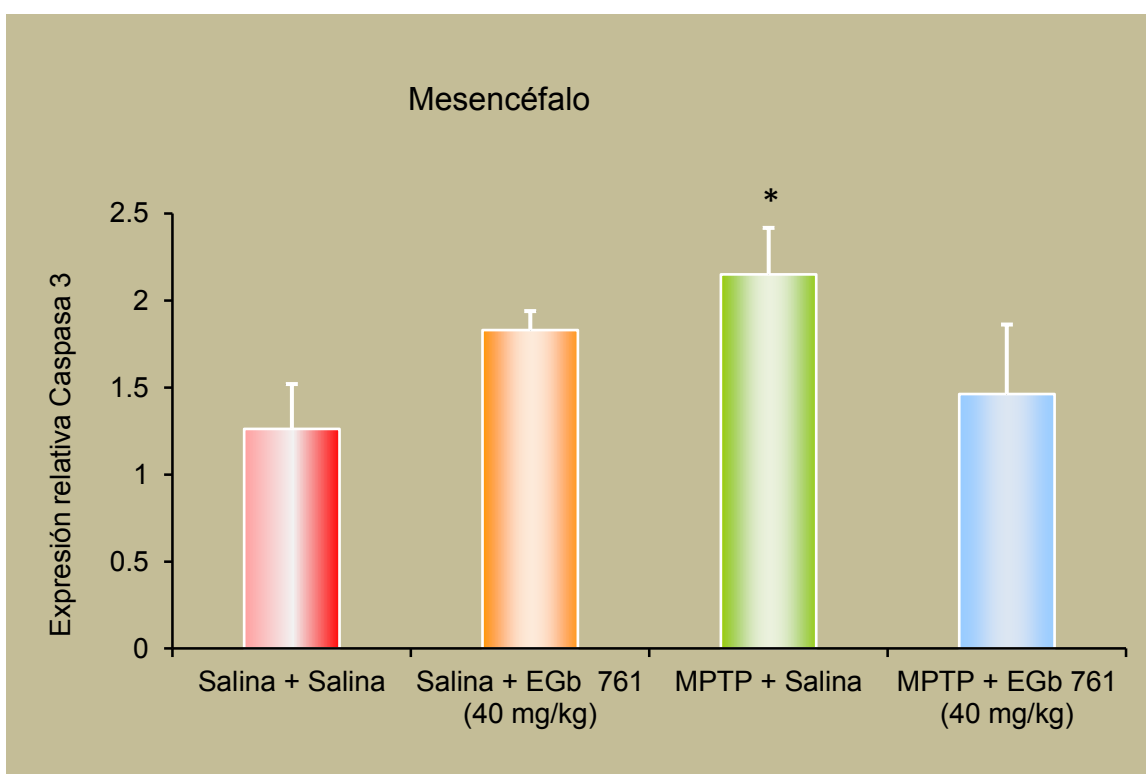


Gráfica 5. Media \pm e.e.m. de los niveles de expresión del mRNA de caspasa 3 en el mesencéfalo de animales sometidos al tratamiento agudo (7 días) con EGb 761. * $p<0.05$ vs. grupo Salina+Salina; ** $p<0.05$ vs. MPTP+Salina (ANOVA- Tukey). EGb 761= Extracto del *Ginkgo biloba*. MPTP= 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

Expresión del gene Casp 3 en el mesencéfalo, en el esquema con tratamiento crónico

La expresión relativa del mRNA de Caspasa 3 ejecutora de la apoptosis, mostró los siguientes resultados en el mesencéfalo a 18 días tratamiento (Gráfica 6):

En el grupo Salina+EGb761 no se observaron aumentos estadísticamente significativos en los niveles de expresión del mRNA de Caspasa 3 en relación al grupo Salina+Salina en mesencéfalo. La expresión relativa del mRNA de Caspasa 3 en el grupo de ratones tratados con MPTP+Salina mostró aumento estadísticamente significativo del 70.36% ($p<0.05$) en relación con el grupo control (Salina +Salina). En la expresión relativa del mRNA de Caspasa 3 en el grupo tratado con MPTP+EGb 761 no se registró una disminución estadísticamente significativa en relación al grupo con el esquema de tratamiento MPTP-Salina. No existió deferencia significativa entre el grupo MPTP+EGb 761 y el grupo Salina+Salina.

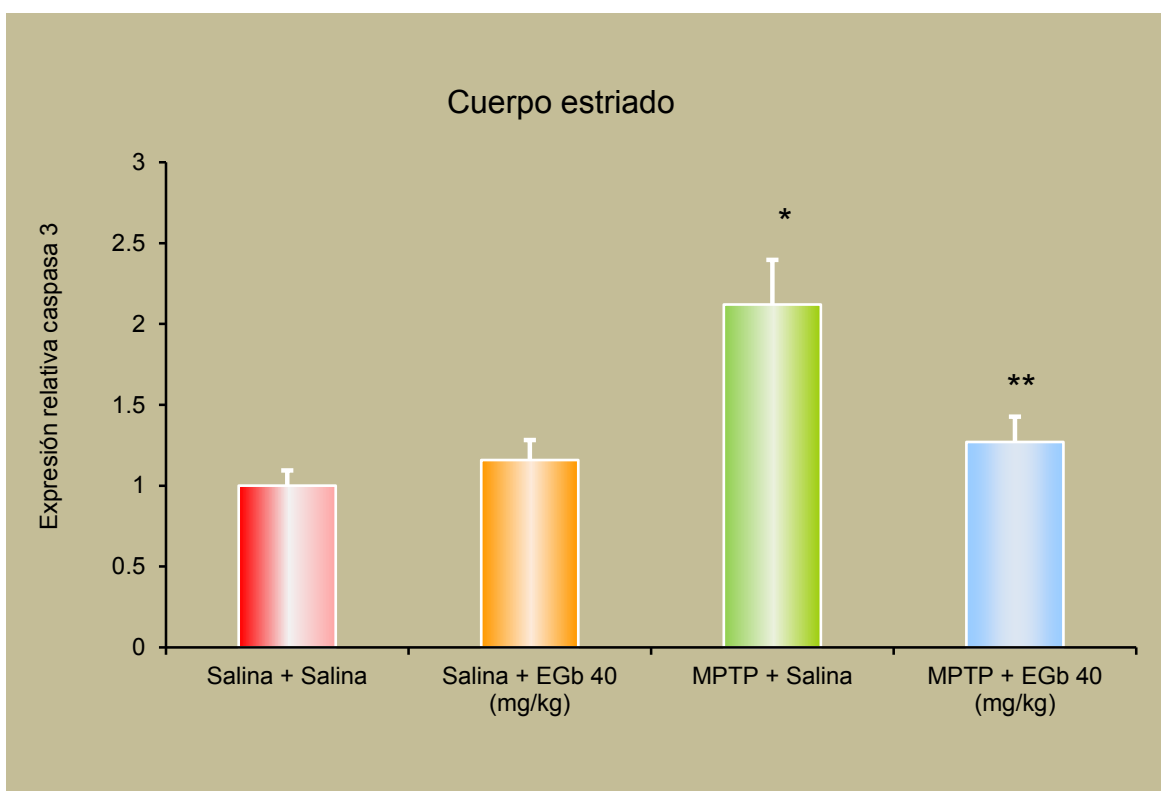


Gráfica 6. Media \pm e.e.m. de los niveles de expresión de mRNA de Caspasa 3 en el mesencéfalo de animales sometidos al tratamiento crónico (18 días) con EGb 761. * $p<0.05$ vs. grupo Salina+Salina. EGb 761= Extracto del *Ginkgo biloba*. MPTP= 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

Expresión del gene Casp 3 en el estriado, en el esquema con tratamiento agudo

Los resultados de la expresión relativa del mRNA de Caspasa 3 en el cuerpo estriado a 7 días del tratamiento se muestran en la Gráfica 7.

En el grupo Salina+EGb761 no se observaron aumentos estadísticamente significativos en los niveles de expresión del mRNA de Caspasa 3 en relación al grupo Salina+Salina en mesencéfalo. La expresión relativa del mRNA de Caspasa 3 en el grupo de ratones tratados con MPTP+Salina se observó aumento estadísticamente significativo del 112% ($p < 0.05$) en relación con el grupo control (Salina+Salina). En la expresión del gen Casp 3 en el grupo tratado con MPTP+EGb 761 se observó una disminución estadísticamente significativa del 40.09% ($p < 0.05$) en relación al grupo con el esquema de tratamiento MPTP+Salina. Existió diferencia sin significancia del 27% entre el grupo MPTP+EGb 761 en relación al grupo control (Salina+Salina).



Gráfica 7. Media \pm e.e.m. de los niveles de expresión del mRNA de caspasa 3 en el cuerpo estriado de animales sometidos al tratamiento agudo (7 días) con EGb 761. * $p < 0.05$ vs. grupo Salina+Salina; ** $p < 0.05$ vs. MPTP+Salina (ANOVA- Tukey). EGb 761= Extracto del *Ginkgo biloba*. MPTP= 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

7 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente estudio se enfocó en determinar el efecto antiapoptótico del EGb 761 sobre la expresión de genes involucrados en la cascada apoptótica en el modelo experimental de la EP inducida con MPTP.

Evaluación de la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en el cuerpo estriado en el tratamiento agudo y crónico con EGb 761

En los resultados obtenidos tanto en el grupo a 7 días como a 18 días para la tasa de expresión Bax/Bcl2 no se observó un aumento estadísticamente significativo del grupo Salina-EGb 761 en comparación con el grupo Salina-Salina, lo que nos sugiere que el EGb 761 no aumenta por sí mismo los niveles de expresión de Bax/Bcl-2.

Además los grupos tratados con MPTP-Salina a 7 y 18 días registraron un aumento estadísticamente significativo de los niveles de la tasa de expresión de Bax/Bcl-2 en comparación con el grupo control Salina+Salina, esto se podría atribuir a la neurotoxicidad y estrés oxidativo inducida por la toxina MPTP, aumentando la generación de radicales libre y la producción de moléculas proapoptóticas como Bax, Caspasa 3, 8 y 7 (Hartman y col., 2000; Reed, 2000; Tatton, 2000; Rojas y col., 2012a).

El grupo tratado con MPTP-EGb 761 a 7 días mostró disminución significativa en los niveles de la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl2 en relación al grupo con MPTP+Salina a 7 días esto atribuible a su capacidad neuroprotectora y atrapadora de radicales libres (Rojas y col., 2004). Por otra parte, el grupo administrado con MPTP-EGb 761 a 18 días no registró disminución estadísticamente significativa de los niveles en la tasa de expresión de mRNA de Bax/Bcl-2 en relación al grupo MPTP-Salina este evento podría explicarse en parte a que las neuronas dopaminérgicas han reducido o eliminado el daño celular debido a sus mecanismo basales de reparación de daño celular y por otra parte a el efecto del EGb 761 que ha restaurado los niveles basales de expresión de Bax/Bcl-2 en el grupo MPTP-EGb-761 (Rojas y col., 2004; Rojas y col., 2008; Quing y col., 2010; Rojas y col., 2012a; Rojas y col., 2012b).

Evaluación de la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en mesencéfalo agudo a 7 días y crónico a 18 días de tratamiento

Apartir de los resultados obtenidos de los niveles de expresión de Bax/Bcl-2 en el mesencéfalo en el grupo Salina-EGb 761 en comparación con el grupo Salina-Salina, se puede observar que no hay un aumento en la expresión de Bax/Bcl2 en ambos grupos a 7 y 18 días de administración, esto como se mencionó anteriormente se puede explicar debido a que el EGb 761 no induce un aumento en la expresión de genes proapoptóticos y provee mecanismo de protección que preserva la integridad de la membrana mitocondrial. Además disminuye la sobreproducción de EROs regulando a la baja la relación Bax/Bcl-2 (Sushruta y col., 2012). Por otra parte, se observó claramente que el tratamiento MPTP+Salina incrementa significativamente los niveles de la tasa de expresión del mRNA de Bax/bcl-2 en los esquemas tratamiento a 7 y 18 días en relación al grupo Salina-Salina. Ambos aumentos de la tasa de expresión Bax/Bcl-2 en los esquemas de administración, se debe principalmente a que el MPTP induce la sobre-expresión de Bax y la regulación a la baja de Bcl-2 especialmente en la SNpc (Venderova y Park, 2012; Rojas y col., 2012).

Además, la diferencia entre la tasa de expresión del mRNA a 7 y 18 días en el esquema MPTP+Salina se podría explicar debido a que el pico máximo de la transcripción de Bax y la disminución significativa de Bcl-2, que se presenta dos días después a la última inyección de MPTP y al día 7 posterior a la última administración de MPTP, se observó disminución en los niveles basales de transcripción de Bax (Vila y col., 2000). El grupo MPTP-EGb 761 a 7 días, mostró disminución significativa en los niveles de la tasa de expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 en comparación con el grupo MPTP+Salina a 7 días, reafirmando la acción neuroprotectora del EGb 761 sobre las neuronas dopaminérgicas ante el daño inducido por la MPTP. Por otra parte, el grupo MPTP+EGb 761 a 18 días, no mostro diferencias estadísticamente significativas, esto en comparación con el grupo MPTP+Salina. Esto se podría explicar debido a la acción antiapoptótica del EGb 761 en el grupo MPTP-EGb 761 (Rojas y col., 2004; Petros y col., 2004) que redujo los niveles de expresión Bax/Bcl2 a casi su expresión basal. Por otra parte, los mecanismos intrínsecos de reparación de daño celular y los 18 días que transcurrieron después de la administración de MPTP podrían explicar la disminución en la expresión de Bax/Bcl-2 en el grupo MPTP-Salina, además que el pico máximo de transcripción de Bax se presenta dos días después de la última administración de MPTP (Vila y col., 2000) como se mencionó anteriormente.

Análisis de la expresión del mRNA de Caspasa 3 en el mesencéfalo

En los resultados obtenidos, se observó que el EGb 761 no induce el aumento en la tasa de expresión del mRNA de Caspasa 3, esto se puede observar al comparar los grupos Salina-Salina y Salina-EGb 761 tanto en el esquema de administración a 7 y 18 días (Shen y col., 2011). Además el grupo con el esquema de administración MPTP+Salina con tratamiento agudo registró un aumento estadísticamente significativo en la expresión del mRNA de Caspasa 3 en relación al grupo control (Salina+Salina), lo anterior podría atribuirse a que el MPTP promueve una disminución en la expresión de Bcl-2 induciendo la activación de Bax y ataque a la membrana mitocondrial provocando la liberación de Citocromo C, que estimula el aumento en la expresión de la Caspasa 3 (Villa y col., 2001). De la misma manera, el grupo MPTP-Salina con tratamiento crónico aumentó los niveles de la expresión del mRNA de Caspasa 3 comparado con el grupo MPTP-Salina con tratamiento crónico. Esto se podría explicar debido a que el MPTP aumenta la producción de RL y EROs, compuestos que atacan la integridad de la membrana externa mitocondrial, propiciando el cambio en el potencial eléctrico que favorece la formación de poros membranales, por donde se libera citocromo C desde la mitocondria al citosol celular y que propicia la escisión y activación de la caspasa 3 ejecutora. Aunado a lo anterior, se ha reportado que el MPTP aumenta la transcripción de la proteína Bax y disminuye la transcripción de Bcl-2, permitiendo que Bax ataque la membrana exterior de la mitocondria promoviendo la liberación de citocromo C y en consecuencia la activación de la caspasa 3 ejecutora, la cual induce la muerte por apoptosis (Lim y col., 2011).

El grupo MPTP-EGb 761 con tratamiento agudo, mostró reducción estadísticamente significativa en los niveles de expresión del mRNA de Caspasa 3 comparado con el grupo MPTP-Salina. Por otra parte, el grupo tratado con MPTP-EGb 761 a 18 días no registró una disminución significativa en los niveles de expresión del mRNA de Caspasa 3 en relación al grupo MPTP-Salina a 18 días. Esto podría explicarse debido a que en el grupo MPTP-Salina se redujeron los niveles de expresión de caspasa 3 debido a la acción de los mecanismo de detoxificación y reparación celular basales contribuyeron a dicha disminución en la expresión del mRNA de Caspasa 3, aunado a que en el grupo MPTP-EGb 761 el EGb 761 se cree que participo revirtiendo lo efectos neurotóxicos inducidos por la MPTP (Rojas y col., 2012), inhibe la actividad de la Caspasa 3 (Luo y col., 2002; Rojas y col., 2012) y evita la acumulación de especies reactivas al oxígeno regulando la producción de radicales libres.

Análisis de la expresión del mRNA de Caspasa 3 en el cuerpo estriado con el tratamiento agudo a 7 días con EGb 761

En el esquema de tratamiento a 7 y 18 días en cuerpo estriado se observó que los niveles de expresión del mRNA de Caspasa 3 no se alteraron por la administración del EGb 761, esto se observó al comparar los resultados del grupo control (Salina-Salina) y el grupo Salina-EGb 761. Por otra parte, se observó que el grupo MPTP-Salina registró aumento significativo en los niveles de expresión del mRNA de Caspasa 3 en comparación con el grupo Salina+Salina a 7 días, esto en congruencia con los resultados anteriormente mencionados, este efecto se cree que es provocado por la neurotoxicidad generada por la MPTP (Tatton, 2000; Rojas 2012b). Por otra parte, el grupo tratado con EGb 761 (MPTP-EGb 761) disminuyó el nivel de la expresión del gen Casp 3 en relación al grupo MPTP-Salina en el esquema de tratamiento agudo. Lo que nos indica que el EGb 761 podría estar participando en la restauración de los niveles de expresión del mRNA de caspasa 3 (Shen y col., 2011).

Tomando en conjunto todos los resultados, se demostró que el EGb 761 es capaz de modular la expresión de los genes relacionados con la cascada apoptótica y restablecer su expresión a los niveles basales, proporcionando un efecto de neuroprotección ante el daño provocado por la neurotoxina MPTP. Así mismo, se podría atribuir al EGb 761 la restauración de los niveles de la tasa de expresión de Bax/Bcl-2 en mesencéfalo en el esquema de tratamiento agudo a los 7 días y crónico a 18 días después del aumento en la tasa de expresión de los genes Bax/bcl-2 inducido por la administración del MPTP. De la misma manera, el fitofármaco EGb 761 fue capaz de restablecer los niveles de expresión de Bax/Bcl-2 en el cuerpo estriado en ambos esquemas de administración.

Por otra parte, el EGb 761 restableció la expresión de Caspasa 3 en el mesencéfalo después del daño producido por la neurotoxina MPTP esto en ambos esquemas de tratamiento (7 y 18 días). En el cuerpo estriado se observó la misma restauración de la expresión de Casp 3 después de la administración de la MPTP. Esto es una clara evidencia de que el EGb 761 promueve la supervivencia celular modulando los niveles de expresión de los genes relacionados con la cascada apoptótica en nuestro modelo experimental.

8 CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró que el EGb 761 exhibió efectos neuroprotectores ante pérdida neuronal por apoptosis que induce la neurotoxina MPTP. Estos efectos parecen estar correlacionados con la actividad multifactorial de este compuesto, incluyendo el alivio de la neurotoxicidad del MPTP, actuando como un modulador apoptótico, promoviendo la supervivencia celular al regular la expresión génica de la familia Bcl-2 y las caspasas. En combinación con previos estudios realizado en el laboratorio y la presente tesis, se puede afirmar que el EGb 761 exhibe propiedades antioxidantes, detoxificantes y de neuroprotección, además de actuar como un modulador de apoptótico, lo que no hace supones que el EGb 761 tiene el potencial no solo para retrasar la progresión en la EP, sino que también revertir el daño neurodegenerativo, propiciando la mejora en los síntomas motores y no motores provocados por la EP. Por lo tanto y bajo la evidencia de los resultados, se propone al EGb 761 como una herramienta terapéutica aplicable clínicamente para el tratamiento de la EP.

REFERENCIAS

Adams, J.D., Klaidman, L.K., Leung, A. (1993). MPP⁺ and MPDP⁺ induced oxygen radical formation with mitochondrial enzymes. *Free Radic Biol Med*, 15,181–186.

Ahmad, M., Saleem, S., Ahmad, A.S., Yousuf, S., Ansari, M.A., Khan, M.B. (2005). Ginkgo biloba affords dose-dependent protection against 6-hydroxydopamine– induced parkinsonism in rats: neurobehavioural, neurochemical and immunohistochemical evidences. *J Neurochem*, 93,94–104.

Alarcón, A.A., Abe, I. S.A., Mina, K.F. (2010). Modelos neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson y disfunción mitocondrial. *REB*. 29(3),92-100.

Alvarado-Gómez, O.G., Martínez-Soriano, J.P., Pereyra-alférez, B., Rocha-Peña, M. (2000). Comparación de métodos de extracción de RNA. *Rev Mex Pat*, 18(1),42-49.

Anderson, V.C., Burchiel, K.J., Hogarth, P., Favre, J., Hammerstad, J.P. (2005). Pallidalvssubthalamic nucleus deep brain stimulation in Parkinson disease. *Arch. Neurol*, 62(4),554-560.

Arai, H., Furuya, T., Mizuno, Y., Mochizuki, H. (2006). Inflammation and infection in Parkinson's disease. *Histol Histopathol*, 21,673-678.

Baas, H., Beiske, A.G., Ghika, J., Jackson, M., Oertel, W.H., Poewe, W. (1997). Catechol-O-methyltransferase inhibition with tolcapone reduces the 'wearing off' phenomenon and levodopa requirements in fluctuating parkinsonian patients. *J NeurolNeurosurg Psychiatry*, 63,421-428.

Belka, C., Budach, W. (2002). Anti-apoptotic BCL-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *Int J Radiat Biol*, 78(8),643-58.

Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., Greenamyre, J.T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 3,1301–1306.

Bilia, A.R. (2002). Ginkgo biloba. *L. Fitoterapia*. 73,276–9.

Bloem, B.R., Irwin, I., Buruma, O.J., Haan, J., Roos, R.A., Tetrud, J.W., Langston, J.W., (1999). The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 97(2-3),273-293.

Bridi, R., Crossetti, F.P., Steffen, V.M., Henriques, A.T. (2001). The antioxidant activity of standardized extract of Ginkgo biloba (EGb 761) in rats. *Phytother Res*,15,449–51.

Bohlen, O.U., Haalbach, C. (2005). Animal models of Parkinson disease. *Neurodegener Dis*, 2,313-320.

Bonnet, A.M. (2012). Nonmotor Symptoms in Parkinson's Disease in 2012: Relevant Clinical Aspects. *Parkinson's Disease*, 1,1-15.

- Bronstein, J.M., Volkman, J., Krack, P., Reza, A., Weaver, F.M. (2010). Deep Brain Stimulation for Parkinson Disease. *Arch Neurol*, 68(2), 165-171.
- Chan, L.W., Wang, Y.Q., Wei, L.C., Shi, M., Chan, Y.S. (2007). Chinese herbs and herbal extracts for neuroprotection of dopaminergic neurons and potential therapeutic treatment of Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 6, 273–81.
- Clarke, C., Moore, A.P. (2005). Parkinson's Disease. *Clin Evid*, 13-14.
- Cohen, G. (1999). Oxidative stress and Parkinson's disease, In *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: an Interdisciplinary Approach*, ed. Gilbert D. L. & Colton, 593—608.
- Crosby, N., Deane K.H. & Clarke C.E. (2003). Amantadine in Parkinson's disease. *Cochrane Database. Syst Rev*.
- Dauer, W., Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*, 39:889-909.
- De Sande, G. (2012). The survivin: cellular homeostasis. *Carcin*, 4-6.
- DeFeudis, F.V., Drieu, K. (2000). Ginkgo biloba extract (EGb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications. *Curr Drug*, 1, 25–8.
- DeFeudis, F.V. (1998). Ginkgo biloba extract (EGb761): from chemistry to the clinic. 1st ed. Wiesbaden, Germany: Ullstein Medical.
- Desagher, S., Martinou, J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*, 10, 369-377.
- Dewson, G., Kratina, T., Czabotar, P., Day, C.L., Adams, J.M., Kluck, R.M. (2009). Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their $\alpha 6$ helices. *Mol Cell*, 36, 696–703.
- Diamond, B.J., Shiflett, S.C., Feiwel, N., Matheis, R.J., Noskin, O., Richards, J.A., Schoenberger, N.E. (2000). Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications. *Arch Phys Med Rehabil*, 81, 668–78.
- Dlugosz, P.J., Billen, L.P., Annis, M.G., Zhu, W., Zhang, Z., Lin, J., Leber, B., Andrews, D.W. (2006). Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J*, 25, 2287–2296.
- Drieu, K. (1986). Preparation and definition of G. biloba extract. *Press Med*, 15, 1455–7.
- Droy-Lefaix, M.T., Cluzel, J., Menerath, J.M., Bonhomme, B., Doly, M. (1995). Antioxidant effect of a Ginkgo biloba extract (EGb761) on the retina. *Int J Tissue React*, 17, 93–100.
- Dukes, A.A., Korwek, K.M., Hastings, T.G. (2005). The effect of endogenous dopamine in rotenone-induced toxicity in PC12 cells. *Antioxid Redox Signal*, 7, 630-638.

Eberhardt, O., Schulz, J.B. (2003). Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. *Toxicol. Lett*, 139,135-151.

Eckert, A., Keil, U., Kressmann, S., Schindowski, K., Leutner, S., Leutz, S. (2003). Effects of EGb 761 Ginkgo biloba extract on mitochondrial function and oxidative stress. *Pharmacopsychiatry*, 36,S15–S23.

Edinger, A.L., Thompson, B.C., (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology*. 16,663-669.

Fahn, S., Shoulson, I., Rudolph, A. (2004). Levodopa and the Progression of Parkinson's Disease. *N Engl J Med*, 351,2498-508.

Farlie, P.G., Dringen, R., Rees, S.M., Kannourakis, G., Bernard, O. (1995). Bcl-2 transgene expression can protect neurons against developmental and induced cell death. *Proc. Natl Acad Sci USA.*, 92,4397–4401.

Fitzmaurice, P., Ang, L., Guttman, M., Rajput, A., Furukawa, Y., Kish, S. (2003). Nigral glutathione deficiency is not specific for idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord*, 18,969-976.

Gardes-Albert, M., Ferradini, C., Sekaki, A., Droy-LeFaix, M.T. (1992). Oxygen-centered free radicals and their interactions with EGb 761 or CP 202. In: Ferradini C, Droy-LeFaix MT, Christen C, editors. *Advances in Ginkgo biloba extract research, Volume 2. Ginkgo biloba extract (EGb 761) as a free radical scavenger*. Paris: Elsevier, 1–11.

Gerlach, M., Riederer, P., Przuntek, H., Youdim, MBH. (1991). MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol*, 208,273–86.

Glowinski, J. , and Iversen, L. L. , *J. Neurochem.*, 13, 655 (1966).

Graham. D.G. (1978). Oxidative Pathways For Catecholamines in the Genesis of Neuromelanin and Cytotoxic Quinones. *Mol Pharmacol*, 14,633-643.

Gohil, K., Packer, L. (2002). Global gene expression analysis identifies cell and tissue specific actions of Ginkgo biloba extract, EGb 761. *Cell Mol Biol*, 48,625–31.

Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, 97(6),1634-1658.

Hartmann, A., Hunot, S., Michel, P.P., Murie, I.M.P., Vyas, S., Faucheux, B.A., Mouatt-Prigent, A., Turmel, H., Srinivasan, A., Ruberg, M., Evan, G.I., Agid, Y., Hirsch, E.C. (2000). Caspase-3: a vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci*, 97,2875-2880.

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

Hassouna, I., Wickert, H., Zimmermann, M., Gillardon, F., (1996). Increase in bax expression in substantia nigra following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment of mice. *Neurosci Lett*, 204,85–88.

Hattori, K., Naguro, I., Runchel, C., Ichijo, H. (2009). The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases. *Cell Commun Signaling*, 7,9.

Rajput, H., (2013). Effects of Atropa belladonna as an Anti-Cholinergic. *Nat Prod Chem Res*, 1,2.

Hynes, N., Bishai, I., Lees, J., Coceani, F. (1991). Leukotrienes in brain: natural occurrence and induced changes. *Brain Res*, 553,4–13.

Jabbari, B., Pazdan, R., (2005). Treatment of Parkinson's disease with anticholinergic medications. In Ebadi M, Pfeiffer FR. *Parkinson's disease*. CRC. New York, 667-684.

Kang, X., Chen, J., Xu, Z., Li, H., Wang, B. (2010). Protective effects of Ginkgo biloba extract on paraquat-induced apoptosis of PC12 cells. *Toxicol In Vitro*, 21,1003–9.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J cancer*, 26(4), 239-57.

Kleijnen, J., Knipschild, P. (1992). Ginkgo biloba. *Lancet*, 340,1136–9.

Korsmeyer, S.J., Shutter, J.R., Veis, D.J., Merry, D.E., Oltvai, Z.N. (1993). Bcl-2/bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Sem Canc Biol*, 4(6),327-32.

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stanhlberg, A., Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3),95-125.

Kuhlmann, C. A., Guilarte, R.T. (1999). Regional and temporal expression of the peripheral benzodiazepine receptor in MPTP neurotoxicity. *Toxicol Sci*, 48(1),107-16.

Lang, A.E., Blair, R.D.G.(1989).Anticholinergic drugs and amantadine in the treatment of Parkinson's disease. In: Calne DB, ed. *Handbook of experimental pharmacology, Drugs for the Treatment of Parkinson's Disease*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 28,345-57

Langston, J.W., Irwin, I., Ricourte, G.A. (1987).Neurotoxins, Parkinsonism and Parkinson's disease. *Pharmacol Ther*, 32,19-49.

Levine, C.B., Fahrbach, K.R., Siderowf. (2003). *Diagnosis and Treatment of Parkinson's Disease: A Systematic Review of the Literature*. Evidence Report/Technology Assessment Number 57. (Prepared by Metaworks, Inc., under Contract No. 290-97-0016).

- Li, S., Tang, D., Xue, Z., Zhang, Z., Sun, X., Liu, Y. (2011). Biphasic effect of EGb 761 on simulated ischemia-induced rat BMSC survival in vitro and in vivo. *Life Sci*, 88,853–63.
- Lim, S., Yoon, W.J., Kang, S.K., Choi, S.C., Cho, B.J., Kim, M. (2011). EGb761, a Ginkgo biloba extract, is effective against atherosclerosis in vitro, and in a rat model of type 2 diabetes. *PloS ONE*, 6,1–9.
- Liou, A.K., Zhou, Z., Pei, W., Lim, T.M., Yin, X.M., Chen, J. (2005). BimEL up-regulation potentiates AIF translocation and cell death in response to MPTP. *Faseb J*, 19,1350–1352.
- Liu, T.J., Yeh, Y.C., Ting, C.T., Le, W.L., Wang, L.C., Lee, H.W. (2008). Ginkgo biloba extract 761 reduced doxorubicin-induced apoptotic damage in rat hearts and neonatal cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 80,227–35.
- López, D.S., Rivas, A.S. (2008). Estrés oxidativo, metabolitos oxidados de dopamina y enfermedad de Parkinson. *Rev Fac Med UNAM*. Vol. 51(3),104-107.
- Lu, G., Wu, Y., Mak, Y.T., Wai, S.M., Feng, Z.T., Rudd, J.A., Yew, D.T. (2006). Molecular evidence of the neuroprotective effect of Ginkgo biloba (EGb 761) using bax/bcl-2 ratio after brain ischemia in senescence-accelerated mice, strain prone-8. *Brain Res*,1090,23–8.
- Luo, Y., Julie, V., Smith, P.V., Burdick, A., Kenneth, J, Curry, J.P., Khan, I., Netzer J.W., XuH, B.P. (2002). Inhibition of amyloid- aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. *PNAS*, 99(19),12197–12202.
- Lyons, K.E., Pahwa, R. (2005). Amantidine. In Ebadi M and Pfeifferi RF. *Parkinson's disease*. CRC Press Florida, p. 685-690.
- Maitra, I., Marcocci, L., Droy-Lefaix, M.T., Packer, L. (1995). Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem Pharmacol*, 49,1649–55.
- Maniatias, T., Sambrook, J., Fritsh, E.F. (2010). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, NY: Cold Spring harbor Press, 2nd Ed.
- Manyam, B.V. (2000). Ayurvedic approach to neurologic illness. In: Weintraub MI, ed. *Alternative Medicine in Neurologic Illness*. Philadelphia, Mosby (in press).
- Marcocci, L., Packer, L., Droy-Lefaix, M., Sekaki, A., Gardes-Albert, M. (1994). Antioxidant action of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Methods Enzymol*, 234,462–75.
- Marsden, C.D. & Parkes, J.D. (1977). Success and problems of long term levodopa therapy in Parkinson's disease. *Lancet*, 1,345-349.
- Martínez-Lazcano, J.C., Boll-Woehrlen, Ma.C., Paz, M., Rubio-Osornio, M., Sánchez-Mendoza, A., Ríos, C., Pérez-Severiano, F. (2010). Radicales libres y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. *Mensaje bioquímico*, 34,43-60.

Mattson, M.P. (1998). Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci*, 21,53–7.

Moussa, B.H., Youdim, Edmondson, D., Tipton, K.F. (2006). The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature Reviews Neuroscience*. 7, 295-309.

Müller, T. (2011). Motor complications, levodopa metabolism and progression of Parkinson's disease. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 7(7),847-855.

Münchau, A., Bhatia, K.P. (2000). Pharmacological treatment of Parkinson's disease. *Postgrad Med J*, 76,602-610.

Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 95(25), 14681-6.

Nevado, J., Sanz, R., Sanchez-Rodriguez, C., Garcia-Berrocal, J.R., Martin-Sanz, E., Gonzalez-Garcia, J.A. (2010). Ginkgo biloba extract (EGb 761). protects against aging-related caspase-mediated apoptosis in rat cochlea. *Acta Otolaryngol*, 130,1101–12.

Ni, Y., Zhao, B., Hou, J., Xin, W.(1996). Preventive effect of Ginkgo biloba extract on apoptosis in rat cerebellar neuronal cells induced by hydroxyl radicals. *Neurosci Lett*, 214,115–8.

Nicholls, D.G., Budd, S.L. (2000) Mitochondrial and neuronal survival. *Physiol Rev*, 80,315-360.

Nikolova, G. (2012). Oxidative stress and Parkinson disease. *Trakia journal of sciences*. 10(1),92-100.

Obeso, J.A., Rodriguez-Orfoco, M.C., Rodriguez, M., Arbizu, J., Jimenez-Amaya, J.M. (2002). The basal ganglio and disorders. of movement: pathophysiological machanisms. *New Physiol Sci*, 17,51-55.

Olanow, C.W., Watts, R.L., Koller, W.C. (2001). An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease (2001): treatment guidelines. *Neurology*, 56,S1-S5.

Orr, C.F., Rowe, D.B., Halliday, G.M. (2002). An inflammatory review of Parkinson's Disease. *Neurobiology*, 68,325-340.

Ortiz, G.G., Crespo-López, M.E., Morán-Moguel, C., Garcia, J.J., Reiter, J.R. Acuña-Castroviejo, D. (2001). Protective role of metatonin against MPTP-induced mouse brain cell DNA fragmentation and apoptosis in vivo. *Neuro Endocrinol Lett*, 22(2),101-8.

Pagni, C.A., Altibrandi, M.G., Bentivoglio, A., Caruso, G., Cioni, B., F. (2005). Extradural motor cortex stimulation (EMCS) for Parkinson's disease. History and first results by the study group of the Italian neurosurgical society. *Act. Neuroch*, 93,113-9.

Pardon, M.C., Joubert, C., Perez-Diaz, F., Christen, Y., Launay, J.M., Cohen-Salmon, C. (2000). In vivo regulation of cerebral monoamine oxidase activity in senescent controls and chronically stressed mice by long-term treatment with Ginkgo biloba extract (EGb 761). *Mech Ageing Dev* 113,157–68.

Park, S.W., Kim, S.H., Park, K.H., Kim, S.D., Kim, J.Y., Baek, S.Y. (2004). Preventive effect of antioxidants in MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 363,243–246.

Parkinson Study Group (2000). Pramipexole vs. Levodopa as initial treatment for Parkinson's disease. *JAMA*, 284,1931-1938.

Pereira da Silva-Junior, F. (2005). Amantadine reduces the duration of levodopa-induced dyskinesia: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Parkinsonism Relat Disord*, 11,449–452.

Perier, C., Tieu, K., Guégan, C. (2005). "Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52),1912–1916.

Perry, T.L., Godin, D.V., Hansen, S. (1982). Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency. *Neurosci Lett*, 33,305-310.

Petros, A.M., Gunasekera, A., Xu, N., Olejniczak, E.T., Fesik, S.W. (2004). Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-x (L)-binding interface using NMR. *FEBS Lett*, 559(1-3),171-4.

Pletscher, A., Bartholini, G. (1971). Selective rise in brain dopamine by inhibition of extracerebral levodopa decarboxylation. *Clin Pharmacol Ther*, 12,344-52.

Przedborski, S., Ischiropoulos, H. (2005). Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 7,685–693.

Ramassamy, C., Girbe, F., Christen, Y., Costentin, J. (1993). Ginkgo biloba extract EGb 761 or trolox C prevent the ascorbic acid/Fe²⁺ induced decrease in synaptosomal membrane fluidity. *Free Radic Res Commun*, 19,341–50.

Rascol, O., Brooks, D.J., Melamed, E. (2003). A comparative randomized study of rasagiline versus placebo or entacapone as adjunct to levodopa in Parkinson's disease (PD) patients with motor fluctuations (the LARGO Study). On behalf of the LARGO Study Group. *Eur J Neurol*, 10,234-244.

Reed, J.C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, 157,1415-1430.

Richard, I. (2001). Parkinson's disease, How to interpret all of the new clinical research trial information. *Syllabus. Course 7FC-002. American Academy of Neurology Meeting*, 356,328-336.

Rimbach, G., Gohil, K., Matsugo, S., Moini, H., Saliou, C., Virgili, F. (2001). Induction of glutathione synthesis in human keratinocytes by Ginkgo biloba extract (EGb761). *Biofactors*, 15,39–52.

Rojas, P., Altagracia, M., Kravzov, J., Ríos, C. (1993). Amantidine increases striatal dopamine turnover in MPTP⁺ treated mic. *Drug Development Research*, 29(3),222-226.

Rojas, P., Garduño, B., Rojas, C., Viguera, R.M., Rojas-Castañeda, J., Ríos, C., Serrano-Garcia N. (2001). EGb 761 blocks MPP⁺ induced lipid peroxidation in mouse corpus striatum. *Neurochem Res*, 26,1245–51.

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

Rojas, P., Serrano-Garcia, N., Mares-Samano, J.J., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverri, J., Ogren, S.O. (2008). EGb 761 protects against nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice: role of oxidative stress. *Eur J Neurosci*, 28,41–50.

Rojas, P., Montes, P., Rojas, C., Serrano-García, N., Rojas-Castaneda, J.C. (2012). Effect of a phytopharmaceutical medicine, Ginko biloba extract 761, in an animal model of Parkinson's disease: Therapeutic perspectives. *Nutrition*, 28,1081–1088.

Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., Castelli, F. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med*, 19,481–6.

Sasaki, K., Hatta, S., Wada, K., Ueda, N., Yoshimura, T., Endo, T. (2001). Effects of extract of Ginkgo biloba leaves and its constituents on carcinogenmetabolizing enzyme activities and glutathione levels in mouse liver. *Life Sci*, 70,1657–67.

Sastre, J., Millan, A., Garcia, J., Pla, R., Juan, G., Pallardo, F.V. (1998). A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 24,298–304.

Schapira, A., Cooper, J., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J., Mars-den, C. (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson disease. *Lancet*, 8649,1269.

Schapira, A.H. (2005). Present and future drug treatment for Parkinson's disease. *J NeurolNeurosurg Psychiatry*, 76,1472-1478.

Schulz, J.B., Falkenburger, B.H. (2004). Neuronal pathology in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res*. 318,135-147.

Schüpbach, W.M., Malte^{tem} D., Houeto, J.L. (2007). Neurosurgery at an earlier stage of Parkinson disease: a randomized, controlled trial. *Neurology*, 68(4),267-271.

Shi, C., Zhao, L., Zhu, B., Li, Q., Yew, D.T., Yao, Z., Xu, J. (2009a). Dosage effects of EGb761 on hydrogen peroxide-induced cell death in SH-Sy5Y cells. *Chem Biol Interact*, 180,389–97.

Shi, C., Zhao, L., Zhu, B., Li, Q., Yew, D.T., Yao, Z. (2009b). Protective effects of Ginkg biloba extract (EGb761) and its constituents quercetin and ginkgolide B against beta-amyloid peptide-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Chem Biol Interact*, 181,115–23.

Spooren, W.P., Gentsch, C., Wiessner, C. (1998). Tunel-positive cells in the substantia nigra of C-57BL/6 mice after a single bolus of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neuroscience*, 85,649-651.

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

Suchowersky, O., Reich, S., Perlmutter, J., Zesiewicz, T., Gronseth, G., Weiner, W.J.(2006). diagnosis and prognosis of new onset Parkinson disease (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 11(7),968-75.

Sushruta, K., Hemant, K., Sandeep, V.M., Hyung-Woo, L., Soon, M.H., Dong-Kug, C. (2012). Recent Updates in Redox Regulation and Free Radical Scavenging Effects by Herbal Products in Experimental Models of Parkinson's Disease. *Molecules*, 17,11391-11420.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Constantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold. R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G. (1999). Molecular Characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718),441-446.

Tandberg, E., Larsen, J.P., Nessler, E.G., Riise, T., Aarli, J.A. (1995). The epidemiology of Parkinson's disease in the county of Rogaland, Norway. *Mov Disord*, 10,541-549.

Tatton, N.A., Kish, S.J. (1997). In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and Acridine Orange staining. *Neuroscience*, 77,1037-1048.

Tatton, N.A. (2000). Increased Caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Exp. Neurol*, 166,29-43.

Tansey, M.G., Goldberg, M.S. (2010). Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis*, 37,510–8.

Vila, M., Jacson-Lewis, L., Vukosavic, S., Djaldetti, R., Liberatore, G., Offen, D., Korsmeyer, S.J., Przedborski, S. (2001). Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl- 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci*, 98, 2837–2842.

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

- Wahba, M., Zesiewicz, T.A., Hauser, R.A. (2005). Catechol-O-methyltransferase inhibitor in the treatment of Parkinson's disease. In Ebadi M and Pfeiffer Rf, Parkinson's disease. CRC Press. New York, 705-712.
- Wang, J., Cheng, Y., Yin, J., Lu, Q., Xu, X., Yin, X. (2011). Protective effects of Ginkgo biloba extract on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Neural Regeneration Res*, 6,2565–72.
- Watts, R.L., Jankovic, J., Waters, C., Rajput, A., Boroojerdi, B., Rao, J. (2007). Randomized, blind, controlled trial of transdermal rotigotine in early Parkinson disease. *Neurology*, 23(4),272-6.
- Winter, J.C. (1998). The effects of an extract of Ginkgo biloba, 761, on cognitive behavior on longevity in the rat. *Physiol Behav*, 63,425–33.
- Wong, S.S., Li, R.H., Stadlin, A. (2001). Oxidative stress induced by MPTP and MPP⁺: selective vulnerability of cultured mouse astrocytes. *Brain Res*, 836,237–44.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., Wang, X. (1997a). Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129–1132.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, 80,285–291.
- Yang, L., Matthews, R.T., Schulz, J.B., Klockgether, T., Liao, A.W., Martinou, J.C., Penney, J.B., Hyman, B.T., Beal, M.F. (1998). 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. *J Neurosci*, 18,8145–8152.
- Yang, S.F., Wu, Q., Sun, A.S., Huang, X.N., Shi, J.S. (2001). Protective effect and mechanism of Ginkgo biloba leaf extracts for Parkinson disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Acta Pharmacol Sin.* 22,1089–93.
- Yeh, Y.C., Liu, T.J., Wang, L.C., Lee, H.W., Ting, C.T., Lee, W.L., (2009). A standardized extract of Ginkgo biloba suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and p53-mediated mitochondrial apoptosis in rat testes. *Br J Pharmacol*, 156,48–61.
- Yurek, D.M., Deutch, A.Y., Roth, R.H., Sladek, J.R. (1989). Morphological, neurochemical, and behavioral characterizations associated with the combined treatment of diethyldithiocarbamate and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Brain Res*, 497,250–9.
- Zamora, S., Otárola, A., Brenes, G. (2005). La apoptosis y su relación con diversos nutrientes. *Rev Chil Nutr*, 32(3),1-7.
- Zang, L.Y., Misra, H.P. (1993). Generation of reactive oxygen species during the monoamine oxidase-catalyzed oxidation of the neurotoxicant, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Biol Chem*, 268,16504–12.

Zappiaa, M., Nicoletti, A., Muñoz, S.D., Tapia-Núñez, J. (2009). Reconsideraciones en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson con levodopa: evidencias farmacodinámicas. *Rev Neurol*, 49(1),33-40.