



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*EFFECTO ANTIDEPRESIVO DEL EGb 761 EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE LA DEPRESIÓN*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

ALBERTO JULIO AMILPAS



MÉXICO D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Elia Brosla Naranjo Rodríguez

VOCAL: Profesora: Mabel Clara Frago Serrano

SECRETARIO: Profesora: Patricia Rojas Castañeda

1er. SUPLENTE: Profesor: José Fausto Rivero Cruz

2º SUPLENTE: Profesor: Mario Alberto Figueroa Saldivar

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio de Neurotoxicología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"

ASESOR DEL TEMA: Dra. Patricia Rojas Castañeda

SUSTENTANTE: Alberto Julio Amilpas

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a quien debo alma, corazón y vida.

Agradezco a mis colegas, compañeros y grandes maestros del Laboratorio de Neurotoxicología del INNN por hacer posible la realización de este trabajo, en especial, agradezco la infinita paciencia de Norma Serrano por enseñarme el principio del camino sin fin de la investigación.

Agradezco el apoyo brindado por el equipo de investigación encabezado por el Dr. José Pedraza y la colaboración de Omar Noel Medina, sin cuyo esfuerzo y asesoría este trabajo no estaría totalmente completo.

A mi amada familia: Mis padres Crescencio Julio y Lourdes Amilpas y a mis hermanos Ricardo y Lupita Julio por el apoyo que me brindaron en este largo viaje no solo de nueve semestres, sino de toda mi existencia.

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme enseñado el valor de formar parte de la gran comunidad Universitaria y por regalarme las herramientas para forjar una vida...

*Y si pudiera veros antes de que la oscuridad venga, me alegraría el corazón
Si nos sentáramos juntos por un breve tiempo;
Sólo hasta que todo lo que haya por decir quede dicho,
Hasta que el dolor y la felicidad sean uno con nosotros
Y las lágrimas no sean más que el vino de la ventura...
Hasta entonces, espero.*

Sea esta tesis un modesto homenaje a mi familia en memoria de los momentos que dejé de compartir con Ustedes, de las cosas que no hicimos, de lo que no hablamos y de lo que no fue.

Dedico este trabajo a la antigua hermandad que nos unió en aquel grupo 9 de la generación 2003: mi compadre Daniel León, Moisés Juárez, Daniel Hernández, Antonio León y a nuestro Capitán, Luis Gordo y a todos los que se unieron en el camino. A aquellos a quienes la vida les llevó tan lejos que no pudimos volver a vernos bajo el sol: Israel Benito, Gerardo Benítez y Leonel Palacios.

A esas personas especiales que en algún momento compartieron y aún comparten conmigo su amistad y que me enseñaron aquellas cosas tan importantes que no aprendí en las aulas: Claudia Julieta Solís, Carmen Brito, Pamela Porragas, Arcelia Álvarez, Claudia Nieto y a mi gran amiga en la distancia, el tiempo y el espacio, Fabiola Solar.

A ti, lector, esperando que aquí encuentres apoyo en la eterna búsqueda de respuestas.

Finalmente, dedico esta tesis a Gabriela Vera, que con su poderosa presencia dispuso las sombras al este de la Luna, al oeste del Sol, al norte del cielo y al sur de esta tierra, y cuya esencia inmortal se encuentra dispersada detrás de cada idea y de cada línea entre las páginas de este trabajo...

ÍNDICE

Índice.....	1
Abreviaturas.....	4
1. Introducción.....	6
1.1 Hipótesis.....	7
1.2 Objetivos.....	7
2. Marco teórico.....	8
2.1 Generalidades acerca de la depresión.....	8
2.2 Diagnóstico de la depresión y clasificación de acuerdo a su intensidad.....	8
3. Tratamientos disponibles para la depresión.....	11
3.1 Generalidades.....	11
3.2 Clasificación de los tratamientos disponibles.....	11
3.2.1 Antidepresivos tricíclicos (ATC).....	11
3.2.2 Antidepresivos heterocíclicos atípicos (AHA).....	12
3.2.3 Inhibidores selectivos de la recaptura de la serotonina (ISRS).....	12
3.2.4 Inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO).....	13
3.2.5 Terapia electroconvulsiva (TEC).....	13
3.3 Terapias potenciales.....	14
4. Aspectos de la neurotransmisión relacionados con depresión.....	15
4.1 Generalidades.....	15
4.2 Aspectos generales de la neurotransmisión monoaminérgica.....	15
4.3 Neurotransmisión noradrenérgica.....	16
4.4 Neurotransmisión serotoninérgica.....	18
4.5 Neurotransmisión dopaminérgica.....	18
5. Teorías sobre el origen de la depresión.....	20
5.1 Generalidades.....	20
5.2 La teoría monoaminérgica clásica.....	20
5.3 Enfoque moderno de la teoría monoaminérgica.....	20
5.4 Los glucocorticoides, el estrés y su relación con la depresión.....	21
5.5 El estrés oxidativo como origen de la depresión.....	22
5.6 La depresión y sus implicaciones en la neurogénesis.....	25

6. Modelos animales de la depresión.....	27
6.1 Generalidades.....	27
6.2 Modelos neuroquímicos.....	27
6.3 Modelos basados en estrés social.....	27
6.4 Modelos de depresión basados en estrés causado por el medio ambiente.....	28
6.5 Modelos genéticos.....	30
7. El árbol de <i>Ginkgo biloba</i> y el EGb 761.....	31
7.1 Generalidades.....	31
7.2 Usos medicinales del árbol <i>Ginkgo biloba</i>	31
7.3 Propiedades generales del extracto de <i>Ginkgo biloba</i> EGb 761.....	32
7.3.1 Composición química del EGb 761.....	32
7.3.2 Farmacocinética del EGb 761.....	33
7.3.3 Usos clínicos del EGb 761.....	34
8. Efectos benéficos del EGb 761.....	36
8.1 Aumento de la capacidad cognitiva.....	36
8.2 Beneficios observados en demencia.....	36
8.3 Efectos benéficos en los desórdenes vestibulares y tinnitus.....	37
8.4 Recuperación después de la isquemia cerebral e insuficiencia cerebrovascular...	37
8.5 Efectos sobre el factor activador de plaquetas (FAP).....	38
8.6 Restauración de la transmisión monoaminérgica del sistema nervioso central.....	38
8.7 Propiedades antioxidantes.....	40
9. Diseño experimental.....	41
9.1 Sujetos experimentales.....	41
9.2 Grupos experimentales.....	41
9.3 La prueba de nado forzado.....	41
9.4 Análisis de monoaminas y sus metabolitos.....	42
9.5 Actividad de enzimas antioxidantes.....	43
9.5.1 Actividad de la superóxido dismutasa total (SOD total).....	43
9.5.2 Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx).....	43
9.5.3 Actividad de la glutatión reductasa (GRed).....	44
9.6 Western-blot para CuZnSOD y MnSOD.....	44
9.7 Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.....	45

9.8 Cuantificación de proteínas.....	46
9.9 Análisis estadístico.....	46
10. Resultados.....	47
11. Discusión.....	57
12. Conclusiones.....	65
13. Referencias y bibliografía.....	66

ABREVIATURAS

5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético		Administración de alimentos y fármacos de los Estados Unidos
5-HT	5-hidroxitriptamina ó serotonina	FDA	
A	Adrenalina	GPx	Glutación peroxidasa
AC	Adenilato ciclase	GRed	Glutación reductasa
ACTH	Hormona adrenocorticotropa	GSH	Glutación reducido
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico	GSSG	Glutación oxidado
ATC	Antidepresivos tricíclicos	H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
AH	Antidepresivos heterocíclicos atípicos	[³ H] 5-HT	Serotonina tritiada
B _{max}	Cantidad máxima de ligando unido a su receptor	[³ H] DA	Dopamina tritiada
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro	[³ H] NA	Noradrenalina tritiada
CAT	Catalasa	HVA	Ácido homovalínico
COMT	Catecol- <i>o</i> -metiltransferasa	HPA	Eje hipotalámico-pituitario-adrenal
CRF	Factor de liberación de corticotropina	i.p.	Administración intraperitoneal
CuZnSOD	Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc	IP ₃	Trifosfato de inositol
DA	Dopamina	ISRS	Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina
DAG	Diacilglicerol	LC	<i>Locus coeruleus</i>
DEX	Dexametasona	LOO [•]	Radical peroxilo
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	IMAO	Inhibidores de la monoaminoxidasa
DST	Prueba de supresión con dexametasona	MAO	Monoaminoxidasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	MDA	Malondialdehído
EGb 761	Extracto de <i>Ginkgo biloba</i> 761	MnSOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
FAP	Factor activador de plaquetas	MPP ⁺	ión 1-metil-4-fenilpiridinio
		MPTP	<i>N</i> -metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
		NA	Noradrenalina
		NBT	Azul de nitrotetrazolio

NT	Neurotransmisor	PSC	Prueba de suspensión por la cola
$O_2\cdot$	Radical superóxido	SNC	Sistema nervioso central
$OH\cdot$	Radical hidroxilo	SOD	Superóxido dismutasa
OMS	Organización Mundial de la Salud	TBARS	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
PKA	Proteína quinasa A	TEC	Terapia electroconvulsiva
PLC	Fosfolipasa C		
PNF	Prueba de nado forzado		

1. INTRODUCCIÓN

La depresión es uno de los trastornos afectivos más frecuentemente reportados y se caracteriza por síntomas emocionales como apatía, pesimismo y una actitud general negativa. Actualmente es un problema de salud que afecta a entre el 10 y el 30% de las mujeres y del 7 al 15% de los hombres en alguna etapa de su vida y que además tiene un alto costo social y económico, pues esta enfermedad ocasiona una importante discapacidad laboral. Numerosos estudios indican que el estrés oxidativo tiene una importante participación en la depresión, debido a que se ha reportado una disminución en las defensas antioxidantes y elevados niveles de marcadores de peroxidación de lípidos en pacientes deprimidos. Por otro lado, el extracto estandarizado de las hojas de *Ginkgo biloba*, EGb 761, tiene conocidas propiedades antioxidantes y se ha utilizado con éxito en el tratamiento de enfermedades que se relacionan con el estrés oxidativo. Diversos grupos de investigación han demostrado que el EGb 761 tiene efectos benéficos sobre la memoria y el estado de ánimo de pacientes afectados por enfermedades del sistema nervioso central sin efectos adversos graves. Una alternativa que puede ser utilizada en el tratamiento de la depresión debido a su posible origen en el incremento del estrés oxidativo es el uso de antioxidantes. En este estudio se evaluó el efecto antidepresivo del EGb 761 en la prueba de nado forzado, un modelo de la depresión utilizado extensamente, y el efecto del extracto en la prueba se comparó con el efecto producido por el antidepresivo imipramina.

1.1 HIPÓTESIS

Si se presenta una disminución del tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado después del pretratamiento con EGb 761, entonces esta disminución se deberá a la prevención de la aparición de estrés oxidativo en diferentes regiones cerebrales debido a la capacidad antioxidante del extracto.

1.2 OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antidepresiva del EGb 761 mediante la prueba de nado forzado y comparar esta actividad con la del antidepresivo imipramina.

Objetivos específicos

Determinar el efecto del tratamiento con EGb 761 durante 17 días previos a la prueba de nado forzado en diferentes regiones cerebrales evaluando aspectos como:

- La concentración de neurotransmisores monoaminérgicos y su metabolismo.
- La actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa total, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.
- La cantidad regional relativa de la enzima superóxido dismutasa citosólica (CuZnSOD) y mitocondrial (MnSOD).
- La cantidad de malondialdehído, como un indicador de la peroxidación de lípidos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades acerca de la depresión

La depresión es uno de los trastornos afectivos más frecuentes y se caracteriza por síntomas emocionales como apatía, pesimismo, desinterés por actividades placenteras y una actitud negativa que puede oscilar desde la sensación de tristeza que se considera normal hasta el cuadro que se acompaña de sensaciones intensas de culpa y pensamientos suicidas (Nestler, 2002; Akiskal, 2000). La depresión presenta componentes clínicos y biológicos muy heterogéneos y es una de las enfermedades con mayor prevalencia y costo a nivel mundial; se estima que del 10-30% de las mujeres y del 7-15% de los hombres padece depresión en alguna de sus formas durante el transcurso de su vida (Malberg y Blendy, 2005). La gravedad de la depresión radica en que esta enfermedad es una causa importante de discapacidad laboral y de muerte prematura en todo el mundo (Rang et al., 2004). En particular la depresión mayor se ha asociado con una alta mortalidad, ya que alrededor del 15% de los individuos que presentan este padecimiento, mueren por suicidio (DSMIV-TR, 2000). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la depresión mayor es actualmente la cuarta causa más importante de incapacidad diaria y será la segunda causa más importante para el 2020 (Elhwuegi, 2004).

2.2 Diagnóstico de la depresión y clasificación de acuerdo a su intensidad

A mediados del siglo XIX el cerebro se volvió el centro de los esfuerzos para entender la patofisiología de este padecimiento (Nestler, 2002). Desde entonces el diagnóstico de la depresión se ha abordado desde el punto de vista bioquímico y desde el punto de vista psicológico.

Una herramienta bioquímica que se ha utilizado en el diagnóstico de la depresión consiste en evaluar la función del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (eje HPA) mediante la prueba de supresión con dexametasona (DEX) (dexamethasone suppression test, DST) que es el ensayo que se utiliza con mayor frecuencia en la evaluación de la función de este eje. La prueba consiste en administrar DEX al paciente con la finalidad de bloquear la liberación de cortisol, una de las especies que es secretada de manera normal como resultado de la estimulación del eje HPA. Si el cortisol no disminuye, entonces se dice que el paciente es "DST no suprimido", un hallazgo común en personas que padecen depresión (Varghese y Brown, 2001).

Desde la década de los 60's, el diagnóstico psicológico de la depresión se ha hecho de acuerdo con los criterios sintomáticos publicados en el manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (Nestler, 2002; DSMIV-TR, 2000). Como herramienta auxiliar en el diagnóstico se ha utilizado la escala de Hamilton para la evaluación de la intensidad de los síntomas depresivos (Hamilton depresión rating scale) (Hamilton, 1960; Hamilton, 1967), diseñada para evaluar cuantitativamente la gravedad de los síntomas y valorar los cambios en el paciente después de recibir algún tratamiento.

Clasificación de la depresión. La clasificación más utilizada es la que aparece en el DMSIV-TR (2000), que incluye a la depresión mayor, la distimia y otras formas de depresión como el trastorno disfórico premenstrual y el síndrome afectivo estacional.

Depresión mayor. Esta es la forma más grave de depresión ya que se asocia con una mayor incapacidad para realizar tareas y con el mayor índice de suicidios. En el diagnóstico de esta forma de depresión deben presentarse al menos cinco de los síntomas que aparecen a continuación durante un periodo mínimo de dos semanas, y deben representar un cambio en la conducta o en el estado de ánimo respecto a un estado previo (DMSIV-TR, 2000); estos cambios son:

- Ánimo deprimido la mayoría de los días y en la mayor parte de cada día (por lo menos durante dos semanas).
- Total o muy importante pérdida de interés por las experiencias placenteras durante la mayor parte del tiempo.
- Aumento o disminución importante del peso (cambio de más del 5% del peso corporal en un mes), cambios en el apetito o ambos.
- Trastornos del sueño en forma de insomnio o de excesiva somnolencia diariamente.
- Sensación de agitación o sentido de intensa lentitud, así como de pérdida de energía y cansancio, acompañado de sensaciones de inutilidad o culpabilidad excesiva durante la mayor parte del día.
- Incapacidad o habilidad disminuida de concentración y dificultad para tomar decisiones.
- Pensamientos recurrentes de muerte y suicidio.

Además, en el diagnóstico deben tomarse en cuenta las siguientes consideraciones:

- Los síntomas no deben seguir o acompañarse de episodios maníacos (para evitar la confusión con el trastorno bipolar)
- Funciones normales importantes, como el desempeño laboral o las relaciones interpersonales se deben ver afectadas en alguna medida.
- Los episodios depresivos no deben ser causados por fármacos, alcohol u otras sustancias de abuso ni deben ser causados por la reacción de duelo normal; si son causados por un evento de esta índole, esta sensación no debe tener una duración mayor a dos meses.

En la depresión mayor la recuperación es frecuente aunque el riesgo de recaída también constituye una amenaza constante. Aproximadamente dos tercios de los pacientes con depresión mayor experimentan una recaída y cada recaída aumenta el riesgo de episodios depresivos posteriores (DMSIV-TR, 2000).

Distimia. La distimia afecta del 3-6% de la población y el DMSIV-TR (2000) indica que distimia y depresión mayor se distinguen por la severidad, duración y persistencia de los síntomas. En la distimia la disminución en el estado de ánimo es menos intensa, pero tiene una duración mayor a dos años. En estos pacientes no aparecen trastornos en la conducta alimentaria o del apetito sexual posiblemente a causa de la duración de los síntomas y a la baja intensidad de éstos. Frecuentemente los pacientes diagnosticados con distimia suelen presentar una condición conocida como “depresión doble”, ya que durante el periodo de depresión crónica suelen presentarse episodios de depresión mayor. Se estima que el 10% de los pacientes que presentan distimia pueden llegar a presentar depresión mayor.

Trastorno afectivo estacional. Se caracteriza por episodios anuales de disminución en el estado de ánimo de intensidad variable que se presentan en el otoño o en el invierno y que remiten espontáneamente en la primavera y en el verano. Adicionalmente a los síntomas característicos de la depresión también se presenta una tendencia a comer carbohidratos en exceso y una excesiva somnolencia (DMSIV-TR 2000).

Trastorno disfórico premenstrual. El síndrome de depresión severa, irritabilidad y tensión que precede a la menstruación se conoce con este nombre y afecta a entre un 3-8% de las mujeres en edad reproductiva. El diagnóstico depende de la presencia de cinco de los síntomas de depresión mayor que aparecen antes del periodo menstrual y desaparecen después de este periodo (DMSIV-TR 2000).

3. Tratamientos disponibles para la depresión

3.1 Generalidades

Los antidepresivos que actualmente se utilizan en el tratamiento clínico de la depresión incrementan de manera rápida la disponibilidad de monoaminas como noradrenalina (NA) y serotonina (5-HT) en el espacio sináptico (Elhwuegi, 2004). Los primeros tratamientos antidepresivos se descubrieron por entera casualidad al observar que algunos fármacos que se empleaban para indicaciones diferentes a la depresión mejoraban el estado de ánimo de los pacientes (Rang et al., 2004). Un fenómeno común en la mayoría de los antidepresivos es que éstos manifiestan su efecto terapéutico después de un tiempo de administración variable que va de 2 a 6 semanas; en general, la duración del tratamiento puede llegar hasta los 6 meses (Blendy, 2006).

3.2 Clasificación de los tratamientos disponibles

Los antidepresivos de los que actualmente se dispone pueden dividirse de acuerdo a su mecanismo de acción en: inhibidores de la recaptura de monoaminas (antidepresivos tricíclicos (ATC), inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) y antidepresivos heterocíclicos atípicos (AH)); inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO), terapia electroconvulsiva (TEC), y otros tratamientos entre los que se encuentran los fitofármacos, como los que incluyen a la hierba de San Juan en su elaboración.

3.2.1 Antidepresivos tricíclicos (ATC)

Los ATC se emplean fundamentalmente en el tratamiento de depresiones de origen diverso y en la fase depresiva del trastorno bipolar (Sarko, 2000; Velasco et al., 2004). Ejemplos de estos fármacos son imipramina, amitriptilina y nortriptilina entre otros. Los ATC reciben este nombre por el número de tres anillos característico de estas moléculas. El efecto principal de los ATC consiste en el bloqueo de la recaptura de monoaminas por las terminales nerviosas. Casi todos los ATC inhiben por igual la recaptura de NA y 5-HT (Rang et al., 2004).

Muchos de los efectos adversos de los ATC se relacionan con su capacidad de estabilización del potencial de membrana (que no permite la despolarización) y con sus efectos anticolinérgicos, antihistamínicos y alfa adrenolíticos. Entre los efectos no deseados

de estos fármacos destacan las reacciones de confusión y desorientación, taquicardia, sequedad de la boca y alteraciones de la libido (Velasco et al., 2004; Sarko, 2000).

Los ATC se unen con fuerza a las proteínas plasmáticas, de manera que los compuestos que compiten con esa unión (como el ácido acetilsalicílico) tienden a potenciar sus efectos. El uso de ATC está contraindicado en pacientes con epilepsia, esquizofrenia, trastornos prostáticos y glaucoma; no deben combinarse con IMAO, etanol y otros depresores del sistema nervioso central (SNC) (Rang et al., 2004; Velasco et al., 2004; Sarko, 2000).

3.2.2 Antidepresivos heterocíclicos atípicos (AH)

Los AH se utilizan en el tratamiento de la depresión en sus diferentes formas y en la fase depresiva del trastorno bipolar. Estos compuestos cuentan con mecanismos de acción novedosos (por ejemplo, la inhibición selectiva de la recaptura de NA); todos ellos son moléculas sintéticas que presentan estructuras químicas muy diversas y algunos pueden disminuir el retraso en el comienzo de la acción antidepresiva. Son útiles en pacientes que no responden a otros tratamientos (Rang et al., 2004; Velasco et al., 2004; Sarko, 2000). Ejemplos de estos fármacos son mianserina, reboxetina y venlafaxina.

3.2.3 Inhibidores selectivos de la recaptura de la serotonina (ISRS)

Los ISRS se emplean en el tratamiento de la depresión mayor, distimia y otros trastornos que son consecuencia de la deficiencia de 5-HT. Su eficacia como antidepresivos es comparable a la de los ATC. Ejemplos de estos fármacos son fluoxetina, paroxetina y citalopram entre otros. Estos fármacos inhiben de manera selectiva la recaptura de 5-HT, de manera que en el espacio sináptico hay una mayor cantidad de este neurotransmisor en relación con la NA (Rang et al., 2004; Velasco et al., 2004; Sarko, 2000).

En la mayoría de los casos los efectos no deseados de estos fármacos son una consecuencia de la acción farmacológica y se presentan principalmente en el SNC, causando que aproximadamente 15% de los pacientes abandone el tratamiento; estos efectos incluyen cefalea y náuseas, mareos, sudoración excesiva, disminución de la libido, impotencia sexual y migraña. Se han reportado muy pocos casos de muerte después de sobredosis con ISRS considerando que estos son los fármacos más recetados para el tratamiento de la depresión. Presentan peligrosas interacciones con los IMAO ocasionando lo que se conoce como “síndrome serotoninérgico”, que puede causar la muerte. Otras

interacciones peligrosas se presentan con los neurolépticos, las sales de litio y los ATC (Rang et al., 2004; Velasco et al., 2004; Sarko, 2000).

3.2.4 Inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO)

Los IMAO se utilizan en el tratamiento de la depresión en todas sus formas y además son útiles en el tratamiento de crisis de angustia, trastornos obsesivo-compulsivos y agorafobia. Algunos IMAO son fenelzina, tranilcipromina e iproniazida (Velasco et al., 2004). La enzima monoamino oxidasa (MAO) ejerce dos funciones principales en el organismo: regular la concentración intraneuronal de monoaminas e inactivar aminoras endógenas y exógenas. Esta enzima tiene dos isoformas, MAO-A y MAO-B. La MAO-A preferentemente metaboliza 5-HT y NA, mientras que las dos formas de la enzima actúan sobre dopamina (DA) (Brunton et al., 2006). El principal efecto de los IMAO consiste en bloquear la actividad de la enzima MAO, generando un aumento en la concentración intraneuronal de monoaminas en las terminales nerviosas (Rang et al., 2004).

Muchos de los efectos adversos de los IMAO son consecuencia de la inhibición de la MAO. Algunos pacientes experimentan un aumento de peso por un incremento del apetito con frecuencia tan intenso que obliga a la suspensión del tratamiento; también pueden ocasionar excitación, temblores, sequedad de la boca, trastornos del tránsito intestinal y ocasionalmente impotencia sexual. La interacción con otros fármacos y con alimentos es el factor principal que llevó a la disminución de su uso clínico. Por ejemplo, la combinación accidental de IMAO con la tiramina presente en algunos quesos provoca una hipertensión arterial aguda que se caracteriza por una intensa cefalea palpitante que puede causar una hemorragia intracraneal (Rang et al., 2004; Velasco et al., 2004; Sarko, 2000).

3.2.5 Terapia electroconvulsiva (TEC)

A principios del siglo XX se consideraba a la esquizofrenia y a la epilepsia como enfermedades mutuamente excluyentes. Esta hipótesis llevó a provocar convulsiones mediante el uso de choques eléctricos como tratamiento de la esquizofrenia en la década de los 30's. Aunque esta terapia resultó ineficaz en la esquizofrenia, demostró ser efectiva en la disminución de los síntomas depresivos de esta enfermedad. En el ser humano la TEC consiste en la estimulación mediante electrodos colocados en ambos lados de la cabeza; el paciente debe estar ligeramente anestesiado y paralizado con un bloqueante neuromuscular para evitar lesiones físicas y debe estar sujeto a ventilación artificial. Estudios controlados

demonstraron que la TEC tiene una eficacia similar a la de los antidepresivos convencionales, con porcentajes de respuesta que oscilan entre 60 y 80%; su principal inconveniente es que a menudo provoca confusión y una pérdida de memoria que persiste por varios días o incluso algunas semanas (Valenti et al., 2007; Rang et al., 2004).

3.3 Terapias potenciales

Un área bajo extensa investigación incluye el desarrollo de fármacos que actúan a nivel del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) para el tratamiento de enfermedades que involucran el estado de ánimo y el comportamiento. Diversos grupos de investigación han utilizado medicamentos ya autorizados por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA) para otras indicaciones en el tratamiento de la depresión que inhiben a las enzimas relacionadas con la síntesis de cortisol (por ejemplo, ketoconazol) con resultados contradictorios (Angelucci, 2000). Los receptores para el factor de liberación de corticotropina (CRF), que forman parte del eje HPA, y que aparentemente se encuentran involucrados en la aparición de depresión y otras enfermedades, han sido objeto de estudio en el desarrollo moléculas antagonistas de su actividad; éstas permanecen en etapa de desarrollo, por lo que su uso en la clínica es aún lejano. Se cree que los antidepresivos que se utilicen en el futuro actuarán sobre el eje HPA y serán utilizados en mayor medida que las terapias que involucran al los sistemas monoaminérgicos en el tratamiento de la depresión (Varghese y Brown, 2001).

Un área que ha cobrado auge en los últimos años es el uso de plantas y de fitofármacos que derivan de ellas en el tratamiento de la depresión. La hierba de San Juan es el ejemplo más representativo de estas nuevas alternativas debido a que ha demostrado tener una eficacia semejante a la de los antidepresivos convencionales. Sin embargo, se ha reportado que el uso de esta planta y de sus derivados puede implicar graves riesgos de interacción con otros fármacos potenciando su toxicidad (Rang et al., 2005).

4. Aspectos de la neurotransmisión relacionados con depresión

4.1 Generalidades

Las monoaminas son neurotransmisores que se cree están involucrados en la patogénesis de varias enfermedades, entre ellas la depresión, en donde la disminución de su concentración en el espacio sináptico fue el primer hallazgo que relacionó a esta enfermedad con un posible origen bioquímico; las monoaminas comparten entre sí algunas propiedades fundamentales, pero difieren de manera importante en cuanto a su distribución en el cerebro, el tipo de receptores sobre los que actúan y su mecanismo de acción (Elhwuegi, 2004).

4.2 Aspectos generales de la neurotransmisión monoaminérgica

Noradrenalina, adrenalina (A) y dopamina, también conocidas como catecolaminas, son biosintetizadas a partir del mismo precursor, que es la L-tirosina; la transformación de este aminoácido se hace de acuerdo con el tipo de neurona a donde ingrese el aminoácido, y ésta puede ser dopaminérgica, noradrenérgica o adrenérgica. La figura 1 presenta las transformaciones intraneuronales que sufre la L-tirosina y las enzimas involucradas en la biosíntesis de catecolaminas (Rang et al., 2004; Iverson, 1991). La serotonina es otra monoamina que se biosintetiza a partir de un aminoácido que es el L-triptófano. Las transformaciones de este aminoácido dentro de la neurona serotoninérgica y las enzimas involucradas en la biosíntesis de 5-HT se presentan en la figura 1 (Rang et al., 2004; Fuller, 1980).

Todas las monoaminas después de su biosíntesis se concentran en vesículas que se encuentran en el interior de las terminales nerviosas de la neurona para formar parte de un transporte vesicular. El almacenamiento de las monoaminas en vesículas protege a estas moléculas del metabolismo intraneuronal (Masson et al., 1999). Un complejo mecanismo dependiente de Ca^{2+} es el responsable de liberar a las monoaminas almacenadas hacia el espacio sináptico, en donde activan receptores específicos localizados en las membranas presinápticas o postsinápticas. Los receptores postsinápticos pueden ser de dos tipos: ionotrópicos o metabotrópicos. La estimulación de un receptor ionotrópico favorece la generación de un potencial de membrana en la neurona postsináptica debido a la acción de canales iónicos. La estimulación de un receptor metabotrópico en la neurona postsináptica ocasiona cambios bioquímicos en nucleótidos cíclicos que pueden activar diversos tipos de proteínas quinasas; estos receptores se encuentran acoplados a proteínas G (Elhwuegi,

2004). Por otro lado, la estimulación de los receptores presinápticos localizados en la terminal nerviosa puede regular la liberación de monoaminas a través de potenciales de acción. Este hecho constituye un mecanismo de autorregulación que controla la cantidad de monoamina presente en el espacio sináptico (Boehm y Kubista, 2002).

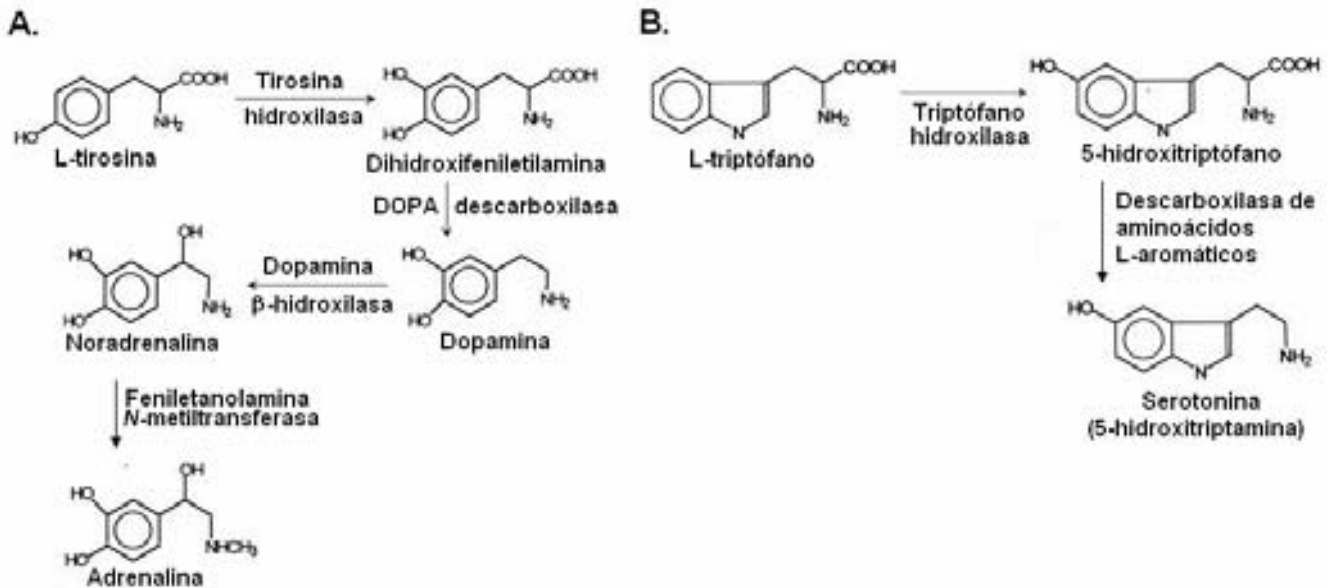


Figura 1. (A) Biosíntesis de dopamina, noradrenalina y adrenalina. (B) Biosíntesis de serotonina (jnm.snmjournals.org)

La terminación de la acción de todas las monoaminas inicia con la recaptura de éstas hacia la terminal presináptica para ser almacenadas nuevamente en vesículas o ser metabolizadas por la enzima MAO. El mecanismo de recaptura utiliza transportadores dependientes de Na^+/Cl^- (Lester et al., 1996). Las dos enzimas que son importantes en el metabolismo de las monoaminas son la MAO y la catecol-*o*-metil transferasa (COMT). Ambas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo; sin embargo, en las neuronas el metabolismo de las monoaminas depende principalmente de la MAO (Elhwuegi, 2004). En la figura 2 se muestran los compuestos que resultan de la degradación de NA, DA y 5-HT.

4.3 Neurotransmisión noradrenérgica

La NA se encuentra en mayor medida en el *locus coeruleus* (LC) (Mongeau et al., 1997) y en otras regiones cerebrales. A partir del LC los axones de las neuronas noradrenérgicas descienden hacia la médula espinal, entran al cerebelo y ascienden para inervar los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, el tálamo, la amígdala, el

telencéfalo basal y la neocorteza. Las proyecciones noradrenérgicas más importantes que se relacionan con las funciones psicológicas surgen del LC y ascienden por el tallo cerebral para inervar el tálamo, el hipotálamo dorsal y la corteza frontal (Ganong, 2001; Foote et al., 1983).

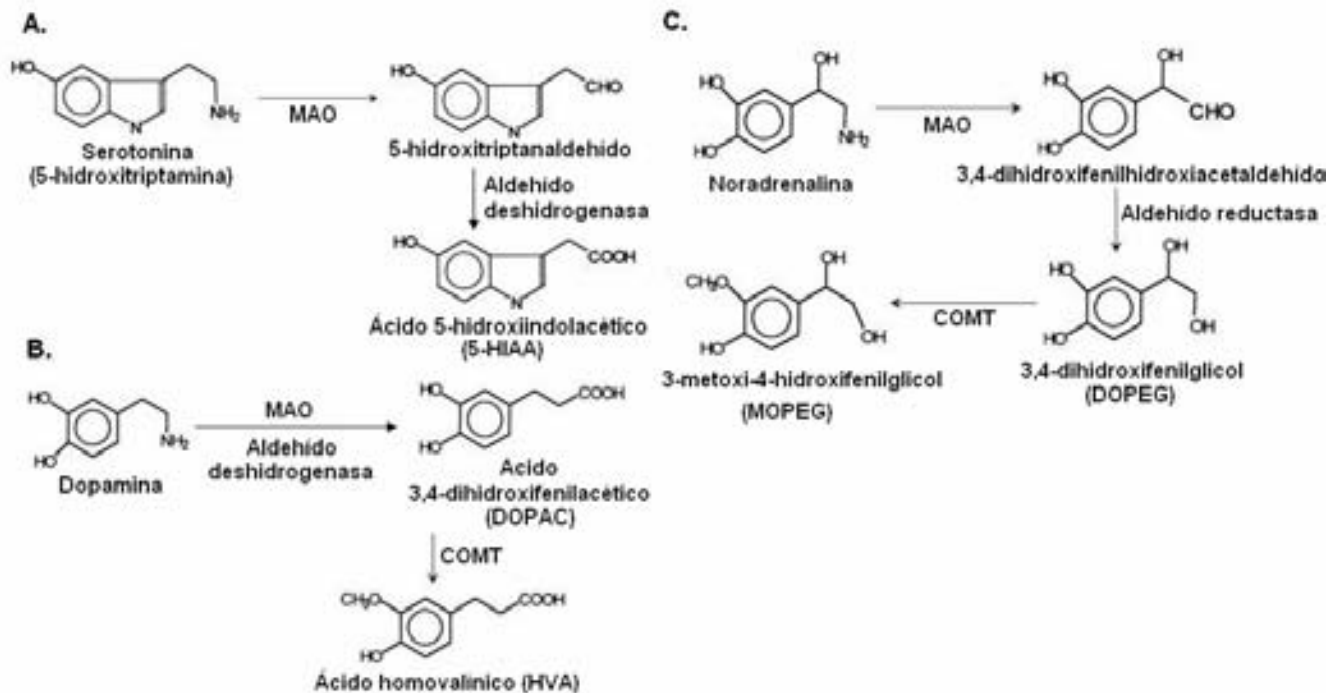


Figura 2. Degradación de 5-HT (A), de DA (B) y de NA (C) y sus principales metabolitos (jnm.snmjournals.org)

La respuesta adrenérgica se debe a dos tipos de receptores, α y β (Bylund et al., 1994). Todos los receptores adrenérgicos se encuentran acoplados a algún tipo de proteína G, ya sea G_s , G_i o G_q (Nerr, 1995). Los tres subtipos de receptores β (β_1 , β_2 y β_3) se encuentran acoplados a la estimulación de la enzima adenilato ciclasa (AC) a través de una proteína G_s que produce un aumento de la actividad de esta enzima y consecuentemente un incremento en la acumulación del segundo mensajero monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (Taussig y Gilman, 1995). El AMPc activa a la proteína quinasa A (PKA) que causa la fosforilación de varias proteínas celulares que producen la respuesta específica típica de la estimulación de receptores β (Elhwuegi, 2004).

Los receptores α_1 son de naturaleza excitatoria, y usualmente se asocian con una proteína G_q . Su activación se encuentra relacionada con diferentes cascadas de señalización, las cuales incluyen la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la generación de los segundos mensajeros trifosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DAG) (Fields y Casey, 1997). La activación de estos receptores produce una despolarización en la neurona debida al incremento en la conductancia de K^+ , que hace a la neurona más excitable (Elhwuegi,

2004). Por otro lado, los receptores α_2 se relacionan con la inhibición de la enzima AC, pues se encuentran acoplados a una proteína del tipo G_i (Liggett, 1996). La activación de los receptores presinápticos α_2 adrenérgicos disminuye la liberación de NA y suprime la descarga de las neuronas serotoninérgicas (Clement et al., 1992).

4.4 Neurotransmisión serotoninérgica

En el sistema nervioso central (SNC) las neuronas serotoninérgicas se encuentran en abundancia en regiones localizadas del mesencéfalo y en el núcleo dorsal de rafé (Rang et al., 2004). Las neuronas serotoninérgicas se proyectan hacia porciones del hipotálamo, del sistema límbico, la neocorteza, el cerebelo y la médula espinal (Ganong, 2001).

Una gran variedad de receptores para 5-HT se han identificado utilizando técnicas moleculares. Los receptores 5-HT₁ y 5-HT₂ se encuentran acoplados a proteínas G. El receptor 5-HT₁ se subdivide en al menos cinco subtipos de receptores: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}. Estos receptores se encuentran acoplados a una proteína G_i que evita la formación del segundo mensajero AMPc. La activación del receptor 5-HT_{1A} lleva a la hiperpolarización de la neurona y a la inhibición de la liberación de 5-HT (Mongeau et al., 1997). La liberación de 5-HT de las neuronas serotoninérgicas también se encuentra regulada por los receptores presinápticos 5-HT_{1B/1D} (Starkey y Skingle, 1994). Hay tres tipos de receptores 5-HT₂, de los cuales el más importante es el 5-HT_{2A} que muestra altas densidades en la corteza prefrontal. Este receptor se relaciona con la regulación de la recaptura de 5-HT (Elhwuegi, 2004).

4.5 Neurotransmisión dopaminérgica

La dopamina es un neurotransmisor que se relaciona con el control de los movimientos corporales y algunas funciones endócrinas. Una gran cantidad de neuronas dopaminérgicas se encuentran presentes en el núcleo caudado, el núcleo acumbens, el núcleo central de la amígdala y algunas áreas de la corteza frontal (Elhwuegi, 2004). Una región con una gran cantidad de neuronas dopaminérgicas es el cuerpo estriado. En el cerebro se ubican muchos sistemas dopaminérgicos que para su estudio se dividen en sistemas ultracorto, intermedio y largo de acuerdo con la longitud de sus axones (Ganong, 2001). Los sistemas de axones de longitud ultracorta incluyen a las células entre las capas nuclear interna y la plexiforme interna de la retina y las células periglomerulares del bulbo

olfatorio. Los sistemas de axones de longitud intermedia incluyen el sistema tuberoinfundibular que secreta dopamina hacia los vasos hipofisarios portales en donde esta monoamina inhibe la secreción de prolactina, el sistema incertohipotalámico, que liga al hipotálamo con los núcleos septales laterales y el sistema periventricular, con origen en la sustancia gris periacueductal y proyecciones al hipotálamo y tálamo. Los sistemas de axones largos incluyen al sistema nigroestriatal, con origen en la sustancia *nigra* y terminales en el cuerpo estriado que se encargan del control motor; el sistema mesolímbico, con origen en el tegmento ventral y proyecciones al septo, bulbo olfatorio, núcleo acumbens, amígdala y corteza piriforme y el sistema mesocortical, que se proyecta del tegmento del cerebro medio a las cortezas límbica y frontal, al bulbo olfatorio, núcleo acumbens y áreas subcorticales relacionadas (Ganong, 2001; Tresguerres, 1992)

A nivel celular, las acciones de la dopamina se relacionan directamente con el tipo de receptor con el que interactúan. Mediante técnicas farmacológicas y bioquímicas se encontraron dos tipos de familias de receptores para dopamina: la familia D₁ (que comprende a los receptores D₁ y D₅) y la familia D₂ (que comprende a los receptores D₂, D₃ y D₄). Los receptores tipo D₁ activan a la enzima AC incrementando la concentración intracelular de AMPc. Los receptores tipo D₂ se acoplan a múltiples sistemas como son la inhibición de la enzima AC, la supresión de las corrientes de Ca²⁺ y la activación de corrientes de K⁺ (Palermo-Neto, 1997).

5. Teorías sobre el origen de la depresión

5.1 Generalidades

Con base en observaciones clínicas varios grupos de investigación han propuesto múltiples mecanismos para establecer el origen de la depresión. La diversidad de las propuestas sugiere que la depresión no es consecuencia de una causa única, sino que es resultado de la interacción de factores que en conjunto originan esta enfermedad. Las principales propuestas que se han hecho para establecer el origen de la depresión son las siguientes:

5.2 La teoría monoaminérgica clásica

La primera teoría bioquímica acerca del origen de la depresión es la hipótesis monoaminérgica propuesta por Schildkraut en 1965. Esta teoría propone que la depresión es resultado de una deficiencia funcional de los neurotransmisores monoaminérgicos en determinadas regiones del cerebro y surgió de la observación de los efectos de la reserpina cuando se utilizaba en pacientes hipertensos. Estos pacientes manifestaban síntomas depresivos, encontrándose posteriormente que estos síntomas se debían a que la reserpina bloquea el almacenamiento de aminas neurotransmisoras como 5-HT y NA en las vesículas de las terminales nerviosas presinápticas y consecuentemente la cantidad de estas especies en el espacio sináptico era limitada. Con base en estas observaciones se dedujo que la depresión es causada por la disminución de la transmisión sináptica funcional dependiente de estas monoaminas (Rang et al., 2004; Katzung, 2002). Un enigma importante en la aplicación práctica de esta teoría consiste en que los efectos farmacológicos de los antidepresivos son relativamente rápidos (aproximadamente 3 horas), mientras que los efectos clínicos tardan como mínimo dos semanas en manifestarse (Katzung, 2002).

5.3 Enfoque moderno de la teoría monoaminérgica

Se ha sugerido que el incremento agudo de los niveles de monoaminas en el espacio sináptico como resultado de la acción de un antidepresivo puede ser solo el paso más temprano de una compleja cascada de eventos que finalmente lleva a una actividad antidepresiva (Piñeyro y Blier, 1999). El incremento en la cantidad de monoaminas en el espacio sináptico induce cambios de subsensibilización de los receptores (disminución en la respuesta o número de receptores como resultado de ser constantemente estimulados por

un ligando) que regulan la recaptura y la liberación de monoaminas en el espacio sináptico. La disminución de la sensibilidad de estos receptores ocasiona una disminución de la recaptura de monoaminas y consecuentemente se presenta una actividad monoaminérgica central más elevada que coincide con la aparición de una respuesta terapéutica al tratamiento antidepresivo. De acuerdo con esta teoría los cambios adaptativos en los receptores son los responsables del efecto antidepresivo y estos cambios dependen de la disponibilidad de la monoaminas en la sinapsis en cantidad elevada y de manera constante.

Sin embargo, el efecto sobre la subsensibilidad de los receptores es reversible y se atribuye a esta reversión la pérdida de la actividad antidepresiva, un fenómeno que podría explicar parcialmente las recaídas observadas en algunos pacientes después de un tratamiento con antidepresivos (Elhwuegi, 2004).

5.4 Los glucocorticoides, el estrés y su relación con la depresión

Bajo condiciones de estrés psicológico o ambiental las neuronas en el núcleo paraventricular del hipotálamo secretan un péptido llamado factor de liberación de corticotropina (CRF). El CRF actúa en la glándula hipófisis estimulando la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), que a su vez promueve la síntesis y liberación de glucocorticoides en la corteza adrenal (corticosterona en roedores, cortisol en humanos); los glucocorticoides provocan una respuesta de adaptación para afrontar una condición de estrés principalmente gracias a los efectos que tienen sobre el sistema vascular y el metabolismo. El ciclo de autorregulación se completa con la acción inhibitoria de los glucocorticoides secretados por la corteza adrenal sobre la liberación de CRF en el hipotálamo y la liberación de ACTH en la glándula pituitaria; también interactúan con las neuronas presentes en el hipocampo, que detienen la liberación de CRF en las neuronas del núcleo paraventricular (Nestler et al., 2002).

La sobreactivación del eje HPA es un hallazgo común en pacientes deprimidos, y esta actividad excesiva se evidencia con el exceso de cortisol que se detecta en el plasma de estos pacientes; el exceso de glucocorticoides puede dañar el mecanismo que detiene la liberación de las especies involucradas en el eje HPA mediante mecanismos que aún no son del todo conocidos.

El papel del CRF en la depresión. La hiperactividad en el eje HPA y concentraciones elevadas de CRF son observadas en animales adultos sometidos al estrés en una etapa temprana de sus vidas (Gutman y Nemeroff, 2003). Estos cambios se normalizan después de

un tratamiento antidepresivo (Holsboer, 2000), por lo que se sospecha que el primer paso para que se presente un episodio depresivo es la aparición de algún evento estresante que lleve a la hipersecreción de glucocorticoides, del CRF y del resto de las especies involucradas en esta vía. En varios estudios se ha demostrado que muchos de los cambios que son inducidos por estrés están mediados por CRF (Todorovic et al., 2005), que es un neuropéptido de 41 aminoácidos (Spiess et al., 1981) que ejerce sus acciones a través de dos subtipos de receptor: CRF₁ y CRF₂ (Eckart et al., 2002).

La activación del receptor CRF₁ genera un comportamiento ansioso en roedores (Eckart et al., 2002) y el mismo efecto se observa después del bloqueo de la actividad del receptor CRF₂ (Kishimoto et al., 2000; Bale et al., 2000). Aparentemente, el balance entre la activación de los receptores CRF₁ y CRF₂ es crucial en el mantenimiento de un nivel basal de ansiedad, y un desbalance en este equilibrio posiblemente genera un comportamiento depresivo. Nuevas alternativas en el tratamiento de la depresión que tienen como blancos moleculares a los receptores para el CRF permanecen aún en etapas de desarrollo.

5.5 El estrés oxidativo como origen de la depresión

Bajo condiciones normales en el organismo existe un equilibrio entre la generación de especies oxidantes y los mecanismos que se encargan de que estas especies sean eliminadas. Un desequilibrio hacia la producción de especies oxidantes genera lo que se conoce como estrés oxidativo, un fenómeno implicado en la aparición de varias enfermedades. Existen tres principales mecanismos implicados en la generación del estrés oxidativo: la sobreproducción de especies oxidantes, la liberación de complejos con iones metálicos presentes en algunas macromoléculas como el grupo hemo de la hemoglobina y la disminución de las defensas antioxidantes (Rice-Evans y Burdon, 1993).

Mecanismos celulares antioxidantes. Las células generan energía utilizando el oxígeno molecular del ambiente; durante este proceso se producen pequeñas cantidades de formas reactivas de oxígeno parcialmente reducidas como un subproducto inevitable de la respiración mitocondrial. Algunas de estas formas son radicales libres que pueden alterar la estructura química de los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos (Kumar et al., 2005). Los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón sin aparear en su orbital más externo, una condición que los hace termodinámicamente inestables y sumamente reactivos. Estas especies tienen la capacidad de producir reacciones autocatalíticas, en las cuales las moléculas con las que reaccionan se convierten a su vez en radicales libres

produciendo un daño en cadena como ocurre en la peroxidación de lípidos (figura 3) (Kumar et al., 2005).

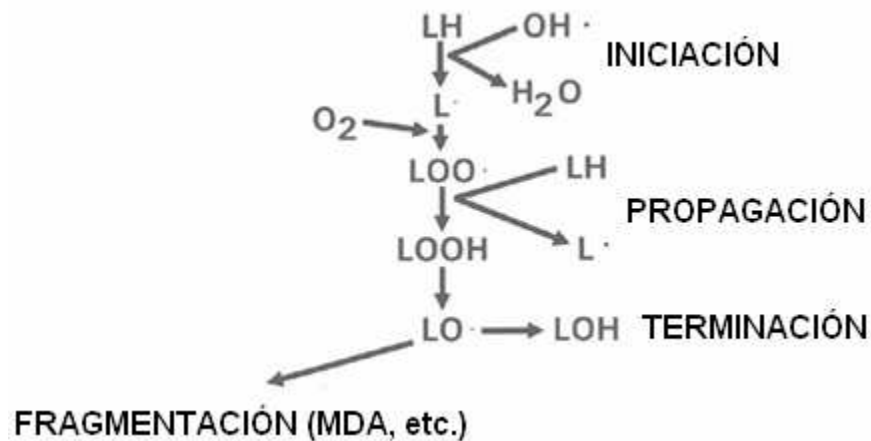


Figura 3. La peroxidación de lípidos inicia con la interacción de un ácido graso poliinsaturado (LH) con el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), provocando que el ácido graso poliinsaturado forme un nuevo radical libre ($\text{L}\cdot$); la peroxidación se propaga cuando $\text{L}\cdot$ reacciona con O_2 para formar el radical peroxilo ($\text{LOO}\cdot$), que sustrae un electrón de una molécula de ácido graso vecina para estabilizarse, formando un lípido hidroperoxido (LOOH) y un nuevo radical $\text{L}\cdot$. El LOOH, al interactuar con metales de transición como Fe^{2+} , forma radicales alcoxilo ($\text{LO}\cdot$) o peroxilo que finalmente llevan a la formación de alcanos y aldehídos como el malondialdehído (MDA) (el marcador de peroxidación de lípidos más ampliamente utilizado) (Cadenas et al., 1996).

Existen mecanismos que se encargan de evitar el efecto nocivo de los radicales libres y desde un punto de vista funcional estos mecanismos pueden dividirse en enzimáticos y no enzimáticos (Hernández-Rodríguez, 1999). Dentro de los mecanismos enzimáticos se encuentran los catalizados por las superóxido dismutasas (SOD) que tienen dos isoenzimas principales, una que contiene manganeso (MnSOD) y que se encuentra en la mitocondria y otra que contiene cobre y zinc (CuZnSOD) y que se encuentra en el citosol (Kumar et al., 2005). Ambas enzimas realizan la transformación del radical superóxido ($\text{O}_2\cdot$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (figura 4). La catalasa (CAT) se encarga de transformar el H_2O_2 en oxígeno molecular (O_2) y se encuentra principalmente en los peroxisomas. Una enzima que participa en la eliminación tanto de H_2O_2 como de peróxidos lipídicos es la glutatión peroxidasa (GPx) que se distribuye ampliamente en el citosol, en la mitocondria y en el núcleo. Esta enzima requiere de glutatión reducido (GSH) como cosustrato. El glutatión oxidado (GSSG) que se produce por la acción de la GPx se recicla por la acción de una enzima dependiente de NADPH, la glutatión reductasa (GRed), que transforma al dímero de GSSG en dos moléculas de GSH (Baynes et al., 2007).

Los mecanismos antioxidantes no enzimáticos ejercen su acción bloqueando la formación del radical libre o inactivándolo. Ejemplos de estas especies son las vitaminas

liposolubles A y E y los compuestos hidrosolubles vitamina C y el glutatión que se encuentran en el citosol (Kumar et al., 2005).

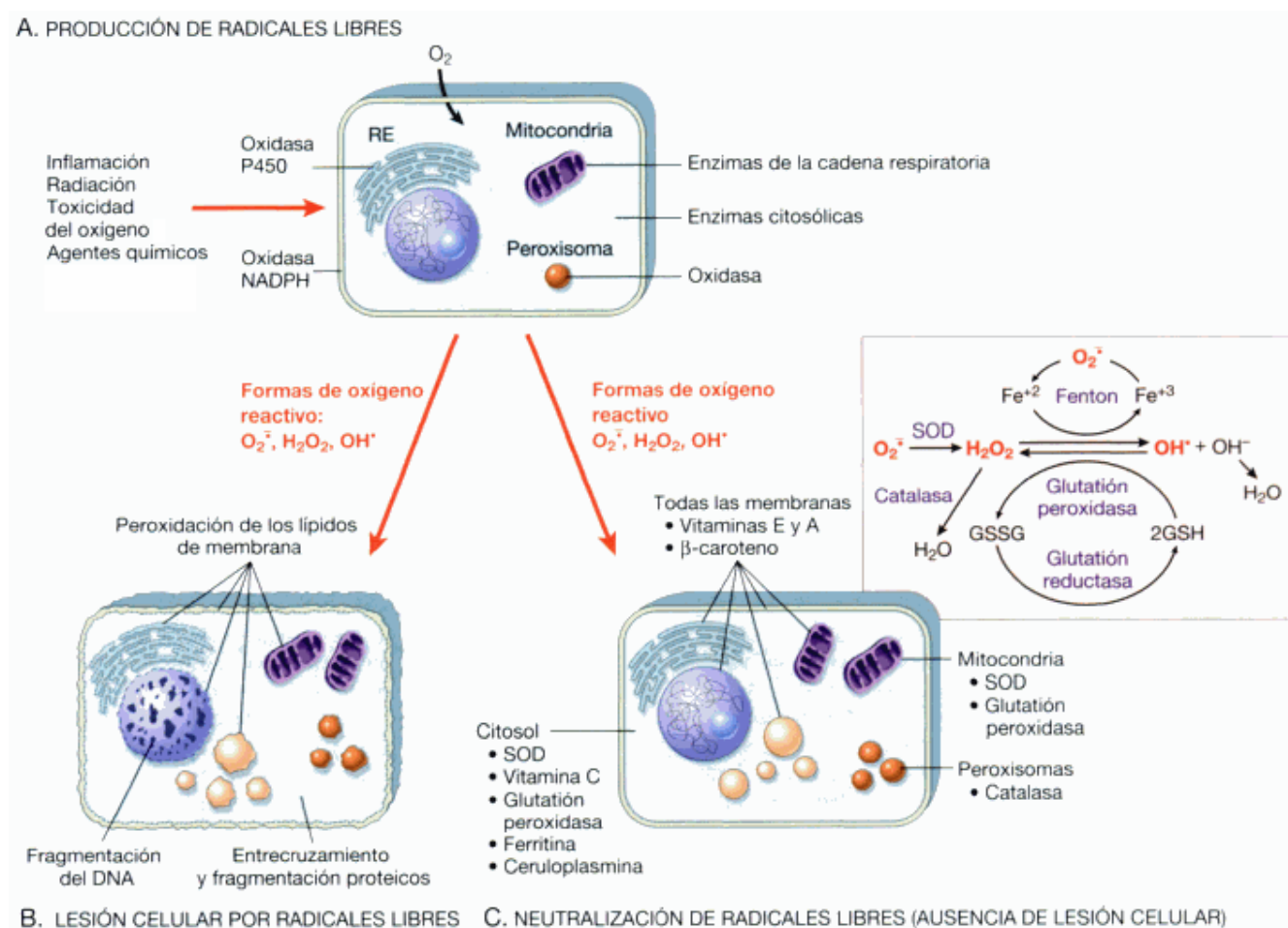


Figura 4. (A) Factores que desencadenan la generación de radicales libres. El O_2 se convierte en $O_2^{\bullet -}$ por enzimas oxidativas en el retículo endoplásmico (RE) y en la mitocondria principalmente. El $O_2^{\bullet -}$ se convierte en H_2O_2 por la acción de la enzima SOD y éste genera OH^{\bullet} por la reacción de Fenton. (B) Las formas reactivas de oxígeno producen daño a diversas estructuras; (C) este daño se puede prevenir por la acción de mecanismos antioxidantes (Kumar et al., 2005).

Se ha reportado que el estrés producido por inmovilización, frío, aislamiento y otros estímulos aplicados durante 40 días en ratas es capaz de generar un incremento en marcadores de estrés oxidativo como el malondialdehído (MDA) (Lucca et al., 2009) y que este tipo de marcadores de estrés se incrementan en la depresión mayor (Bilici et al., 2001). Varios grupos de investigación han propuesto que el estrés oxidativo tiene una importante participación en la depresión (Zafir et al., 2008; Sarandol et al., 2007; Tsuboi et al., 2006). Se han encontrado correlaciones significativas entre la severidad y la duración de la enfermedad

con alteraciones en la actividad de la enzima SOD y elevados niveles del marcador de peroxidación lipídica MDA (Bilici et al., 2002).

Por otro lado, se ha observado que la administración de varios tipos de antidepresivos produce la normalización de procesos oxidativos críticos de manera conjunta con la disminución de los síntomas depresivos en pacientes diagnosticados con depresión mayor (Bilici et al., 2001). En otras formas de depresión se han encontrado resultados inconsistentes que dependen en gran medida de la duración del tratamiento (Hellerstein et al., 1996). En modelos animales se ha reportado que antidepresivos como imipramina, venlafaxina y fluoxetina tienen la capacidad de disminuir el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado (PNF), provocan un aumento en la actividad de las enzimas SOD, catalasa y glutatión reductasa y originan una disminución en los niveles de MDA comparable al observado en las ratas no estresadas. Los hallazgos anteriores sugieren que estos fármacos ejercen su efecto a través de la disminución del estrés oxidativo y que este fenómeno es el responsable de la aparición de la depresión (Zafir et al., 2008).

5.6 La depresión y sus implicaciones en la neurogénesis

Las células madre neuronales se encuentran en todo el cerebro y de manera constante se desarrollan neuronas a partir de sus células precursoras para sustituir a las células que mueren de manera normal (Palmer et al., 1999). Este proceso de formación de neuronas a partir de sus células precursoras se conoce como neurogénesis. A principios de la década de los 60's se presentó evidencia de proliferación neuronal postnatal en varias regiones de ratas adultas. Posteriormente, estos hallazgos se observaron en otras especies como varios tipos de roedores (Cameron et al., 1993), monos (Gould et al., 1999) y humanos (Eriksson et al., 1998) particularmente en dos regiones del cerebro: el giro dentado del hipocampo (Cameron et al., 1993) y la zona subventricular (Gould et al., 2002).

Numerosos estudios *post mortem* realizados en pacientes que padecieron depresión han evidenciado una disminución significativa en el tamaño del hipocampo en comparación con personas sin depresión; esta disminución de tamaño se ha asociado con deficiencias en la neurogénesis que se han atribuido a los elevados niveles de glucocorticoides; sin embargo, si esta disminución es una consecuencia directa de la alta concentración de estas especies no se ha demostrado de manera concluyente (Varghese y Brown 2001; Malberg y Blendy, 2005).

Una posible explicación de la disminución de tamaño en el hipocampo podría encontrarse en la reducción de la biosíntesis en esta región de factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (brain derived neurotrophic factor, BDNF), un regulador crítico de la formación y plasticidad de redes neuronales (Huang y Reichardt, 2001). Por otro lado, el estrés crónico se ha utilizado para inducir comportamientos depresivos en varios modelos animales y se ha visto que este tipo de estrés reduce la expresión de BDNF en el hipocampo. El estrés agudo puede generar cambios similares a este nivel y en las defensas antioxidantes que dependen en gran medida del tipo de estímulo estresante que se utilice (Pajović et al., 2006).

Se ha reportado que la reducción de tamaño en el hipocampo puede prevenirse mediante el uso de tratamientos antidepresivos (incluyendo la TEC) (Tsankova et al., 2006; Warner-Schmidt y Duman, 2006). La hipótesis que relaciona a factores neurotróficos como BDNF con la depresión propone que una disminución en tales factores predispone a la aparición de depresión, mientras que un incremento en los niveles de factores como el BDNF produce un efecto antidepresivo (Castrén et al., 2007). En estudios *post mortem* de pacientes deprimidos se ha encontrado una disminución en los niveles de BDNF medido en muestras cerebrales, y también se ha encontrado que el tratamiento con antidepresivos restaura los niveles de BDNF y los lleva a la normalidad (Castrén, 2004; Chen et al., 2001). Sin embargo, la relación existente entre la administración de antidepresivos, la neurogénesis y la aparición del efecto antidepresivo en pacientes no se ha establecido con claridad.

6. Modelos animales de la depresión

6.1 Generalidades

Los modelos animales se han utilizado durante mucho tiempo en un intento por reproducir aspectos de la depresión como el comportamiento característico de esta enfermedad, como modelo de prueba para establecer la seguridad de los antidepresivos en etapas de desarrollo y como modelos biológicos cuya función es llegar a la identificación de nuevos blancos moleculares que permitan diseñar nuevas moléculas con efecto antidepresivo (McArthur y Borsini, 2006). Sin embargo, todos los modelos animales fallan al tratar de reproducir con exactitud esta enfermedad. Por otro lado, los antidepresivos actualmente disponibles deben su existencia, seguridad y su relativa eficacia al conocimiento que han aportado estos modelos (Kalueff et al., 2007).

6.2 Modelos neuroquímicos

La disminución del estado de ánimo de los pacientes hipertensos que eran tratados con reserpina llevó a los primeros diseños racionales en el desarrollo de moléculas destinadas a ser utilizadas como antidepresivos. El antagonismo de los efectos farmacológicos producidos por la reserpina en animales fue el primer modelo que se utilizó para simular algunas características de la depresión (Costa et al., 1960). Estos modelos permitieron establecer la participación de la función monoaminérgica en la depresión, aunque pocas veces aportaron algún hallazgo que permitiera conocer los mecanismos moleculares involucrados en la reversión de los síntomas depresivos en los pacientes. El periodo comprendido entre los años 60's-70's se caracterizó por el desarrollo de antidepresivos mediante la inducción de alteraciones neuroquímicas específicas y tratando de revertirlas con manipulaciones farmacológicas (McArthur y Borsini, 2006).

6.3 Modelos basados en estrés social

Estos modelos comprenden la separación de los infantes de sus madres, el aislamiento prolongado y la jerarquía social; se enfocan en la generación de cambios conductuales inducidos por estrés debido a interacciones sociales o con el medio ambiente.

La separación de los monos infantes de sus madres fue uno de los primeros modelos que investigó los efectos del estrés social y del medio ambiente en la depresión. Breves periodos de separación de una cría de su madre inducen respuestas endocrinas que se

relacionan con el estrés, por ejemplo, elevaciones en la concentración de CRF. Sin embargo, estos cambios no son exclusivos de comportamientos depresivos, sino que son común denominador de otros padecimientos que se relacionan con el estrés. La aportación del modelo consistió en observar que el comportamiento de los monos infantes separados de sus madres era estabilizado por la administración de antidepresivos (Seay et al., 1962).

Un modelo de depresión basado en el aislamiento y una consecuente interacción social distorsionada es el paradigma intruso-residente, en el cual una rata (sujeto intruso) es colocada en la caja de otra rata que previamente fue sometida a aislamiento prolongado (sujeto residente). La rata residente típicamente muestra un comportamiento agresivo frente al animal intruso y la rata intruso muestra un comportamiento sumiso frente a la rata residente. Se ha observado que el comportamiento sumiso de la rata intruso es revertido con la administración de algunos tipos de antidepresivos como ATC, ISRS o IMAO (Mitchell, 2005).

6.4 Modelos de depresión basados en estrés causado por el medio ambiente

Estos modelos comprenden el modelo de impotencia aprendida (learned helplessness), la PNF, la prueba de suspensión por la cola (tail suspension test, PSC), la aplicación de estrés crónico y la bulbectomía olfatoria.

La prueba de impotencia aprendida consiste en situar a un roedor en cajas de acrílico colocadas en posición invertida de manera que el animal quede sobre una parrilla metálica a la que se hace pasar una corriente eléctrica (inducción del estrés) de tal manera que no le es posible evitar el choque eléctrico. Después de tres días con el tratamiento estresante, los animales dejan de tratar de escapar cuando el escape es posible. La administración de antidepresivos como imipramina redujo la pasividad de estos animales (Overmier y Seligman, 1967).

La PNF fue desarrollada por Porsolt y sus colaboradores en 1977 y es probablemente el modelo más ampliamente utilizado en la evaluación de compuestos con potencial actividad antidepresiva (Cryan y Holmes, 2005). Se fundamenta en la observación del comportamiento que muestra un roedor cuando es colocado en un cilindro de paredes lisas que contiene agua y del que no le es posible escapar. El comportamiento típico de los animales al encontrarse en este ambiente es la inmovilidad que se cree es un reflejo de una falla en la persistencia del comportamiento de escape o que es consecuencia del desarrollo de un comportamiento pasivo que hace que el animal deje de reaccionar ante el estímulo

estresante. Se ha observado que cuando el animal recibe un tratamiento con antidepresivos, el tiempo de inmovilidad disminuye y el animal permanece en movimiento por un tiempo mayor con respecto a los animales del grupo control.

La PNF tiene una variante en la prueba PSC en la cual un ratón es suspendido por la cola durante un intervalo de tiempo, midiendo tanto la duración de la inmovilidad en este intervalo como la fuerza de los movimientos; al igual que en la PNF, la disminución del tiempo de inmovilidad provocado por alguna sustancia se considera como efecto antidepresivo (Stéru et al., 1985).

El comportamiento de inmovilidad observado en estas pruebas se ha relacionado con la pasividad y fatiga así como con la percepción de pérdida de energía que se describe en el DMSIV-TR (2000) para el diagnóstico de depresión.

Katz y sus colaboradores (1981) sometieron a ratas a varios estresores como choques eléctricos, y otros estímulos estresantes por un periodo de 3 semanas. Después de este periodo de inducción, las ratas fueron expuestas a una alta intensidad de luz y sonido, que provocó una reducción en la actividad motora de los animales estresados en comparación con los animales que no fueron sometidos a estrés. Además, los animales que fueron estresados redujeron su preferencia por una solución azucarada (Katz, 1982) sugiriendo que mostraban un deterioro en su capacidad de adquirir estímulos placenteros (comportamiento anhedónico). Tratamientos con ATC, AH, TEC y algunos IMAO atenuaron los cambios inducidos por el estrés aplicado (Katz et al., 1981).

El modelo de depresión basado en la bulbectomía olfatoria se basa en el retiro quirúrgico de los bulbos olfatorios de roedores, que resulta en un incremento en la sensibilidad al estrés, alteraciones del sistema inmune, patrones anormales de sueño, agitación, pérdida de peso y cambios en el comportamiento hedónico; todos estos cambios también se presentan en los pacientes deprimidos (DMSIV-TR, 2000). Los cambios anteriormente mencionados para roedores que fueron sometidos a este procedimiento quirúrgico pueden ser atenuados por la administración de antidepresivos (Cairncross et al., 1978).

6.5 Modelos genéticos

Se ha reportado que ciertas cepas de roedores exhiben características tanto bioquímicas como conductuales similares a las observadas en pacientes que padecen depresión (McArthur y Borsini, 2006). El modelo genético más conocido de depresión es la cepa Flinders de rata, desarrollada por Overstreet y sus colegas (2005). Esta cepa muestra respuestas anormales frente al estrés como alteraciones en el sueño y cambios en la actividad locomotora, particularmente en la PNF. Los modelos con animales transgénicos desarrollados recientemente se utilizan para evaluar específicamente el papel de un gen en los cambios de comportamiento que se observan en los modelos animales de la depresión y en la respuesta a un fármaco antidepresivo.

Se debe enfatizar que el hecho de mostrar actividad en uno o más modelos de la depresión no es garantía de que el compuesto utilizado reaccione positivamente al aplicarse en la clínica y muestre una actividad antidepresiva efectiva. Sin embargo, la necesidad de mostrar actividad en un modelo de depresión es una condición que forzosamente debe cumplirse para que el compuesto bajo estudio pueda ser considerado como un antidepresivo potencial (McArthur y Borsini, 2006).

7. El árbol de *Ginkgo biloba* y el EGb 761

7.1 Generalidades

El registro más antiguo que hace referencia al árbol *Ginkgo biloba* data del siglo XI, en la dinastía *Song* de China, y describe a este árbol como originario de una región que se encuentra al sur del río Yangtse (DeFeudis, 1998). En 1712 el cirujano alemán Engelbert Kaempfer utilizó el término “ginkgo” para referirse a este árbol; sus hojas se encuentran divididas en dos lóbulos, característica que le dio el nombre de “biloba”. Linneo fue quien le dio el nombre científico con el que actualmente se conoce a este árbol: *Ginkgo biloba* (Foster y Chongxi, 1992). El árbol tiene una vida mayor a 1000 años y crece hasta 30 metros de altura (Del Tredici, 1995).



Figura 5. El árbol de *Ginkgo biloba* y una de sus hojas. (www.ophraparks.uk)

7.2 Usos medicinales del árbol *Ginkgo biloba*

Por más de 5000 años en la medicina tradicional china se ha sabido que las frutas y las semillas del árbol de *Ginkgo biloba* se utilizan en el tratamiento del asma y la tos (Zimmermann et al., 2002). En las recetas herbolarias tradicionales de China las hojas se

utilizan para mejorar la circulación sanguínea, restaurar las funciones cerebrales, en el tratamiento de la aterosclerosis, en la normalización de altas concentraciones de colesterol en la sangre, entre otros usos (Foster y Chongxi, 1992).

7.3 Propiedades generales del extracto de *Ginkgo biloba* EGb 761

A principios de la década de los 80's la compañía del Dr. Schwabe (Dr. Willmar Schwabe Pharmaceuticals) en colaboración con Beaufor-Ipsen Pharma, desarrolló el extracto de las hojas de *Ginkgo biloba* conocido como EGb 761 (*Extractum Ginkgo bilobae 761*) (DeFeudis, 1998). El EGb 761 se prepara mediante una serie de extracciones con una mezcla acetona-agua a partir de las hojas secas del árbol *Ginkgo biloba*. Estas extracciones tienen la finalidad de eliminar componentes indeseables de las hojas (como ácidos ginkgólicos) y enriquecer el extracto en sustancias activas que son relevantes en la eficacia clínica (como glicósidos flavónicos y lactonas terpénicas) (Maclennan, 2002). Las extracciones y la composición química del extracto en cada etapa son rigurosamente controladas y estandarizadas, garantizando la calidad farmacéutica del extracto final (DeFeudis, 1998). El EGb 761 se comercializa principalmente bajo las marcas comerciales Tanakan[®] y Tebonin[®].

7.3.1 Composición química del EGb 761

De acuerdo con la patente, el EGb 761 es estandarizado para contener 24% de flavonoides, 7% de proantocianidinas (polímeros basados en flavonoides) y 6% de terpenoides. Este extracto también contiene una serie de ácidos orgánicos como los ácidos quinurénico, hidroxiquinurénico y vanílico que son importantes en la solubilidad acuosa del extracto (Maclennan, 2002); componentes como esteroides (sitosterina, campesterina), las agliconas de los flavonoides (quercetina, kaempferol e isorhamnetina) y los poliprenoles (alcoholes terpénicos de cadena larga) están presentes solo en cantidades traza (<0.1%). Los ácidos ginkgólicos, responsables de la aparición de reacciones alérgicas, se encuentran presentes en una concentración <5 ppm (DeFeudis, 1998). Los flavonoides son principalmente flavonoles como kaempferol, quercetina e isorhamnetina unidos a glucosa o ramnosa. La fracción terpenoide consiste en un grupo de diterpenos que se encuentra únicamente en el árbol *Ginkgo biloba*, los ginkgólidos A, B, C y J y el sesquiterpeno bilobalida (figura 6).

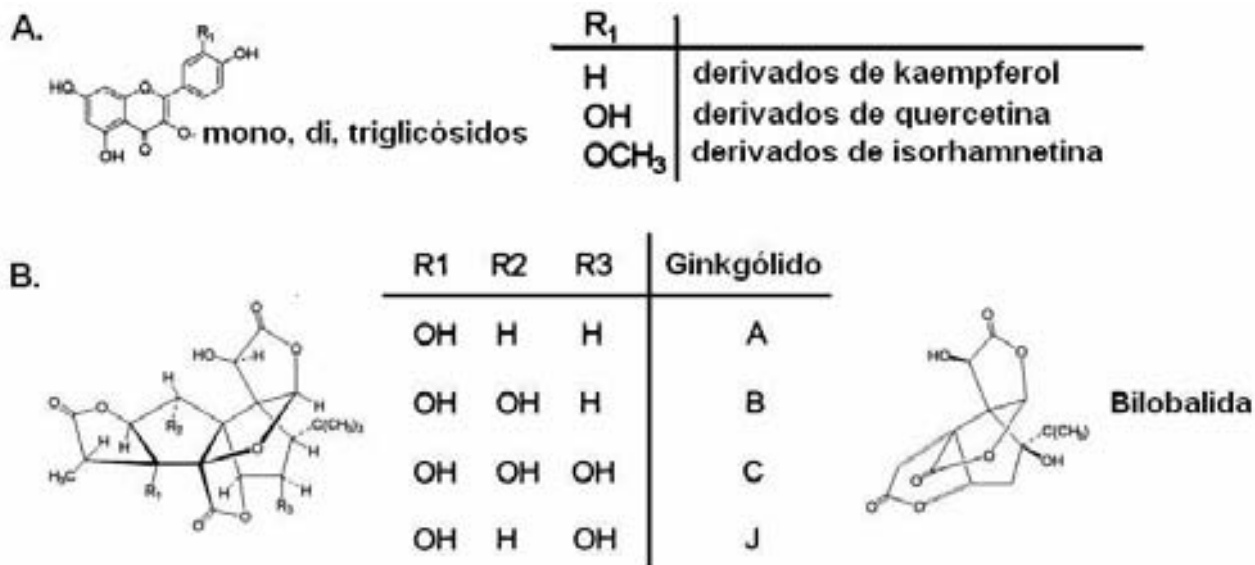


Figura 6. (A) Estructura química de los flavonoides del EGb 761. (B) Estructura química de las trilactonas terpénicas y bilobalida del EGb 761 (Smith y Luo, 2004)

7.3.2 Farmacocinética del EGb 761

El EGb 761 contiene numerosos componentes y sus posibles interacciones *in vivo* como el sinergismo, efecto aditivo o incluso antagonismo dificultan establecer las propiedades generales del extracto. Sin embargo, se han hecho estudios de biodisponibilidad para algunos componentes del EGb 761 (DeFeudis, 1998).

Moreau y sus colaboradores (1986) utilizaron EGb 761 radiomarcado con [¹⁴C] y encontraron que después de administrar 360 mg/Kg de extracto a ratas, 38% de la dosis se eliminó como CO₂, mientras que 21 y 29% de la dosis se excretó en orina y en heces respectivamente. El EGb 761 radiomarcado mostró una vida media de alrededor de 4.5 horas. Los tejidos glandular, cerebral y ocular acumularon las sustancias radiomarcadas del extracto y sus metabolitos. La corteza cerebral y el mesencéfalo acumularon el extracto en una concentración menor a la que se encontró en el hipocampo, el cuerpo estriado y el hipotálamo. Investigaciones posteriores demostraron que los flavonoides se absorben en el intestino delgado en al menos 60% de la dosis administrada por vía oral con una vida media de entre 2 y 4 horas (Kleinjen y Knipschilpd, 1992; Nieder, 1991). Para la fracción terpenoide se ha demostrado que alrededor del 80% de la dosis administrada por vía oral se encuentra biodisponible y en general esta fracción tiene una vida media de entre 4 y 6 horas (Maclennan et al., 2002; Biber y Chaterjee, 1995; Kleinjen y Knipschilpd, 1992).

7.3.3 Usos clínicos del EGb 761

El EGb 761 está indicado para ofrecer protección contra algunos tipos de daño neuronal y vascular (Diamond et al., 2000). Muchos estudios clínicos han demostrado que el EGb 761 tiene propiedades neuroprotectoras que se han atribuido a su capacidad antioxidante (Smith y Luo, 2004). Presenta varias acciones farmacológicas y terapéuticas: aumenta la capacidad cognitiva, disminuye la intensidad de los síntomas propios de la enfermedad de Alzheimer, facilita la reología sanguínea y restaura el metabolismo en los tejidos dañados después de un proceso isquémico, disminuye los síntomas del vértigo y tinnitus y se ha utilizado con éxito en el tratamiento de la enfermedad periférica obstructiva crónica (pAOD) (DeFeudis, 2002; DeFeudis y Drieu, 2000; DeFeudis, 1998). Desde 1994 la Autoridad Federal de Salud alemana aprobó su uso en el tratamiento sintomático de insuficiencia cerebral asociada a demencia vascular o demencia primaria (BGA Kommission E, 1994).

Seguridad del EGb 761: diversos estudios coinciden en que el EGb 761 tiene un buen perfil de seguridad tanto en pacientes como en animales de experimentación. En estos últimos se encontró que en el ratón el EGb 761 tiene una dosis letal de 7.73 g/Kg administrado oralmente y de 1.1 g/Kg cuando se administra por vía intraperitoneal (BGA Kommission E, 1994). En estudios hechos en ratas se administró una dosis máxima de EGb 761 de 100 mg/Kg diariamente durante un periodo de dos años; no se encontró un incremento en la mortalidad y no causó efectos teratogénicos. En un estudio de carcinogenicidad realizado en ratas, no hubo incremento en la incidencia de cambios patológicos (macroscópicos o microscópicos) después de administrarse durante dos años a una dosis de 30 mg/Kg (Spieß y Juretzek, 1993).

En humanos se ha demostrado una buena tolerancia ante casos de sobredosis. En diversos estudios clínicos se ha reportado que dosis mayores a 600 mg/Kg administradas oralmente tienen una muy baja incidencia de efectos adversos (DeFeudis, 1998; Hörr, 1994), algunos de los cuales consisten en reacciones alérgicas en la piel, ligeros dolores estomacales y dolor de cabeza (Maclennan et al., 2002).

El efecto adverso que se ha registrado con mayor frecuencia es la interacción del extracto con anticoagulantes. La combinación de ambos representa un riesgo potencial de sangrado espontáneo (Rossenblat y Midel, 1997) debido a que al EGb 761 se le han atribuido propiedades anticoagulantes; se han reportado interacciones del EGb 761 con antidepresivos, antiepilépticos, antidiabéticos, antiuréticos, antiinflamatorios no esteroideos

y con otros fitofármacos sin que se hayan presentado casos graves de intoxicación (Tang et al., 2007). Se cree que estas interacciones son resultado de la acción de los flavonoides y la fracción terpenoide, que inhiben la actividad de algunas isoformas del citocromo P450 (Gaudineau et al., 2004; Mohutsky et al., 2006). No se conocen restricciones para su administración durante el embarazo y el periodo de lactancia (BGA Kommission E, 1994), aunque se recomienda que su uso en el periodo de gestación debe hacerse bajo vigilancia médica únicamente como precaución.

8. Efectos benéficos del EGb 761

8.1 Aumento de la capacidad cognitiva

Estudios hechos en animales de experimentación han revelado que el EGb 761 facilita la adquisición y retención de memoria (Winter, 1998); se ha observado que uno de los mayores efectos protectores contra el estrés del EGb 761 tiene lugar en el hipocampo (Barkats et al., 1995), una región relacionada con la adquisición de memoria (Squire, 1992). La evidencia de que el EGb 761 puede aumentar la capacidad cognitiva en humanos sanos ha resultado controversial. Numerosos estudios han mostrado que el EGb 761 u otros extractos de composición semejante mejoran la capacidad cognitiva en individuos sanos tanto jóvenes como de edad avanzada (Carlson et al., 2007). Sin embargo, los mayores beneficios sobre la capacidad cognitiva se han reportado en pacientes bajo tratamiento con EGb 761 debido a alguna enfermedad neurodegenerativa como el Alzheimer (DeFeudis, 1998). Por otro lado, Solomon y sus colaboradores (2002) no encontraron un aumento en la capacidad de memoria de adultos mayores; este grupo de investigación sugiere que en este estudio el EGb 761 no proporcionó ningún beneficio debido a los sujetos que participaron en el estudio no presentaban ninguna deficiencia cognitiva.

8.2 Beneficios observados en demencia

Diversos grupos de investigación han presentado evidencia que indica que el EGb 761 reduce el déficit cognitivo que se asocia a la demencia provocada por multiinfartos o por la demencia de tipo Alzheimer (Maclennan et al., 2002). Le Bars y sus colaboradores (1997) evaluaron la eficacia del EGb 761 sobre la intensidad de los síntomas observados en pacientes diagnosticados con demencia de tipo Alzheimer y en demencia provocada por multiinfartos a nivel cerebral. En este estudio el EGb 761 redujo de manera significativa el deterioro cognitivo y mejoró la calidad de vida y el comportamiento social de los pacientes tratados con el extracto en comparación con los pacientes que recibieron placebo. Maurer y sus colaboradores (1997) observaron el efecto del EGb 761 (240 mg/día) contra un placebo por un periodo de 3 meses en 20 pacientes con demencia tipo Alzheimer y encontraron una mejora en la atención y en la memoria de pacientes que recibieron EGb 761, mientras que estos mismos parámetros permanecieron sin cambios en los pacientes del grupo control. De manera colectiva estos estudios soportan el uso del EGb 761 para mejorar, o al menos

estabilizar las deficiencias cognitivas que se observan en pacientes con estos tipos de demencia (Maclennan et al., 2002).

8.3 Efectos benéficos en los desórdenes vestibulares y tinnitus

El efecto del EGb 761 ha sido evaluado en varios desórdenes del sistema vestibular como el vértigo (Diamond et al., 2000; Darlington et al., 1997). El vértigo es la sensación de movimiento cuando éste no ocurre y es un padecimiento en el cual un extracto de las hojas de *Ginkgo biloba* ha mostrado su efectividad. Issing y sus colaboradores (2005) reportaron una disminución de la sensación de vértigo en pacientes afectados por esta condición que recibieron una preparación que contenía un extracto de *Ginkgo biloba* de composición similar a la del EGb 761 en comparación con una preparación homeopática. Por otro lado, se sabe que el tinnitus, comúnmente conocido como “zumbido en los oídos” es una condición que se presenta en alrededor del 10% de la población (Drew y Davies, 2001). Una de las causas comunes del tinnitus es la inadecuada irrigación sanguínea al oído interno. En diversos estudios se ha demostrado que el EGb 761 tiene la capacidad de disminuir la intensidad del sonido que es reportado por los pacientes que presentan este padecimiento en comparación con pacientes que solo recibieron placebo (Ernst y Stevinson, 1999).

8.4 Recuperación después de la isquemia cerebral e insuficiencia cerebrovascular

Un proceso isquémico se caracteriza por la obstrucción del flujo sanguíneo en los vasos que se distribuyen por un tejido provocando que la oxigenación de éste no se realice en forma adecuada. Pierre y sus colaboradores (1999) demostraron el efecto protector del EGb 761 después de la oclusión de la arteria media cerebral en ratones. La insuficiencia cerebrovascular es un término utilizado para describir el declive no específico relacionado con la edad que se observa en algunas funciones mentales como la capacidad de memoria y la capacidad de concentración (Maclennan et al., 2002). En un estudio doble ciego se examinó el efecto del EGb 761 sobre parámetros neuropsicológicos y neuropsicométricos en 31 pacientes con 50 años de edad o mayores con insuficiencia cerebrovascular; 120 mg diarios de EGb 761 se administraron durante 12-24 semanas a estos pacientes. Después del tratamiento, se encontró un aumento en la capacidad de memoria en los pacientes tratados con EGb 761 en comparación con el grupo placebo (Diamond, 2000).

8.5 Efectos sobre el factor activador de plaquetas (FAP)

Las acciones sistémicas del FAP incluyen broncoconstricción, hipotensión, disfunciones cardíacas y reclutamiento de leucocitos en procesos inflamatorios y es secretado por varios tejidos (Koch, 2005; Müller et al., 1995). Se ha sugerido que el FAP puede estar implicado en la patogénesis de enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios, asma, alergias y aterosclerosis entre otros padecimientos (Koltei et al., 1991). Se ha propuesto que el antagonismo de los receptores del FAP puede ser un blanco novedoso en el tratamiento de estas enfermedades. El EGb 761 tiene una actividad antagonista del FAP y se sabe que esta actividad es exclusiva de los ginkgólidos presentes en el extracto (Steinke et al., 1993). Algunos efectos benéficos del EGb 761 se han reportado en el tratamiento de alergias de la piel, asma y daño producido por quemaduras; se cree que la acción benéfica del extracto se debió al antagonismo de las acciones del FAP (Guinot, 1994)

8.6 Restauración de la transmisión monoaminérgica del sistema nervioso central

Efecto del EGb 761 en los receptores noradrenérgicos en cerebro. Huguet y Tarrade (1992) demostraron que la disminución de los adrenoreceptores del tipo α_2 que se asocia al envejecimiento es significativamente revertida al tratar ratas de manera subcrónica (21 días) con EGb 761 (5 mg/Kg/día, i.p.). El EGb 761 no alteró la unión del agonista selectivo para el receptor α_2 [3 H] rauwolscina en el hipocampo de ratas jóvenes, pero incrementó el valor de B_{max} (cantidad máxima de complejo receptor-ligando) en las ratas de edad avanzada (DiRenzo, 2000); este hallazgo indica que el EGb 761 puede utilizarse en algunos tipos de demencias asociadas al envejecimiento al restaurar la función de este tipo de receptores.

Efecto del EGb 761 en los receptores serotoninérgicos. El EGb 761 (5 mg/Kg/día, i.p.) que se administró por 21 días consecutivos no alteró la unión de [3 H] 8-hidroxi-2-(di-*N*-propilamino) tetralina ([3 H]8-OH-DPAT), un ligando que se une selectivamente al receptor 5-HT_{1A}, en ratas jóvenes o de edad avanzada, aunque incrementó el valor de B_{max} en un 33% en las ratas de mayor edad en comparación con los animales más jóvenes del grupo control (Yeung y Friedman, 1991). Los receptores del tipo 5-HT_{1A} se encuentran restringidos solo a ciertas regiones cerebrales, como la corteza cerebral y el hipocampo, que están relacionados en la regulación de las funciones cognitivas (Dillon et al., 1991). Se cree que la disminución en los receptores del tipo 5-HT_{1A} que se observa con el envejecimiento podría relacionarse con el

deterioro de las funciones cognitivas en personas de edad avanzada (DiRenzo, 2000) y que el EGb 761 mejora las funciones cognitivas en este tipo de pacientes a través del aumento de estos receptores.

Efecto del EGb 761 en el sistema dopaminérgico en el cerebro. La neurotoxina *N*-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) produce un daño selectivo hacia las neuronas dopaminérgicas. La administración de EGb 761 (10, 40, 89 y 120 mg/Kg/día, i.p.) durante 17 días previos a la administración de MPTP, protegió de manera efectiva a las neuronas dopaminérgicas del cuerpo estriado cerebral de ratones contra la acción de la neurotoxina MPTP (Rojas et al., 2008). Una recuperación similar en la función de las neuronas dopaminérgicas se ha reportado cuando la administración del EGb 761 se hace después de la administración de la neurotoxina 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺) (Rojas et al., 1993). En ambos casos, la acción del EGb 761 fue independiente de la inhibición de la captación neuronal de MPTP o de su metabolito, el ión MPP⁺, y probablemente depende de su acción antioxidante, que no permite la peroxidación de lípidos indicando que el extracto posee propiedades preventivas y restauradoras en las neuronas dopaminérgicas que posiblemente se deban a la prevención de la peroxidación de lípidos manteniendo la integridad de la membrana celular de las neuronas (Ramassamy et al., 1992b).

Efecto del EGb 761 en la recaptura de monoaminas biogénicas. Se ha reportado que altas concentraciones de EGb 761 inhiben la recaptura de [³H] noradrenalina ([³H] NA), [³H] dopamina ([³H] DA) y [³H] serotonina ([³H] 5-HT) en fracciones enriquecidas de sinaptosomas de cerebro de rata (Taylor, 1990). Análisis posteriores de estos datos mostraron que concentraciones muy bajas de EGb 761 (0.1-1 µg/mL) pueden aumentar la recaptura *in vitro* de NA y DA pero no de 5-HT (Taylor et al., 1991). Ramassamy y sus colaboradores (1992a) encontraron que el EGb 761 modifica la recaptura de [³H] 5-HT de dos maneras distintas: en una concentración de 4-16 µg/mL, la recaptura de [³H] 5-HT se incrementó de manera significativa (máximo 23%), mientras que a 32 µg/mL o concentraciones más altas, la recaptura de [³H] 5-HT fue inhibida. En este mismo estudio, se demostró que la fracción flavonoide del EGb 761 es la responsable del aumento de la recaptura de monoaminas.

Efecto del EGb 761 en la actividad de la MAO cerebral. Wu y Zhu (1999) investigaron el efecto del EGb 761 en la actividad de la MAO en cerebro de ratón, y encontraron que el tratamiento con EGb 761 resultó en una inhibición no selectiva de la MAO. Este mismo hallazgo fue reportado por Rojas y sus colaboradores en estudios conducidos en un modelo

in vivo (2004). De igual manera, Sloley y sus colaboradores (2000) reportaron que el EGb 761 es capaz de inhibir a las dos isoformas de MAO posiblemente debido al kaempferol que se encuentra presente en el extracto.

8.7 Propiedades antioxidantes

Numerosos estudios han demostrado que el EGb 761 contiene compuestos con actividad antioxidante que pueden proteger de manera efectiva contra el daño producido por el estrés oxidativo (Sastre et al., 1998; Marcocci et al., 1994; Ramassamy et al., 1992c).

Los componentes flavonoides del EGb 761 y/o sus metabolitos parecen estar relacionados con la acción atrapadora de radicales libres y con acciones antioxidantes en sistemas *in vitro* (DeFeudis, 1998). Se ha observado que los flavonoides interaccionan preferentemente con los radicales OH^{\bullet} (Zimmermann et al., 2002); adicionalmente, los grupos fenólicos presentes en los flavonoides pueden quelar metales de transición pro-oxidantes como el Fe^{2+} e inhibir la formación de nuevos radicales OH^{\bullet} (Zimmermann, et al., 2002; Ni et al., 1996). Por otro lado, en experimentos que fueron realizados solo con ginkgólidos y bilobalidos se demostró que estas especies también poseen la capacidad de reducir el daño producido por especies pro-oxidantes y por radicales libres (DeFeudis, 1998).

Los radicales peroxilo (LOO^{\bullet}) son la especie que se encuentra más relacionada con la peroxidación de lípidos. Se ha reportado que el EGb 761 brinda protección contra los daños oxidativos de este radical y previene su formación al interaccionar con los radicales OH^{\bullet} , aportando evidencia de la capacidad antioxidante del extracto (Oyama et al., 1996). Por otro lado, Pincemail y sus colaboradores (1989) demostraron que el EGb 761 es un potente atrapador del radical superóxido; adicionalmente el EGb 761 demostró tener actividad superóxido dismutasa, debido a que favoreció la reacción que convierte al radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular; este autor sugiere que esto puede deberse a la presencia de un tipo de enzima SOD que contiene hierro en las hojas de *Ginkgo biloba*.

9. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

9.1 Sujetos experimentales

Este trabajo se realizó en ratones macho de la cepa BALB/cAnHsd (25-30 g de peso) de 11-13 semanas de edad. Los animales fueron mantenidos en un ciclo de luz/oscuridad 12/12 horas, una temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de 40%. Los animales tuvieron acceso a agua y alimento *ad libitum*.

El EGb 761 fue obtenido de Schwabe Pharmaceuticals (Karlsruhe, Alemania) y la imipramina fue obtenida de Sigma (St. Louis MO, USA). El resto de los reactivos fueron obtenidos de Sigma, Merck, J.T. Baker, entre otras casas comerciales.

Para la preparación de las dosis administradas, el EGb 761 fue disuelto en solución salina isotónica (0.9%) y el pH fue ajustado a un valor de 7.4, mientras que la imipramina únicamente fue disuelta en solución salina isotónica.

9.2 Grupos experimentales

Los animales se separaron en tres grupos: el grupo control que recibió solución salina isotónica (i.p.), el grupo tratado con EGb 761 (10 mg/Kg, i.p.) y el grupo tratado con imipramina (15 mg/Kg, i.p.). El periodo de administración tuvo una duración de 17 días, administrando el tratamiento correspondiente a los animales una vez al día entre las 08:00 y las 11:00 horas.

9.3 La prueba de nado forzado (PNF)

Esta prueba se ha establecido como un modelo válido de depresión (Detke et al., 1995) y es probablemente el modelo más ampliamente utilizado en la evaluación de compuestos con potencial actividad antidepresiva (Cryan y Holmes, 2005; Nestler et al., 2002). La prueba se efectuó de acuerdo con el procedimiento diseñado por Porsolt y sus colaboradores (1977) con ligeras modificaciones. En el día 17 de administración, el animal fue sometido a un periodo de habituación que consistió en colocar al animal en un cilindro de vidrio de 30 cm de alto y 22 cm de diámetro conteniendo agua ($25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) hasta una altura de 22 cm durante 15 minutos sin efectuar ninguna medición; una vez transcurrido el tiempo de habituación correspondiente, el agua fue desechada, remplazada y el tanque fue limpiado cuidadosamente antes de introducir a otro individuo en el mismo tanque. El animal que fue sacado del cilindro fue secado y colocado nuevamente en su caja para

inmediatamente recibir la última administración del tratamiento correspondiente; 24 horas después, el mismo animal fue nuevamente colocado en el cilindro con las mismas características durante 6 minutos y dentro de este intervalo de tiempo se midió el tiempo que el animal permaneció inmóvil, considerando inmovilidad el momento a partir del cual el animal dejó de hacer los movimientos necesarios para escapar y únicamente se movía para permanecer a flote (Porsolt et al., 1977). Después de este periodo de 6 minutos, el animal fue sacado del tanque y sacrificado inmediatamente por dislocación cervical; el cerebro fue cuidadosamente removido y se diseccionaron las siguientes regiones: cerebelo, hipotálamo, mesencéfalo, corteza frontal, cuerpo estriado e hipocampo. Estas regiones fueron inmediatamente pesadas y almacenadas a -70°C para su conservación y posterior análisis. En la prueba de nado forzado se analizaron los tres grupos experimentales mientras que para la cuantificación de monoaminas y sus metabolitos, la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes, el western-blot para las enzimas superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (CuZnSOD) y superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD) y la determinación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) fueron analizados únicamente el grupo control y el grupo tratado con EGb 761.

9.4 Análisis de monoaminas y sus metabolitos

En la depresión se ha reportado consistentemente una disminución en la cantidad de monoaminas en el espacio sináptico. En este trabajo se midieron las concentraciones de las monoaminas noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5-HT) y de los metabolitos ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovalínico (HVA) y el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en cada región cerebral (excepto cerebelo) mediante el siguiente procedimiento: una alícuota de 500 μL de una mezcla de ácido perclórico y metabisulfito de sodio (0.9% v/v y 0.2% p/v, respectivamente) fue adicionada al tejido previamente pesado y enseguida el tejido fue homogeneizado utilizando un sonicador (Lab-line Instruments). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 4000 g durante 10 minutos a 4°C ; se recuperó el sobrenadante y éste fue filtrado para proceder con la determinación de las monoaminas y de los metabolitos anteriormente mencionados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (LC 200, Perkin Elmer) utilizando un detector electroquímico (LC-4C; BASi Inc.). La cantidad de las especies de interés se obtuvo de la interpolación de una curva de calibración para cada monoamina y cada metabolito (Rojas et al., 2008). Los resultados fueron expresados como μg de compuesto/g de tejido. La medición del recambio

de las monoaminas DA y 5-HT se expresó como el cociente del metabolito (HVA ó 5-HIAA) entre la cantidad de la monoamina correspondiente (DA ó 5-HT).

9.5 Actividad de enzimas antioxidantes

Recientemente se ha asociado una disminución de la actividad de ciertas enzimas antioxidantes con la depresión. Por otro lado, se ha reportado que el tratamiento con antidepresivos restaura la actividad de estas enzimas (Bilici et al., 2001). En este trabajo se midió la actividad de las enzimas CuZnSOD y la MnSOD de manera conjunta (SOD total), así como la actividad de la enzima glutatión reductasa (GRed) y de la glutatión peroxidasa (GPx) en las 6 regiones cerebrales diseccionadas. Cada muestra fue analizada por duplicado. La cantidad de proteínas para referir la actividad enzimática se determinó por el método descrito por Lowry y sus colaboradores (1951).

9.5.1 Actividad de la superóxido dismutasa total (SOD total)

La actividad de esta enzima fue determinada mediante un método basado en la habilidad de SOD para inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) hacia formazán por el radical superóxido que es generado por el sistema xantina-xantina oxidasa (Oberley et al., 1981; Winterbourn et al., 1975). La actividad de SOD total se determinó en una mezcla de reacción de 3 mL conformada por xantina 0.122 mM, EDTA 0.122 mM, NBT 30.6 μ M, albúmina 0.006%, Na_2CO_3 4.9 mM, xantina oxidasa (168 U/L), amortiguador de fosfatos 0.067 M a pH de 7.8 y la muestra homogeneizada en la dilución adecuada. El tubo conteniendo la mezcla de reacción fue incubado por 15min a 27°C y posteriormente se determinó la absorbancia de la mezcla a 560nm en un espectrofotómetro UV-vis (DU 6 Beckman Coulter Inc.). La actividad fue expresada como unidades/mg proteína. (Pedraza-Chaverri et al., 2000)

9.5.2 Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de la GPx se midió de manera indirecta por una reacción acoplada con la glutatión reductasa (Lawrence y Burke, 1976) y este método se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm debida a la desaparición de NADPH. La actividad de la enzima GPx se determinó en una mezcla de reacción consistente en fosfato de potasio 50 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, glutatión reductasa 1 U/mL y glutatión 1 mM. Un volumen de 100 μ L de una dilución 1:3 del tejido bajo estudio previamente

homogeneizado fue añadido a 0.8 mL de la mezcla de reacción anteriormente descrita y esta mezcla fue incubada durante 5 minutos a una temperatura de 20°C antes de iniciar la reacción mediante la adición de 100 µL de H₂O₂ 1.5 mM. La absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro UV-vis (DU 6 Beckman Coulter Inc.) a una longitud de onda de 340 nm durante 3 minutos. La actividad de la enzima fue calculada a partir de la pendiente de la recta que resultó de graficar absorbancia contra tiempo (µmol de NADPH oxidado/minuto), tomando en cuenta que el coeficiente de absorción molar del NADPH es 6.22 mM. Los resultados fueron expresados como unidades/mg proteína. (Pedraza-Chaverri et al., 2000)

9.5.3 Actividad de la glutatión reductasa (GRed)

La actividad de GRed en cada tejido se determinó utilizando glutatión oxidado como sustrato y midiendo la desaparición de NADPH a 340 nm con un espectrofotómetro UV-vis (DU 6; Beckman Coulter Inc.) de acuerdo con el procedimiento reportado por Carlberg y Mannervik (1975). La tasa de oxidación de NADPH por el glutatión oxidado (GSSG) a 30°C fue utilizada como una medida estándar de la actividad de GRed. La mezcla de reacción final de 1 mL consistió en: GSSG 1.25 mM, NADPH 0.1 mM, EDTA 0.5 mM, buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.6 y la cantidad apropiada de muestra que contiene glutatión reductasa para originar un cambio en la absorbancia de 0.05-0.3 unidades de absorbancia/min. La oxidación de 1 pmol de NADPH bajo estas condiciones se utilizó como una unidad de actividad de glutatión reductasa. La actividad específica se expresó como unidades/mg proteína. (Pedraza-Chaverri et al., 2000)

9.6 Western-blot para CuZnSOD y MnSOD

Para determinar el efecto de la administración de EGb 761 sobre la cantidad de CuZnSOD y de MnSOD se utilizó este método basado en la interacción de estas enzimas con anticuerpos específicos. Las 6 regiones cerebrales diseccionadas fueron analizadas bajo el siguiente procedimiento: el tejido fue homogeneizado con inhibidores de proteasas en un amortiguador de fosfatos a pH de 7.4. El tejido homogeneizado fue centrifugado a 1000 g por 10 minutos a 4°C. Una cantidad de homogenado equivalente a 25 µg de proteína fue fraccionada utilizando un gel para electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS) (12.5%), y después de obtener la separación de las proteínas, los productos fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La inmunodetección de las enzimas

CuZnSOD y MnSOD se hizo mediante anticuerpos primarios específicos para estas enzimas (Stressgen Biotechnologies Co.) como fue descrito por Pedraza-Chaverri y sus colaboradores anteriormente (2000). La detección de los complejos enzima-anticuerpo se visualizó mediante quimioluminiscencia utilizando un sistema de detección de quimioluminiscencia aumentada (Amersham) seguida de un análisis densitométrico utilizando el software SIGMASCAN (Aspire Software Internacional). Las muestras se analizaron por duplicado y los resultados se expresaron como el cambio en % de la expresión con respecto al grupo control.

9.7 Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

El estrés oxidativo tiene como una de sus consecuencias un incremento en la peroxidación de lípidos, y una de las formas de evaluar este fenómeno es medir las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). El contenido de estas especies fue medido en las 6 regiones cerebrales que fueron diseccionadas. Este ensayo se hizo de acuerdo con el procedimiento descrito por Buege y Aust (1978). El tejido fue homogeneizado en una mezcla mantenida en hielo de 1.5 mL de amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.0 y 1 mL de NaCl 0.015 M; 1 mL de este homogenado fue añadido a un tubo con 2 mL del reactivo de ácido tiobarbitúrico (0.5 g de ácido tiobarbitúrico + 16 g de ácido tricloroacético + 2.5 mL de ácido clorhídrico concentrado en 100 mL de agua), y esta mezcla fue calentada en un baño de agua a ebullición durante 30 minutos. Enseguida, la mezcla fue centrifugada a 4000 g durante 15 minutos a 4°C. La peroxidación de lípidos fue medida como la producción de malondialdehído que en combinación con el ácido tiobarbitúrico forma un cromógeno de color rosa que fue evaluado a 532 nm utilizando un espectrofotómetro UV-vis (Perkin Elmer lambda bio 24109) (Rojas y Ríos, 1993). El contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico expresado como nmol de malondialdehído en las muestras, fue obtenido de la interpolación en una curva estándar construida a partir de la oxidación de 2-deoxi-D-ribosa (Waravdekar y Saslaw, 1959). Las proteínas fueron medidas de acuerdo con Lowry y sus colaboradores (1951). Una reacción en blanco se utilizó para ajustar las lecturas de las muestras, las cuales fueron analizadas por duplicado. Los resultados fueron expresados como nmol malondialdehído/mg proteína.

9.8 Cuantificación de proteínas

La determinación de la cantidad de proteínas se efectuó en las 6 regiones cerebrales que fueron diseccionadas y se realizó de acuerdo con el método descrito por Lowry y sus colaboradores (1951) con ligeras modificaciones (Rojas y Ríos, 1993). El tejido bajo estudio fue homogeneizado en una mezcla mantenida en hielo de 1.5 mL de amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.0 y 1 mL de NaCl 0.015 M. 50 μ L del tejido homogeneizado se mezclaron con 950 μ L de agua desionizada; de esta última mezcla, 400 μ L fueron transferidos a un nuevo tubo, al que se adicionaron 2 mL de una mezcla preparada con 49 mL de Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0.1 N, 0.5 mL de tartrato de sodio y potasio al 2% y 0.5 mL de CuSO₄ al 1%. Después de la adición, la mezcla fue agitada y se dejó en reposo durante 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se adicionaron al tubo 0.2 mL de una mezcla 1:1 del reactivo Folin-Ciocalteu:agua desionizada. El tubo se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, y una vez transcurrido este tiempo, el contenido del tubo fue leído a 550 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Perkin Elmer lambda bio 24109). Cada muestra fue preparada y leída por duplicado. La cantidad de proteína se obtuvo de la interpolación de una curva de calibración preparada con albúmina. Los resultados fueron expresados como mg proteína/mL.

9.9 Análisis estadístico

En todos los resultados los datos fueron expresados como el resultado promedio del grupo \pm el error estándar de la media (EEM). En la prueba de nado forzado los resultados se analizaron con un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía seguida de un análisis de mínima diferencia significativa Tukey en el tiempo de inmovilidad. En la cuantificación de monoaminas y sus metabolitos, actividad enzimática, western-blot de CuZnSOD y MnSOD y en la evaluación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, los resultados se analizaron mediante la prueba *t* de Student. Valores de $P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$ fueron considerados como estadísticamente significativos. Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc.).

10. RESULTADOS

La administración de EGb 761 (10 mg/Kg, i.p.) y de imipramina (15 mg/Kg, i.p.) provocó una disminución significativa ($P<0.001$) en el tiempo de inmovilidad del 38.8% y 38% respectivamente en comparación con el tiempo de inmovilidad observado en el grupo control. Entre el efecto producido por el EGb 761 y el efecto producido por la imipramina no se observaron diferencias significativas ($P<0.001$).

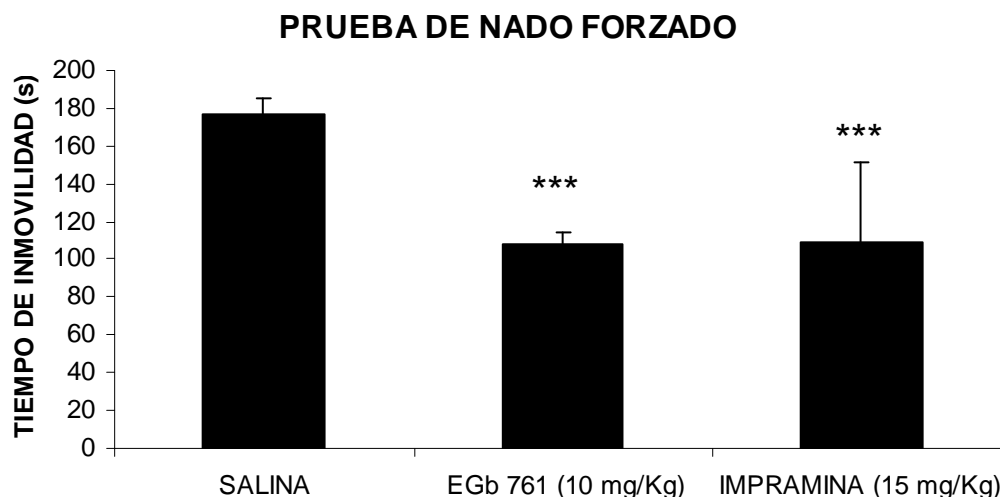


Figura 7. Tiempo de inmovilidad en los grupos experimentales tratados con solución salina isotónica (i.p.) (n=47), EGb 761 10 mg/Kg, i.p.) (n=48) o imipramina (15 mg/Kg, i.p.) (n=17) durante 17 días previos a la prueba de nado forzado. Los datos que se presentan corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con una prueba ANDEVA de una vía seguida de un análisis de mínima diferencia significativa Tukey. *** $P<0.001$ en comparación con el grupo control. EGb: Extracto de *Ginkgo biloba*.

La cantidad de los neurotransmisores monoaminérgicos noradrenalina (NA), dopamina (DA) y serotonina (5-HT) y de los metabolitos ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovalínico (HVA) y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) fue evaluada en la corteza frontal, cuerpo estriado, hipocampo, hipotálamo y mesencéfalo del grupo control y del grupo tratado con EGb 761.

En la corteza frontal no se observaron diferencias significativas en la cantidad de monoaminas o de sus metabolitos entre el grupo control y el grupo tratado con EGb 761 como se muestra en la figura 8.

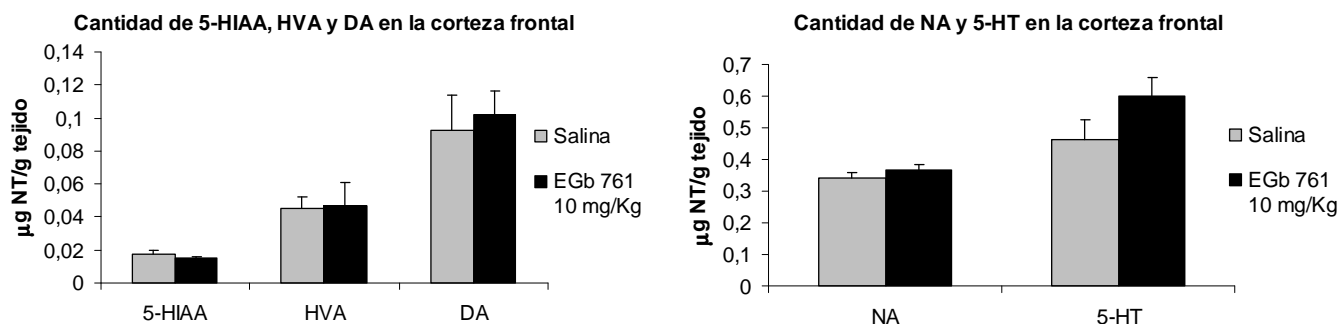


Figura 8. Cantidad de monoaminas y algunos de sus metabolitos en la corteza frontal de animales tratados con solución salina isotónica (i.p.) (n=15) o con EGb 761 (10 mg/Kg, i.p.) (n=17) durante 17 días previos a la prueba de nado forzado. Los valores presentados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con una prueba *t* de Student. EGb: Extracto de *Ginkgo biloba*; NT: neurotransmisor monoaminérgico o metabolito; 5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético; HVA; ácido homovalínico; DA: dopamina; NA: noradrenalina; 5-HT: serotonina.

En la figura 9 se presentan los resultados obtenidos para el cuerpo estriado en donde se encontraron aumentos significativos en la cantidad de DOPAC del 22.9% ($P < 0.05$) y en la cantidad de 5-HIAA del 20% ($P < 0.05$) en el grupo tratado con EGb 761 en comparación con el grupo control; en el grupo tratado con EGb 761 se observó una disminución significativa ($P < 0.001$) del 72.7% en la cantidad de 5-HT con respecto a la cantidad de esta monoamina observada en el grupo control. En las cantidades de NA, HVA y DA no se observaron cambios significativos entre los dos grupos.

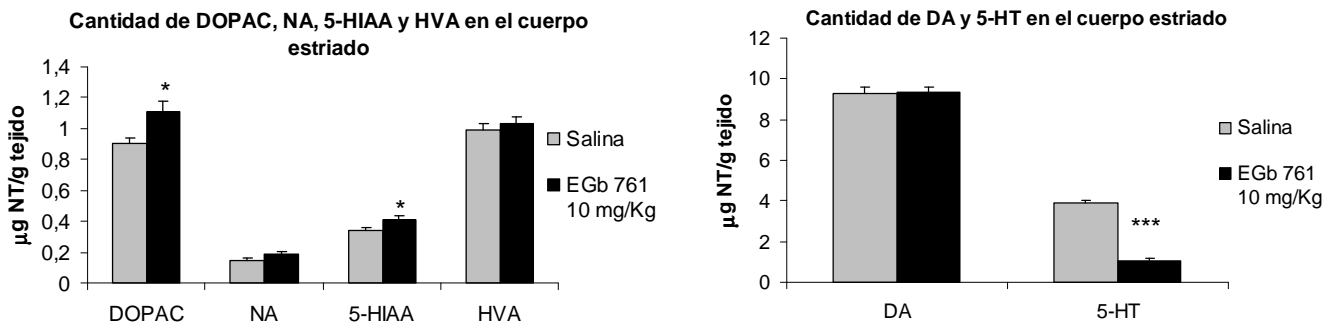


Figura 9. Cantidad de monoaminas y algunos de sus metabolitos en el cuerpo estriado de animales tratados con solución salina isotónica (i.p.) (n=15) o con EGb 761 (10 mg/Kg, i.p.) (n=17) durante 17 días previos a la prueba de nado forzado. Los valores presentados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con una prueba *t* de Student. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ con respecto al grupo control. EGb: Extracto de *Ginkgo biloba*; NT: neurotransmisor monoaminérgico o metabolito; DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético; NA: noradrenalina; 5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético; HVA: ácido homovalínico; DA: dopamina; 5-HT: serotonina.

La figura 10 muestra los resultados obtenidos luego del análisis del hipocampo; en esta región no se encontraron diferencias significativas en las cantidades de las especies bajo estudio entre el grupo control y el grupo tratado con EGb 761.

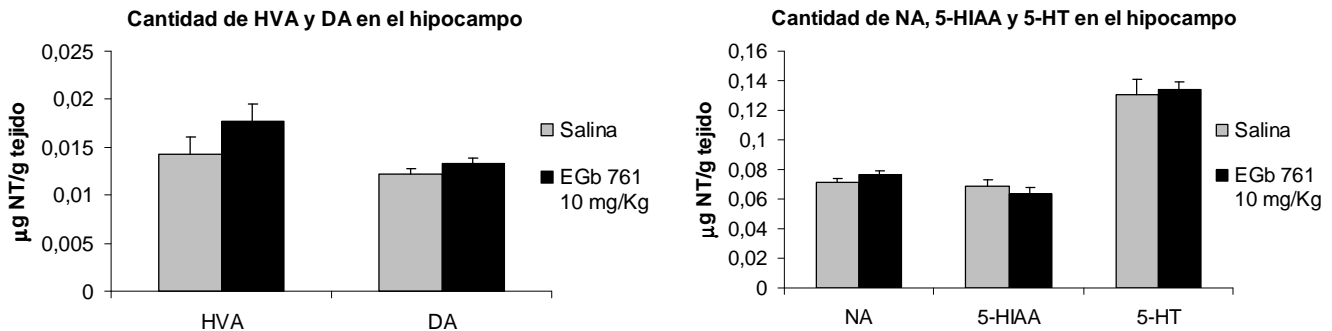


Figura 10. Cantidad de monoaminas y algunos de sus metabolitos en el hipocampo de animales que recibieron como tratamiento solución salina isotónica (i.p.) (n=15) o EGb 761 (10 mg/Kg, i.p.) (n=17) durante 17 días previos a la prueba de nado forzado. Los valores presentados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con una prueba *t* de Student. EGb: Extracto de *Ginkgo biloba*; NT: neurotransmisor monoaminérgico o metabolito; HVA: ácido homovalínico; DA: dopamina; NA: noradrenalina; 5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético; 5-HT: serotonina.

En el hipotálamo (figura 11) se encontraron disminuciones significativas en la cantidad de 5-HIAA del 35.2% ($P < 0.01$), en la cantidad de HVA del 39.1% ($P < 0.05$) y en la cantidad de NA del 18.1% ($P < 0.01$) en el grupo tratado con EGb 761 con respecto al grupo control. En el contenido de DOPAC se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) del 79.1% en el grupo tratado con EGb 761 en comparación con el grupo control. Las cantidades de DA y 5-HT no tuvieron diferencias significativas entre los dos grupos.

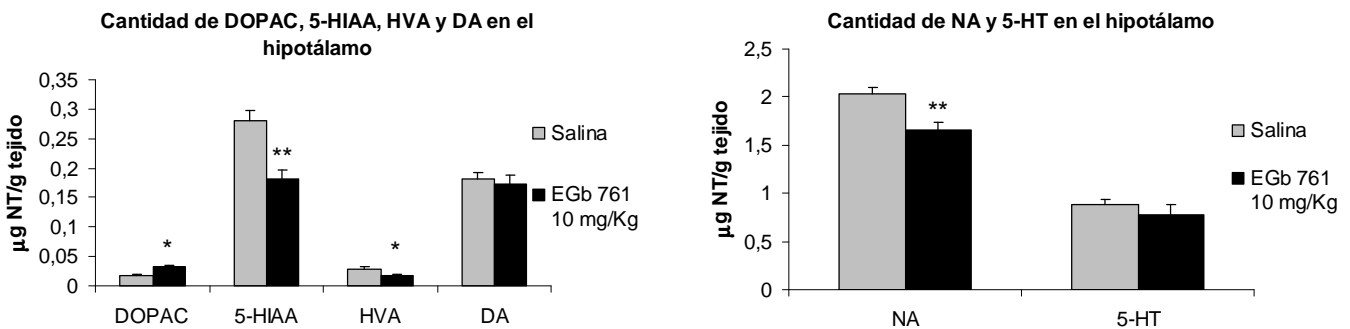


Figura 11. Cantidad de monoaminas y algunos de sus metabolitos en el hipotálamo de animales tratados con solución salina isotónica (i.p.) (n=15) o con EGb 761 (10 mg/Kg, i.p.) (n=17) durante 17 días previos a la prueba de nado forzado. Los valores presentados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con una prueba *t* de Student. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto al grupo control. EGb: Extracto de *Ginkgo biloba*; NT: neurotransmisor o metabolito; DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético; 5-HIAA ácido 5-hidroxiindolacético; HVA: ácido homovalínico; DA: dopamina; NA: noradrenalina; 5-HT: serotonina.

En el análisis del mesencéfalo (figura 12) se encontraron incrementos significativos en la cantidad de HVA del 83.4% ($P<0.01$) y de 5-HT del 61.4% ($P<0.001$) en el grupo tratado con EGb 761 en comparación con el grupo control. Las cantidades de DOPAC, DA, NA y 5-HIAA no presentaron cambios significativos entre el grupo control y el grupo tratado con EGb 761.

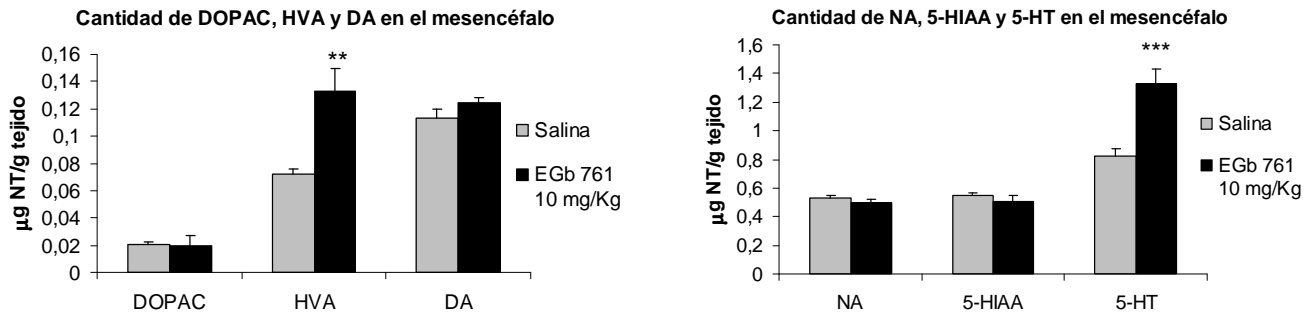


Figura 12. Cantidad de monoaminas y algunos de sus metabolitos en el mesencéfalo de animales tratados con solución salina isotónica (i.p.) (n=15) o con EGb 761 (10 mg/Kg, i.p.) (n=17) durante 17 días previos a la prueba de nado forzado. Los resultados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con una prueba *t* de Student. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ con respecto al grupo control. EGb: Extracto de *Ginkgo biloba*; NT: neurotransmisor o metabolito; DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético; HVA: ácido homovalínico; DA: dopamina; NA: noradrenalina; 5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético; 5-HT: serotonina.

El metabolismo regional de las monoaminas DA y 5-HT se evaluó mediante el recambio. En la corteza frontal (figura 13) se observó una disminución significativa ($P<0.05$) del 32.5% en el recambio de 5-HT en el grupo tratado con EGb 761 en comparación con el grupo control. La disminución del recambio de DA en el grupo tratado con EGb 761 no fue estadísticamente significativa.

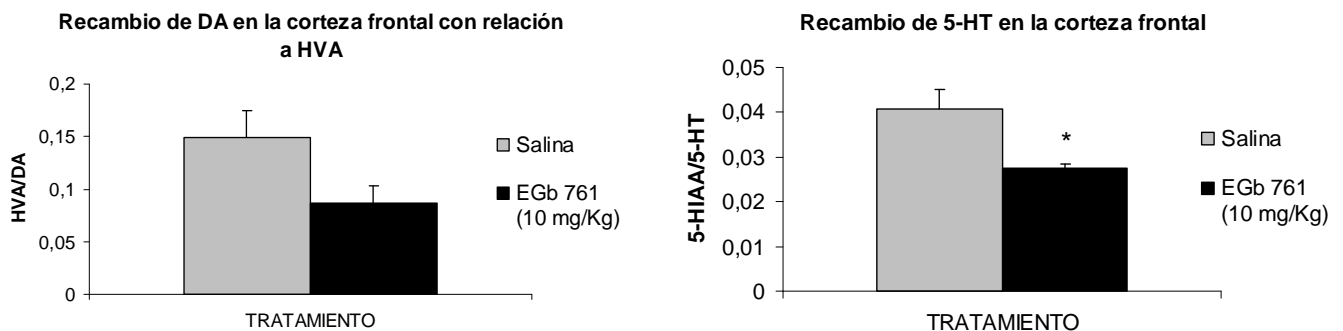


Figura 13. Recambio de DA y 5-HT en la corteza frontal de animales tratados con solución salina isotónica (i.p.) (n=15) o con EGb 761 (10 mg/Kg, i.p.) (n=17) durante 17 días previos a la prueba de nado forzado. Los resultados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con una prueba *t* de Student. * $P<0.05$ con respecto al grupo control. EGb: Extracto de *Ginkgo biloba*; HVA: ácido homovalínico; DA: dopamina; 5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético; 5-HT: serotonina.

En el cuerpo estriado (figura 14) no se observó una diferencia significativa en el recambio de DA entre los dos grupos experimentales. Por otro lado, se observó un incremento significativo ($P<0.001$) del 290% en el recambio de 5-HT en el grupo tratado con EGb 761 con respecto al grupo control.

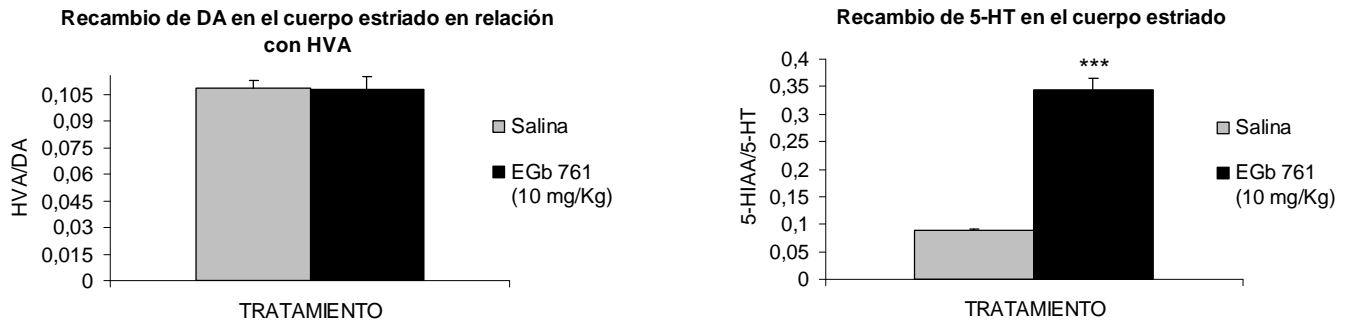


Figura 14. Recambio de DA y 5-HT en el cuerpo estriado de animales tratados con solución salina isotónica (i.p.) (n=15) o con EGb 761 (10 mg/Kg, i.p.) (n=17) durante 17 días previos a la prueba de nado forzado. Los resultados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con una prueba t de Student. *** $P<0.001$ con respecto al grupo control. EGb: Extracto de *Ginkgo biloba*; HVA: ácido homovalínico; DA: dopamina; 5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético; 5-HT: serotonina.

En el hipocampo (figura 15) se observó un incremento significativo ($P<0.01$) del 62% en el recambio de DA en el grupo tratado con EGb 761 con respecto al grupo control. En el recambio de 5-HT no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales.

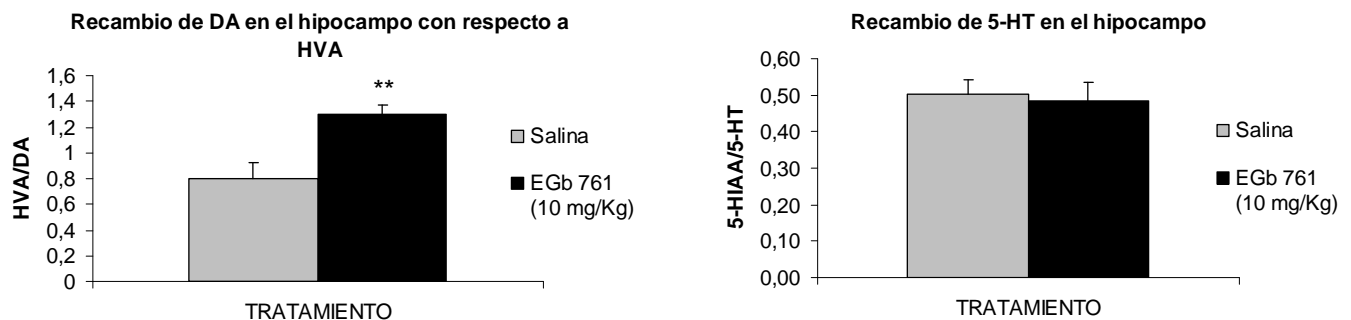


Figura 15. Recambio de DA y 5-HT en el hipocampo de animales tratados con solución salina isotónica (i.p.) (n=15) o con EGb 761 (10 mg/Kg, i.p.) (n=17) durante 17 días previos a la prueba de nado forzado. Los resultados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con una prueba t de Student. ** $P<0.01$ con respecto al grupo control. EGb: Extracto de *Ginkgo biloba*; HVA: ácido homovalínico; DA: dopamina; 5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético; 5-HT: serotonina.

En el hipotálamo (figura 16) se encontró una disminución significativa ($P<0.05$) en el recambio de DA del 43.3% en el grupo tratado con EGb 761 con respecto al grupo control. La disminución en el recambio de 5-HT en el grupo tratado con EGb 761 no fue significativa.

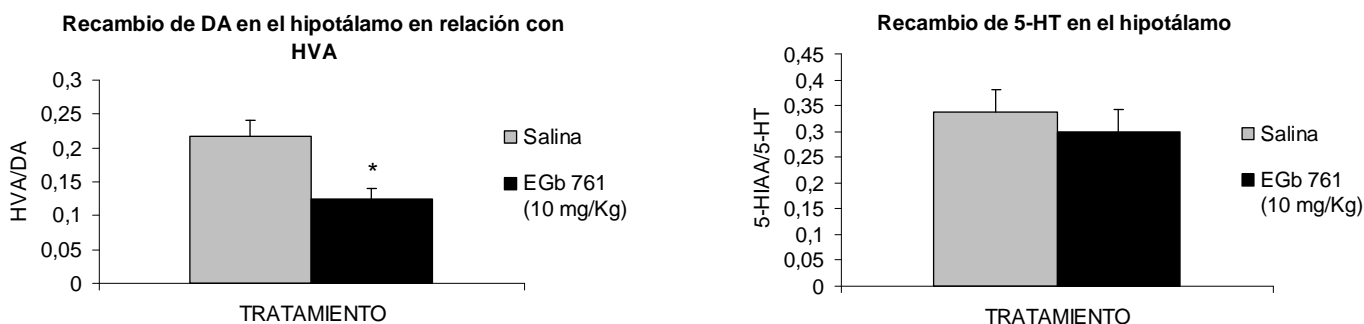


Figura 16. Recambio de DA y 5-HT en el hipotálamo de animales tratados con solución salina isotónica (i.p.) (n=15) o con EGb 761 (10 mg/Kg, i.p.) (n=17) durante 17 días previos a la prueba de nado forzado. Los resultados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con una prueba *t* de Student. * $P<0.05$ con respecto al grupo control. EGb: Extracto de *Ginkgo biloba*; HVA: ácido homovalínico; DA: dopamina; 5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético; 5-HT: serotonina.

La figura 17 muestra los resultados para el recambio de DA y 5-HT en el mesencéfalo de ambos grupos experimentales. Se observó un incremento significativo ($P<0.05$) en el recambio de DA del 42.4% en el grupo tratado con EGb 761 con respecto al grupo control. En contraste, hubo una disminución significativa ($P<0.01$) del 24.8% en el recambio de 5-HT en el grupo tratado con EGb 761 con respecto al grupo control.

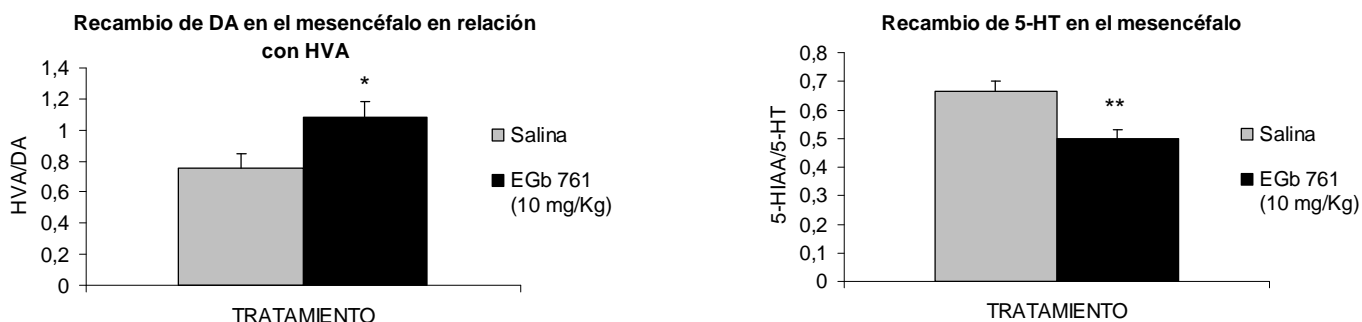


Figura 17. Recambio de DA y 5-HT en el mesencéfalo de animales tratados con solución salina isotónica (i.p.) (n=15) o con EGb 761 (10 mg/Kg, i.p.) (n=17) durante 17 días previos a la prueba de nado forzado. Los resultados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con una prueba *t* de Student. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ con respecto al grupo control. EGb: Extracto de *Ginkgo biloba*; HVA: ácido homovalínico; DA: dopamina; 5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético; 5-HT: serotonina.

Los resultados correspondientes a la actividad enzimática de SOD total se presentan en la figura 18; el grupo tratado con EGb 761 mostró un aumento significativo ($P<0.05$) del 20.3% en la actividad de la enzima SOD total en el hipocampo en comparación con el grupo control. Por otro lado, en la corteza frontal se observó una disminución significativa ($P<0.01$) del 19.1% en la actividad de esta misma enzima en el grupo tratado con EGb 761 respecto al grupo control. Las diferencias observadas entre los dos grupos experimentales en el cerebelo, cuerpo estriado, hipotálamo y mesencéfalo no resultaron significativas.

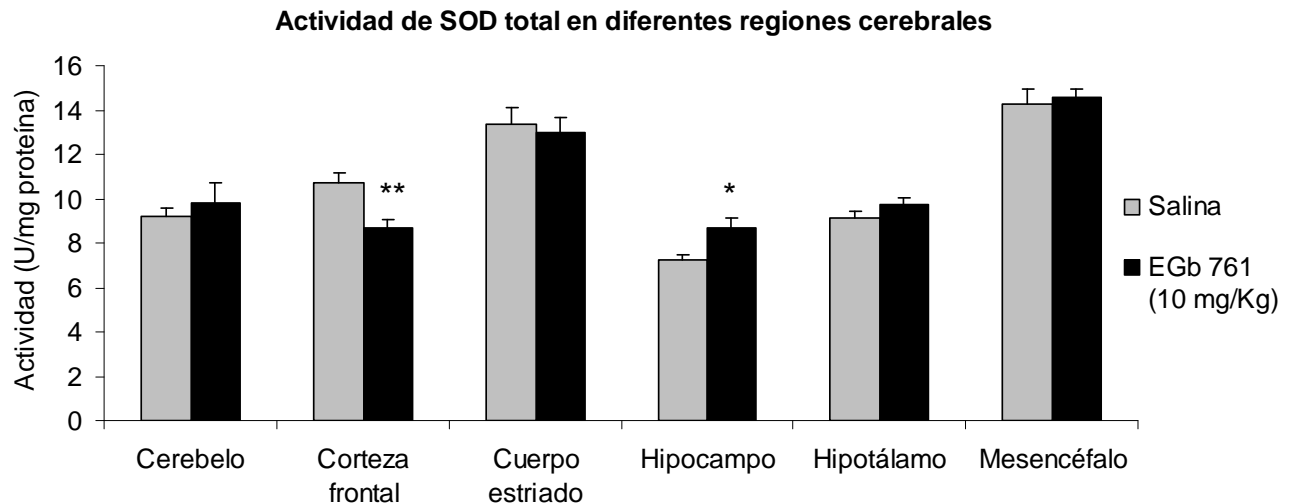


Figura 18. Actividad de la SOD total en el cerebelo, la corteza frontal, el cuerpo estriado, el hipocampo, el hipotálamo y el mesencéfalo de animales que recibieron solución salina isotónica (i.p.) ($n=13$) o EGb 761 (10 mg/Kg, i.p.) ($n=13$) durante 17 días previos a la prueba de nado forzado. Los datos presentados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas mediante una prueba t de Student. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ con respecto al grupo control. EGb: Extracto de *Ginkgo biloba*; SOD: superóxido dismutasa.

La figura 19 muestra la actividad de la enzima GPx en las 6 regiones cerebrales disectadas. Se observaron aumentos significativos ($P<0.05$ en ambos casos) en la actividad de esta enzima en la corteza frontal (16.9%) y en el hipotálamo (36.5%) del grupo tratado con EGb 761 en comparación con el grupo control. Por otro lado, en el cerebelo y en el mesencéfalo se presentaron disminuciones significativas ($P<0.01$ en ambos casos) del 33% y 29.6% respectivamente en la actividad de la enzima GPx. En el cuerpo estriado y en el hipocampo los cambios observados no fueron significativos.

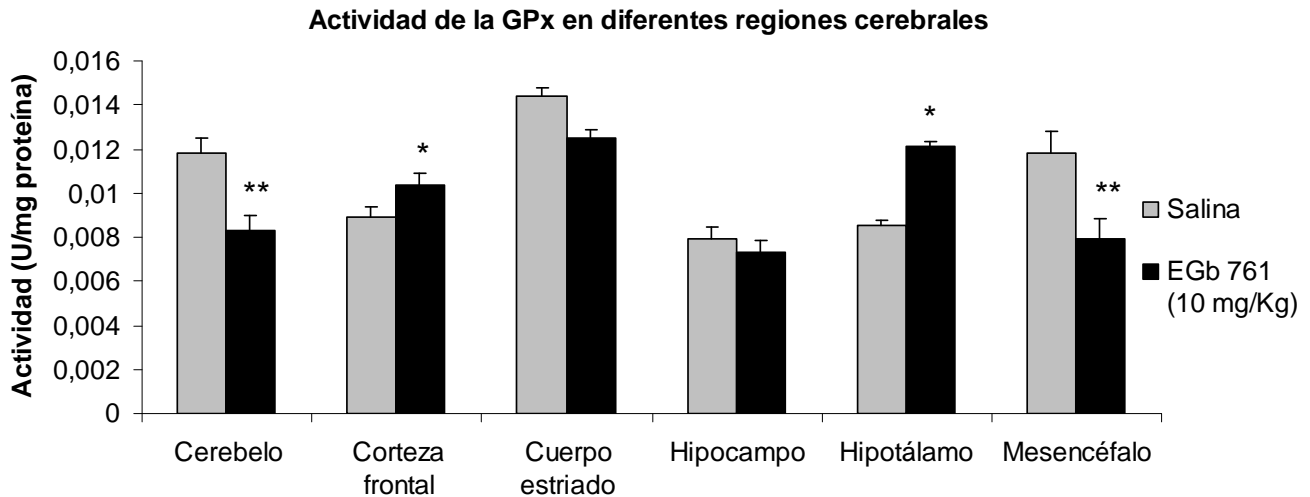


Figura 19. Actividad de la enzima GPx en el cerebelo, la corteza frontal, el cuerpo estriado, el hipocampo, el hipotálamo y el mesencéfalo de animales tratados con solución salina isotónica (i.p.) (n=8) o con EGb 761 (10 mg/Kg, i.p.) (n=5) durante 17 días previos a la prueba de nado forzado. Los resultados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con una prueba *t* de Student. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto al grupo control. EGb: Extracto de *Ginkgo biloba*; GPx: glutatión peroxidasa.

En la figura 20 se presentan los resultados obtenidos para la actividad de la enzima GRed. El único cambio significativo ($P < 0.01$) puede observarse en el hipocampo, en donde se presentó una disminución del 12.6% en la actividad enzimática del grupo tratado con EGb 761 en comparación con la actividad observada en el grupo control. En el resto de las regiones cerebrales analizadas no se observaron cambios significativos entre los dos grupos analizados.

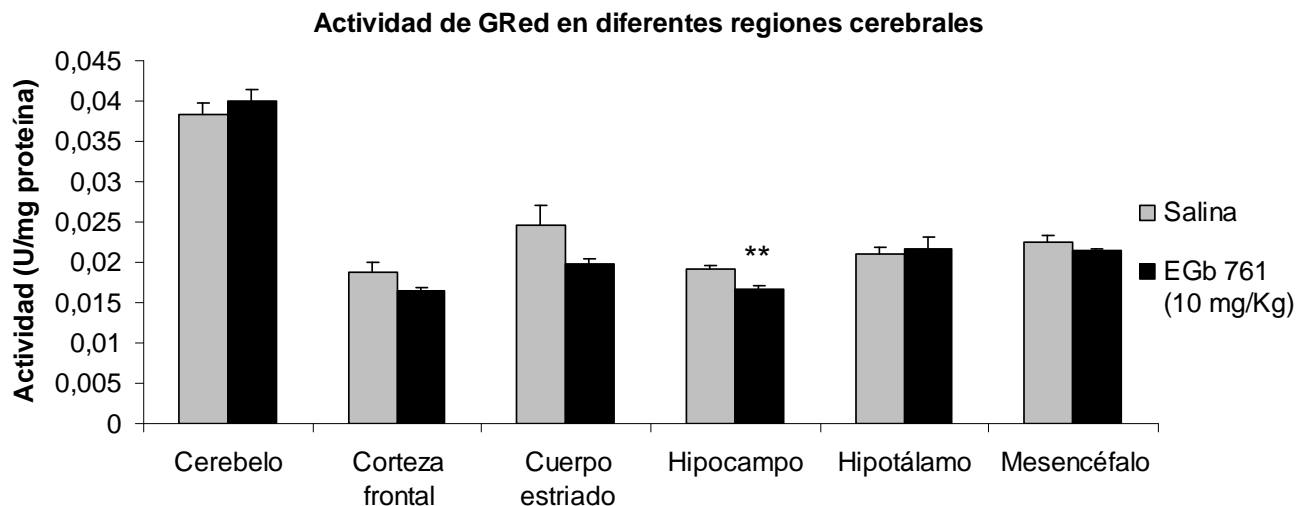


Figura 20. Actividad de la enzima GRed en el cerebelo, la corteza frontal, el cuerpo estriado, el hipocampo, el hipotálamo y el mesencéfalo de animales tratados con solución salina isotónica (i.p.) (n=8) o con EGb 761 (10 mg/Kg, i.p.) (n=5) durante 17 días previos a la prueba de nado forzado. Los resultados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con una prueba *t* de Student. ** $P < 0.01$ con respecto al grupo control. EGb: Extracto de *Ginkgo biloba*; GRed: glutatión reductasa.

La medición de un posible cambio en la cantidad de las enzimas MnSOD y CuZnSOD como resultado de la administración de EGb 761 se evaluó mediante la técnica de western-blot. En la tabla 1 se observa un aumento significativo ($P<0.05$) del 5% en la cantidad de MnSOD en el mesencéfalo en el grupo tratado con EGb 761 en comparación con el control. En el cerebelo, la corteza frontal, el cuerpo estriado, el hipocampo y el hipotálamo se observó un incremento en la cantidad de esta enzima que no resultó significativo en todas las regiones analizadas, indicando una posible tendencia hacia el incremento en la cantidad de esta enzima.

Con respecto a la enzima CuZnSOD, en el hipotálamo se presentó un aumento significativo ($P<0.01$) del 18.8% en la cantidad de esta enzima en el grupo tratado con EGb 761 en comparación con el grupo control. En el cerebelo, la corteza frontal, el cuerpo estriado, el hipocampo y el mesencéfalo no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos.

La figura 21 muestra que la única diferencia significativa ($P<0.05$) entre los dos grupos corresponde a una disminución del 27.47% en la cantidad de MDA en el grupo tratado con EGb 761 en comparación con el grupo control. En el cerebelo, la corteza frontal, el hipocampo, el hipotálamo y el mesencéfalo no se observaron diferencias significativas en la cantidad de MDA entre los dos grupos.

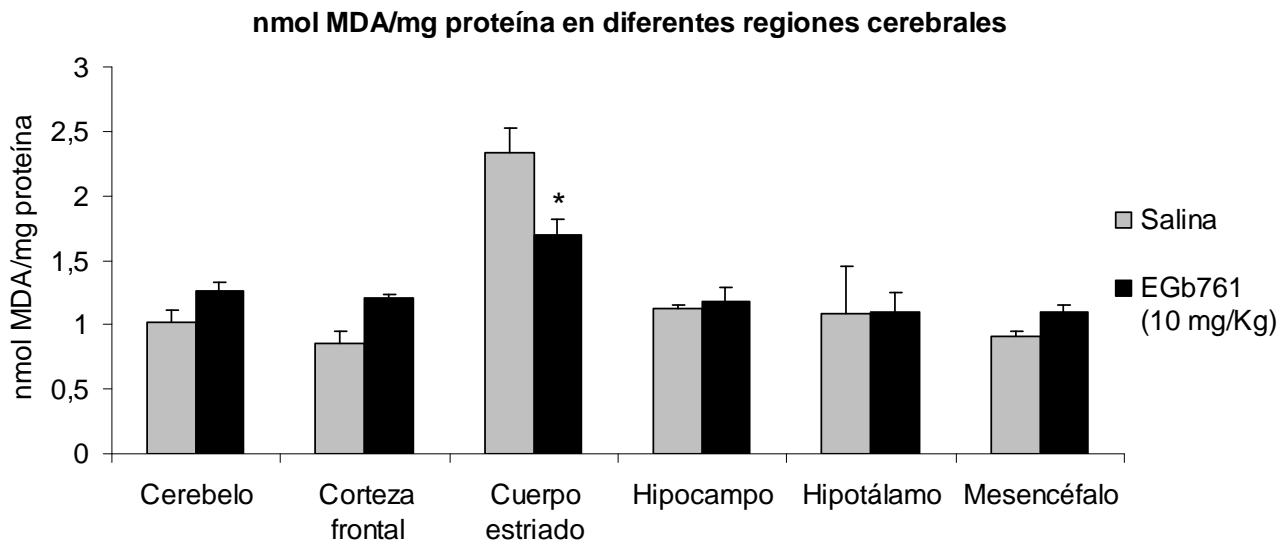


Figura 21. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en el cerebelo, la corteza frontal, el cuerpo estriado, el hipocampo, el hipotálamo y el mesencéfalo de animales tratados con solución salina isotónica (i.p.) ($n=5$) y con EGb 761 (10 mg/Kg, i.p.) ($n=5$) durante 17 días previos a la prueba de nado forzado. Los resultados corresponden a la media \pm EEM. Las diferencias fueron analizadas con una prueba t de Student. * $P<0.05$ con respecto al grupo control. EGb: Extracto de *Ginkgo biloba*; MDA: malondialdehído.

Tabla 1. Análisis densitométrico de western-blot de las enzimas MnSOD y CuZnSOD en las 6 regiones cerebrales del grupo control y del grupo tratado con EGb 761

Enzima	Región cerebral	Grupo control (cantidad en %)	EGb 761 (10 mg/Kg, i.p) (cantidad en % respecto al grupo control)
MnSOD	Cerebelo	100.000± 5.046	107.770± 3,927
	Corteza frontal	100.000± 5,062	107.214± 2,687
	Cuerpo estriado	100.000± 1,178	108.281± 4,730
	Hipocampo	100.000± 4,994	109,762± 5,637
	Hipotálamo	100.000± 2,244	103.839± 3,255
	Mesencéfalo	100.000± 1,438	104.963± 1,072*
CuZnSOD	Cerebelo	100.000± 3,791	103.317± 2,195
	Corteza frontal	100.000± 4,298	96.314± 2,846
	Cuerpo estriado	100.000± 1,374	104.722± 1,704
	Hipocampo	100.000± 3,364	95.214± 3,451
	Hipotálamo	100.000± 1,567	118.799± 4,235**
	Mesencéfalo	100.000± 0,976	104.604± 2,764

Los animales utilizados recibieron solución salina isotónica (i.p.) (n=3) o EGb 761 (10 mg/Kg, i.p) (n=3) durante 17 días previos a la prueba de nado forzado. Los resultados presentados corresponden a la media ± EEM. Las diferencias fueron analizadas con una prueba *t* de Student. **P*<0.05, ***P*<0.01 con respecto al grupo control. MnSOD: superóxido dismutasa dependiente de manganeso; CuZnSOD: superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc; EGb: extracto de *Ginkgo biloba*

11. DISCUSIÓN

En años recientes se ha demostrado que la depresión es una enfermedad sumamente compleja que no puede ser explicada únicamente en términos de una neurotransmisión monoaminérgica deteriorada, sino que es el resultado de la interacción de varios factores, entre ellos los ambientales y los inherentes al organismo (Malberg y Blendy, 2005).

La principal estrategia que se ha seguido en el tratamiento de la depresión consiste en normalizar la función monoaminérgica mediante manipulaciones farmacológicas cuya aplicación práctica ha derivado en el desarrollo de tratamientos parcialmente eficaces que no garantizan la desaparición de los síntomas propios de la enfermedad y que causan efectos no deseados en el paciente. En vista de lo anterior, es necesario explorar nuevas alternativas para el tratamiento de la depresión que sean más efectivas y más seguras.

Se ha reportado que la depresión se acompaña de un importante desequilibrio en las defensas antioxidantes como resultado de la aparición de estrés oxidativo en el organismo (Sarandol et al., 2007), un hallazgo que es el soporte principal de la teoría que propone a este tipo de estrés como origen de la depresión.

En este trabajo se presenta al EGb 761, un extracto de composición estandarizada de las hojas del árbol de *Ginkgo biloba* con diversos efectos benéficos en las enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central, con un amplio margen de seguridad y con efectos adversos de muy poca gravedad como una potencial alternativa para el tratamiento de la depresión. Adicionalmente, se sabe que el EGb 761 posee propiedades antioxidantes que han sido ampliamente documentadas y que tiene efectos benéficos en la mejora del estado de ánimo (Smith y Luo, 2004; DeFeudis, 1998).

Recientemente la capacidad antidepresiva de un extracto de las hojas del árbol de *Ginkgo biloba* de composición similar al EGb 761 fue evaluada por Sakakibara y sus colaboradores (2006) en la prueba de nado forzado (PNF); este extracto fue administrado oralmente una vez al día durante 14 días previos a la PNF a una dosis de 10 mg/Kg por vía oral. El extracto utilizado produjo un efecto antidepresivo similar en la PNF al producido por el antidepresivo imipramina administrado oralmente a la dosis de 15 mg/Kg. Sin embargo, en este último estudio no se hizo referencia a las áreas cerebrales involucradas en la respuesta antidepresiva ni al efecto que tiene este extracto sobre las monoaminas neurotransmisoras y sobre las enzimas antioxidantes.

Para evaluar el efecto antidepresivo del EGb 761 se utilizó la PNF, un modelo de la depresión desarrollado por Porsolt y sus colaboradores en 1977 que ha sido validado y utilizado ampliamente en el desarrollo de varios antidepresivos (Cryan y Holmes, 2005; Detke et al., 1995; Porsolt et al., 1978).

La PNF requiere de la administración previa del compuesto a evaluar, y en el caso del EGb 761 la dosis de 10 mg/Kg administrada durante 17 días en pretratamiento se eligió considerando que esta dosis bajo la misma modalidad de administración fue capaz de prevenir la peroxidación de lípidos originada en el cuerpo estriado de ratones por la neurotoxina MPP⁺ (Rojas et al., 2001). Adicionalmente, los resultados obtenidos por Sakakibara y sus colaboradores (2006) fueron considerados como un criterio más para la selección de la dosis a utilizar tanto de EGb 761 como de imipramina, un fármaco que produce un efecto antidepresivo detectable en esta prueba y que se ha reportado como referencia a la dosis de 15 mg/Kg en la PNF y en otros modelos experimentales de depresión (Dhingra y Sharma, 2006).

En la figura 7 puede observarse que el EGb 761 a la dosis de 10 mg/Kg por vía intraperitoneal (i.p.) administrado durante 17 días tiene un efecto antidepresivo en la PNF equivalente al observado para la imipramina administrada a una dosis de 15 mg/Kg, i.p. durante el mismo periodo de tiempo.

En contraste, Porsolt y sus colaboradores (2000) reportaron que el EGb 761 carece de actividad antidepresiva en la PNF a las dosis de 50 y 100 mg/Kg cuando se administra oralmente una vez al día durante un pretratamiento de 5 días. Sakakibara atribuye la falta de actividad antidepresiva del EGb 761 a diferencias en la composición de los extractos utilizados debidas a los procesos de obtención (Sakakibara et al., 2006).

Los resultados que se presentan en la figura 7 coinciden con los resultados obtenidos por Sakakibara y sus colaboradores (2006), demostrando que las posibles variaciones en la composición de los extractos no afecta el resultado observado en la PNF en donde una variable de mayor impacto en la prueba es la duración del pretratamiento.

Al respecto, Cryan y sus colaboradores (2005) han demostrado que el efecto antidepresivo de los fármacos utilizados para el tratamiento de la depresión se evidencia luego de un periodo de administración de entre 4 y 6 semanas; por otro lado, Montgomery (1995) sugiere que un pretratamiento con una duración mínima de 14 días es un periodo de tiempo confiable para demostrar una eficacia antidepresiva detectable con la mayoría de los antidepresivos convencionales. Los criterios anteriores indican que el pretratamiento durante

17 días es suficiente para observar un efecto antidepresivo en la PNF y los resultados mostrados en la figura 7 demuestran que el EGb 761 tiene un efecto antidepresivo equiparable al efecto producido por la imipramina en esta prueba.

Se ha reportado que en respuesta a un estresor agudo (como la PNF) se presenta un aumento en la liberación de monoaminas que puede acompañarse de un incremento en el recambio de estos neurotransmisores causando estrés oxidativo (Pajović et al., 2006). Este tipo de estrés es particularmente nocivo al tejido cerebral, debido a que el cerebro posee una capacidad antioxidante limitada en comparación con otros tejidos y una elevada cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que pueden sufrir reacciones de peroxidación de lípidos (Lucca et al., 2009; Cruz-Aguado, 2001). Por esta razón, en este trabajo se evaluó el recambio de las monoaminas en el grupo control y en el grupo tratado con EGb 761 de manera conjunta con la actividad de las enzimas antioxidantes y con la peroxidación de lípidos.

La PNF produce cambios neuroquímicos en el cerebro que son dependientes de la región cerebral bajo análisis (Connor et al., 1997). En el análisis de monoaminas puede observarse que el efecto de la PNF y de la administración de EGb 761 es distinto en cada región cerebral analizada probablemente debido a que cada una de ellas responde de manera diferente al estímulo estresante producido por la prueba y a que este extracto no se distribuye en el cerebro de manera homogénea (Moreau et al., 1986).

En la corteza frontal, el hipotálamo (sólo para el recambio de DA) y el mesencéfalo (sólo para el recambio de 5-HT) (figuras 13, 16 y 17) puede observarse una disminución en el recambio de DA y 5-HT en el grupo que fue tratado con EGb 761 en comparación con el grupo control. La disminución en el valor de recambio indica que el EGb 761 causó un aumento en la cantidad de las correspondientes monoaminas en la corteza frontal y en el mesencéfalo (figuras 8 y 12); este incremento pudo ser causado por una disminución de la recaptura de estas monoaminas debido a la presencia del EGb 761, una propiedad de este extracto que ya había sido observada con anterioridad (Ramassamy 1992a; Taylor, 1990).

Se ha reportado que uno de los hallazgos más consistentes luego de la PNF es un incremento en el recambio de 5-HT en la corteza cerebral (Kelliher et al., 1998; Connor, et al., 1997) y en esta región la disminución en el recambio de 5-HT (figura 13) pudo deberse a que el EGb 761 causó una disminución de la recaptura de 5-HT, un fenómeno que se presenta cuando existen altas concentraciones de EGb 761 (Ramassamy 1992a; Taylor, 1990). De acuerdo con hallazgos reportados por Connor y sus colaboradores (2000), la disminución en el valor del recambio de 5-HT en la corteza se presenta con antidepresivos

como desipramina, paroxetina y venlafaxina, indicando que el EGb 761 en la corteza posiblemente tiene una acción antidepresiva similar a la reportada para estos fármacos.

De manera análoga que para la corteza frontal, en el mesencéfalo puede observarse que el EGb 761 causa una importante disminución en la recaptura de 5-HT (figura 12) sin que se presenten alteraciones en el metabolismo de esta monoamina.

Por otro lado, la disminución en el recambio de DA en el hipotálamo en el grupo tratado con EGb 761 (figura 16) fue causada por una disminución significativa en la cantidad de HVA en este mismo grupo sin que hubiera cambios entre los dos grupos en la cantidad de DA (figura 11). Este hallazgo sugiere que este extracto causó una disminución del metabolismo de DA mediante la inhibición de la actividad enzimática de MAO, un fenómeno reportado con anterioridad por algunos grupos de investigación (Rojas et al., 2004; Sloley et al., 2000; Wu y Zhu 1999).

En el cuerpo estriado (solo para el recambio de 5-HT), en el hipocampo (solo para el recambio de DA) y en el mesencéfalo (solo para DA) se observaron incrementos en el recambio de monoaminas en el grupo tratado con EGb 761 en comparación con el grupo control (figuras 14, 15 y 17).

El incremento en el recambio de 5-HT en el cuerpo estriado del grupo tratado con EGb 761 se debió a la reducción significativa en la cantidad de 5-HT y a un incremento en la cantidad de 5-HIAA como puede observarse en la figura 9, indicando que en esta región el extracto favoreció un aumento en la recaptura de esta monoamina y que este aumento intraneuronal de 5-HT estimuló el metabolismo de este neurotransmisor generando una mayor cantidad de 5-HIAA. Esta propiedad del EGb 761 de aumentar selectivamente la recaptura de 5-HT sin afectar a otras monoaminas ya se había reportado con anterioridad en estudios hechos en cultivos neuronales (Ramassamy et al., 1992a; Taylor et al., 1991; Taylor, 1990).

En el hipocampo se observó un incremento no significativo en la cantidad de HVA en el grupo tratado con EGb 761 indicando que posiblemente el extracto causa un aumento en la recaptura de DA que estimula el metabolismo intraneuronal de esta monoamina causando una mayor producción de HVA como se observa en la figura 10. Por otro lado, en la figura 15 se observa que el recambio de 5-HT en esta región no tuvo diferencias significativas entre los dos grupos experimentales debido a que no hubo diferencias en las cantidades de 5-HT y 5-HIAA entre los dos grupos.

De forma análoga que en el hipocampo, el incremento en el recambio de DA en el mesencéfalo del grupo tratado con EGb 761 (figura 17) puede explicarse de la misma manera, ya que en la figura 12 también se observa un incremento en la cantidad de HVA.

Por otro lado, se sabe que la PNF es capaz de provocar la aparición de estrés oxidativo (Pedrenaez et al., 2006) y que este tipo de estrés puede ser en gran medida responsable de la aparición de depresión (Sarandol et al., 2007).

La SOD es una de las enzimas que se encargan prevenir la aparición de estrés oxidativo mediante la eliminación del radical superóxido (Kumar et al., 2005). Se sabe que el incremento en la cantidad de especies pro-oxidantes como OH^{\bullet} y H_2O_2 que son generados por la PNF puede causar un daño a la enzima causando la pérdida de su funcionalidad (Pedrenaez et al., 2006; Pigolet et al., 1990). En la figura 18 se observa un aumento significativo en la actividad de la enzima SOD total en el hipocampo del grupo tratado con EGb 761 y una disminución de la actividad de esta enzima en la corteza frontal en el mismo grupo, ambos cambios con respecto al grupo control. El aumento en la actividad de SOD total en el hipocampo del grupo tratado con EGb 761 puede deberse a que el extracto evitó un daño estructural a la enzima debido al estrés oxidativo generado por la PNF. Esta prevención del daño estructural se vio reflejada en el incremento en la actividad que se observa en el hipocampo del grupo tratado con EGb 761 (figura 18).

Adicionalmente, se esperaba que al incrementarse la actividad de la enzima SOD total en el hipocampo del grupo tratado con EGb 761 (figura 18), de manera conjunta se presentara un incremento en la actividad de GPx para evitar la acumulación de H_2O_2 , la especie que se origina como resultado de la actividad de la enzima SOD (figura 19) (Lucca et al., 2009). Sin embargo, el incremento en la actividad de la SOD total en el hipocampo del grupo tratado con EGb 761 no se acompañó de un incremento de la actividad de GPx en esta misma región y en el mismo grupo, de manera que es posible que el extracto participara anticipadamente en la eliminación del H_2O_2 , una actividad que se había reportado anteriormente para el EGb 761 (Oyama et al., 1996).

La disminución de la actividad de SOD total en la corteza frontal del grupo tratado con EGb 761 (figura 18) posiblemente sea una consecuencia de la alta concentración de extracto presente en esta región, a la que se le ha atribuido la capacidad de actuar como un potente atrapador del anión superóxido (Oyama, et al., 1996; Pincemail et al., 1989) y es posible que el extracto se haya encargado de eliminar el radical superóxido que pudiera haberse generado como resultado de la PNF sin que fuera necesaria la activación de la enzima.

Por otro lado, se sabe que la principal defensa neuronal contra los efectos nocivos del H_2O_2 es la enzima GPx y sus elementos relacionados (Dringen, 2000). Un aumento en la actividad de esta enzima indica una elevación en la generación de H_2O_2 o de otros peróxidos orgánicos como resultado de la PNF y que la enzima está participando activamente en la eliminación de estas especies (Spasić et al., 1993).

El aumento en la actividad enzimática de GPx en la corteza frontal y en el hipotálamo del grupo tratado con EGb 761 (figura 19) en comparación con el grupo control puede deberse a que el EGb 761 protegió la integridad de esta enzima ante el incremento del estrés oxidativo generado por la PNF y que esta protección se reflejó en una actividad aumentada en respuesta al estrés oxidativo generado por la prueba de manera análoga a lo que ocurrió en la actividad de la enzima SOD total del hipocampo del grupo tratado con EGb 761.

En el mesencéfalo, el cuerpo estriado y en el hipocampo debió haberse presentado un incremento en la actividad de la enzima GPx en el grupo tratado con EGb 761, ya que en estas regiones hubo un aumento en el recambio de monoaminas, un fenómeno que causa una elevación en la generación de H_2O_2 debido a la actividad de la MAO (Pal y Dandiya, 1994).

Sin embargo, en las regiones antes mencionadas se observó un comportamiento opuesto al esperado (figura 19) posiblemente debido a que el extracto anticipadamente se encargó de eliminar el H_2O_2 generado por la actividad de la MAO (Pal y Dandiya, 1994). El estrés oxidativo generado por la prueba también pudo ser una fuente más de H_2O_2 que no requirió de la activación de la GPx debido a la presencia del EGb 761 y a su capacidad antioxidante. La disminución de la actividad de la enzima GPx en el cerebelo del grupo tratado con EGb 761 pudo deberse a acontecimientos semejantes a los que se presentaron en el mesencéfalo.

La figura 20 muestra que el único cambio en la actividad de la enzima GRed se presentó en el hipocampo del grupo tratado con EGb 761. Esta disminución de la actividad enzimática probablemente sea el reflejo de la ligera disminución que se observa en la actividad de la GPx del hipocampo del grupo tratado con EGb 761 (figura 19), ya que se sabe que la actividad de la GRed depende directamente de la producción de glutatión oxidado por parte de la GPx y al no producirse el sustrato de la enzima GRed, resulta lógico pensar que esta es la razón por la cual enzima disminuyó su actividad en el grupo tratado con EGb 761.

Cabe mencionar que diversos reportes indican que algunos antioxidantes (entre ellos los flavonoides) constituyen una fuente de estrés oxidativo como resultado de su

metabolismo y que alteran la actividad de enzimas antioxidantes como la GPx disminuyendo la cantidad de glutatión disponible como sustrato para esta enzima (Galato et al., 2002; Sahu y Gray, 1993). Se ha reportado que el EGb 761 no produce cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes analizadas, ya que en un reporte previo se demostró que la actividad de las enzimas CuZnSOD, MnSOD, GPx y GRed no es modificada por el extracto cuando se administra durante 18 días (Rojas et al., 2008).

Diversos reportes indican que las propiedades antioxidantes del EGb 761 no se deben sólo a sus componentes, sino que adicionalmente éstos favorecen la expresión de genes a través de complejas interacciones y en algunos casos a través de las acciones de sus componentes farmacológicamente activos (DeFeudis, 2002).

Algunos de los genes que aumentan su expresión por la acción del EGb 761 son los que codifican para la síntesis de enzimas antioxidantes como la MnSOD y la hemooxigenasa-1 entre otras enzimas (Gohil y Packer, 2002). En la tabla 1 se observa que en la cantidad de MnSOD existe una tendencia en todas las regiones que apunta hacia un aumento en la producción de esta proteína.

Esta tendencia de aumento en la cantidad de MnSOD no se observa para CuZnSOD; al respecto se sabe que estas dos enzimas son distintamente reguladas por el EGb 761 en cultivos neuronales (Soulié et al., 2002) indicando que el EGb 761 preferentemente favorece la expresión de MnSOD.

La peroxidación de lípidos se genera por la aparición de estrés oxidativo y se evidencia mediante la cuantificación de especies que se producen como resultado de su efecto nocivo como el MDA. En la figura 21 se observa que en el cuerpo estriado del grupo tratado con EGb 761 se presentó una disminución significativa en la cantidad de MDA en comparación con el grupo control. En esta región se esperaba un incremento en la cantidad de MDA debido al dramático aumento en el recambio de 5-HT causado por el EGb 761 en esta región. La disminución en la cantidad de MDA puede deberse a que el extracto previno la aparición de peróxidos lipídicos al atrapar a las especies oxidantes involucradas en su formación.

Finalmente, la figura 7 muestra claramente que el EGb 761 ejerce un efecto antidepresivo evaluado en la PNF. Sin embargo, este trabajo no fue diseñado para identificar al componente responsable de este efecto.

La actividad antidepresiva observada en la prueba puede deberse a un solo componente del extracto o puede ser el resultado de la acción de dos o más componentes

que pueden actuar de diversas maneras. Al respecto se sabe que el relativamente bajo peso molecular de los flavonoides y terpenoides presentes en el extracto facilita su paso a través de la barrera hematoencefálica (DeFeudis y Drieu, 2000) y por lo tanto el efecto antidepresivo del EGb 761 puede deberse a la acción de alguna de estas especies actuando sola o en combinación con otras.

Los hallazgos de este trabajo permiten evidenciar que las monoaminas de las regiones cerebrales estudiadas tienen un comportamiento diferente ante el estrés provocado por la PNF y responden de manera distinta a la combinación de la prueba y la administración de EGb 761. Los resultados mostrados en las figuras 18, 19 y 20 muestran que el EGb 761 es capaz de modificar la actividad de las enzimas bajo estudio, y en particular se observa que los mayores cambios se presentan en la actividad de la enzima SOD y GPx.

Una regulación de la actividad monoaminérgica regional (que se observó como una inhibición de la recaptura de monoaminas y una posible inhibición de su metabolismo en algunas regiones), la regulación regional de la actividad de las enzimas antioxidantes estudiadas, la regulación de la producción de enzimas antioxidantes como MnSOD y la prevención regional de la peroxidación de lípidos actuando en conjunto parecen ser las propiedades del EGb 761 responsables del efecto antidepresivo observado en la PNF. El mecanismo exacto mediante el cual el extracto ejerce su acción antidepresiva podría sujetarse a una investigación posterior.

La principal aportación de este trabajo fue demostrar que el EGb 761 actúa como antidepresivo en un modelo animal de la depresión. Este hallazgo puede ser el primer paso en el diseño de protocolos experimentales a realizarse en pacientes, ya que la seguridad del extracto se ha comprobado extensamente durante más de 25 años, un periodo en el cual el EGb 761 se ha utilizado extensamente en el tratamiento de diversas enfermedades.

12. CONCLUSIONES

- El EGb 761 administrado durante 17 días tiene un efecto antidepresivo comparable al producido por la imipramina en la prueba de nado forzado.
- El efecto antidepresivo del EGb 761 es el resultado de una compleja interacción entre el efecto causado en los sistemas monoaminérgicos y la regulación de las enzimas antioxidantes en las regiones analizadas.
- El EGb 761 es capaz de prevenir el incremento de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la prueba de nado forzado.
- El EGb 761 constituye una alternativa a que puede aplicarse y probarse de manera inmediata en pacientes que padecen depresión.

13. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

- Akiskal, H.S. *Mood disorders: introduction and overview*. En: *Comprehensive Textbook of Psychiatry*. New York, Sadock and V.A. Sadock Editions, Lippincott, Williams & Wilkins B.J., 2000. pp. 1284-1298.
- Angelucci, L. (2000) The glucocorticoid hormone: from pedestal to dust and back. *Eur J Pharmacol* 405: 139-147.
- Baek, B.S., Kwon, H.J., Lee, K.H., Yoo, M.A., Kim, K.W., Ikeno, J., Yu, B.P., Chung, H.Y. (1999) Regional difference of ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in rat brain and their dietary modulation. *Pharmacol Toxicol* 22 (4): 361-366.
- Bale, T.L., Contarino, A., Smith, G.W., Chan, R., Gold, L.H., Sawchenko, P.E., Koob, G.F., Vale, W.W. Lee, K.F. (2000) Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 24: 410-414.
- Barkats, M., Venault, P., Christen, Y., Cohen-Salmon, C. (1995) Effect of long-term treatment with EGb 761 on age-dependent structural changes in the hippocampi of three inbred mouse strains. *Life Sci* 56: 213–222.
- Baynes, J.W., Dominiczak, M.H. *Bioquímica médica (2ª edición)*. España, Elsevier, 2007. pp. 510-511.
- BGA-Kommission E. (1994) Monographie: Trocknextrakt (35-67:1) aus Ginkgo-biloba-Blättern, extrahiert mit Aceton-Wasser. Bundesanzeiger (Banz.), No. 133, pp. 7361, July 19, 1994.
- Biber, A., Chaterjee, S.S. Pharmacokinetics of ginkgolides A, B and bilobalide after PO administration of *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in the rat. Internal report, Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co., Karlsruhe, 1995.
- Bilici, M., Efe, H., Koroglu, M.A., Uydu, H.A., Bekaroglu, M., Deger, O. (2001) Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord* 64: 43–51.
- Blendy, J.A. (2006) The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 59: 1144-1150.
- Boehm, S., Kubista, H. (2002) Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacol Rev* 54: 43–99.
- Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. (editors) Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (11th edition). USA, McGraw Hill, 2006. pp. 299.

- Buege, J.A., Aust, D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 51: 302-310.
- Bylund, D.B., Eikenberg, D.C., Hieble, J.P., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Molinoff, P.B., Ruffolo Jr., R.R., Trendelenburg, U. (1994) International Union of Pharmacology. Nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* 46: 121–136.
- Cadenas, S. Lertsiri, S., Otsuka, M., Barja, G., Miyazawa, T. (1996) Phospholipid hydroperoxides and lipid peroxidation products in liver and plasma of ODS rats supplemented with α -tocopherol and ascorbic acid. *Free Rad Res* 26: 485-493.
- Cairncross, K.D., Cox, B., Forster, C., Wren, A.F. (1978) A new model for the detection of antidepressants drugs: olfactory bulbectomy in the rats comparing to the existing models. *J Pharmacol Methods* 1: 131–143.
- Cameron H.A., Woolley, C.S., McEwen B.S., Gould E. (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56 (2): 337-344.
- Cardozo-Pelaez, F., Song, S., Parthasarathy, A., Hazzi, C., Naidu, K., Sanchez-Ramos, J. (1999) Oxidative DNA damage in the aging mouse brain. *Mov Disord* 14: 972-980.
- Carlberg, I., Mannervik, B. (1975) Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250: 5475-5480.
- Carlson, J.J., Farquhar, J.W., DiNucci, E., Ausserer, L., Zehnder, J., Miller, D., Berra, K., Hagerty, L., Haskell, W. (2007) Safety and efficacy of a *Ginkgo biloba*-containing dietary supplement on cognitive function, quality of life, and platelet function in healthy, cognitively intact older adults. *J Am Diet Assoc* 107: 422-432.
- Castrén, E. (2004) Neurotrophic effects of antidepressant drugs. *Curr Opin Pharmacol* 4: 58-64.
- Castrén, E., Voikar, V., Rantamäki, T. (2007) Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol* 7: 18-21.
- Chen, B., Dowlatshahi, D., MacQueen, G.M., Wang, J.F., Young, L.T. (2001) Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* 50: 260-265.
- Clement, H.W., Gemsa, D., Weseman, W. (1992) The effect of adrenergic drugs on serotonin metabolism in the nucleus *raphe dorsalis* of the rat, studied by in vivo voltammetry. *Eur J Pharmacol* 217: 43–48.
- Connor, T.J., Kelliher, P., Shen, Y., Harkin, A., Kelly, J.P., Leonard, B.E. (2000) Effect of subchronic antidepressant treatments on behavioral, neurochemical and endocrine changes in the forced-swim test. *Pharmacol Biochem Behav* 65 (4): 591-597.

- Connor, T.J., Kelly, J.P., Leonard, B.E. (1997) Forced swim test induced neurochemical, endocrine and immune changes in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 58: 961-968.
- Costa, E., Garattini, S., Valzelli, L. (1960) Interactions between reserpine, chlorpromazine, and imipramine. *Experientia* 16: 461–463.
- Cruz-Aguado, R., Almaguer-Melian, W., Días, C.M., Lorigados, M., Bergado, J. (2001) Behavioral and biochemical effects of glutathione depletion in the rat brain. *Brain Res Bull* 55 (3): 327-333.
- Cryan, J.F., Holmes, A. (2005) The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 4: 775–790.
- Cryan, J.F., Valentino, R.J., Lucki, I. (2005) Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 547–569.
- D’Almeida, V., Lobo, L.L., Hipolide, D.C., de Oliveira, A.C., Nobrega, J.N., Tufik, S. (1998) Sleep deprivation induces brain region-specific decreases in glutathione levels. *Neuroreport* 9: 2853-2856.
- D’Aquila, P.S., Peana, A.T., Panin, F., Grixoni, C., Cossu, M., Serra, G. (2003) Reversal of antidepressant-induced dopaminergic behavioural supersensitivity after long-term chronic imipramine withdrawal. *Eur J Pharmacol* 458 (1–2): 129–134.
- da Silva, A., Sitta, A., Gatto, A., Deon, M., Thomas, A., Oliveira, G., Landgraf, S., Gomez, R., Barros, H., Regla, C. (2007) Oxidative stress parameters in diabetic rats submitted to force swimming test: the clonazepam effect. *Brain Res* 1154: 137-143.
- Darlington, C.L., Smith, P.F., MacLennan, K. *Effects of Ginkgo biloba extract (EGb-761) on recovery from peripheral vestibular deafferentation (vestibular compensation)*. En: Papadopoulos, V., Drieu, K., Christen, Y. *Advances in Ginkgo biloba Research*, Vol. 6. Adaptive Effects of *Ginkgo biloba* Extract (EGb-761). Elsevier, Paris, 1997. pp. 47–58.
- DeFeudis, F.V. *Ginkgo biloba extract (EGb 761) from chemistry to the clinic*. Germany, Ullstein Medical, 1998.
- DeFeudis, F.V. (2002) Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on gene expression: possible relevance to neurological disorders and age-associated cognitive impairment. *Drug Dev Res* 57: 214–235.
- DeFeudis, F.V., Drieu, K. (2000) *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications. *Curr Drug Targets* 1: 25–58.

- Del Tredici, P. *Ginkgo biloba* L. En *Lexikon der Forstbotanik*. Ecomed, Landsberg, Germany, 1995.
- Detke, M.J., Rickels, M., Lucki, I. (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacol* 121: 66–72.
- Dhingra, D., Sharma, A. (2006) Antidepressant-like activity of *Glycyrrhiza glabra* L. in mouse models of immobility tests. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30(3): 449-454.
- DMSIV-TR. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV-TR. Washington D.C., American Psychiatric Press Association, 2000.
- 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, 668–678.
- Dillon, K.A., Gross-Isserhoff, R., Israeli, M., Biegon, A. (1991) Autoradiographic analysis of serotonin 5-HT_{1A} receptor binding in the human brain post-mortem: effects of age and alcohol. *Brain Res* 554: 56-64.
- DiRenzo, G. (2000) *Ginkgo biloba* and the central nervous system. *Fitoterapia* 71: S43-S47
- Drew, S., Davies, E. (2001) Effectiveness of *Ginkgo biloba* in treating tinnitus: double blind, placebo controlled trial. *BMJ* 322: 73–75.
- Dringen, R. (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62: 649-671.
- Eckart, K., Jahn, O., Radulovic, J., Radulovic, M., Blank, T., Stiedl, O., Brauns, O., Tezval, H., Zeyda, T., Spiess, J. (2002) Pharmacology and biology of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors. *Recept channels* 8: 163-177.
- Elhwuegi, A.S. (2004) Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 435-451.
- Eren, I., Naziroğlu, M., Demirdaş, A., Ömer, Ç., Uğuz, A.C., Altunbaşak, İ.Ö., Uz, E. (2007) Venlafaxine modulates depression-induced oxidative stress in brain and medulla of rat. *Neurochem Res* 32: 497-505.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine* 4 (11): 1313-1317.

- Ernst, E., Stevinson, C. (1999) *Ginkgo biloba* for tinnitus: a review. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 24: 164–167.
- Fields, T.A., Casey, P.J. (1997) Signaling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J* 321: 561–571.
- Foote, S.L., Bloom, F.E., Aston-Jones, G. (1983) Nucleus locus coeruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* 63: 844–914.
- Foster, S., Chongxi, Y. *Herbal emissaries*. Healing Arts Press, Rochester, Vermont, 1992.
- Fuller, R.W. (1980) Pharmacology of central serotonin neurons. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 20; 111–127.
- Galati, G., Sabzebari, O., Wilson, J.X., O'Brien, P.J. (2002) Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicol* 177: 91-104.
- Gamaro, G.D., Manoli, L.P., Torres, I.L.S., Silveira, R., Dalmaz, C. (2003) Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem Int* 42: 107-114.
- Ganong, W.F. *Fisiología médica (18ª edición)*. México, Editorial El Manual Moderno, 2001. pp. 286-289.
- Gaudineau, C., Beckerman, R., Welbourn, S., Auclair, K. (2004) Inhibition of human P450 enzymes by multiple constituents of the *Ginkgo biloba* extract. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 1072–1078.
- 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: 625-631.
- Gould E., Gross, C.G. (2002) Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci* 22 (3): 619-623.
- Gould, E., Reeves, A.J., Graziano, M.S.A., Gross C.G. (1999) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286 (54389): 548-552.
- Guinot, P. (1994) Clinical experience with platelet-activating factor antagonists. Past, present and near future. *Clin Rev Allergy* 12: 397–417.
- Gutman, D.A., Nemeroff, C.B. (2003) Persistent central nervous system effects on adverse early environment: clinical and preclinical studies. *Physiol behav* 79: 471-478.
- Hamilton, M. (1960) A rating scale for depression. *J Neurol Psychiatry* 23: 56-62.
- Hamilton, M. (1967) Development of a rating scale for primary depressive illness. *Br J Soc Clin Psychol* 6: 278-296.

- Hellerstein, D.J., Wallner, L., Cantillon, M., Maurer, M., Rosenthal, J., Yanowitch, P., Winston, A. (1996) Follow-up assessment of medication-treated dysthymia. *Prog Neuropsychopharmacol & Biol Psychiat* 20: 427-442.
- Hernández Rodríguez, M. *Tratado de nutrición*. España, Ediciones Díaz de Santos, 1999. pp. 318-319.
- Holsboer, F. (2000) The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacol* 23: 477-501.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F. (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.
- Huguet, F., Tarrade, T. (1992) α_2 adrenoreceptor changes during cerebral ageing. The effect of *Ginkgo biloba* extract. *J Pharm Pharmacol* 46: 316-318.
- Issing, W., Klein, P., Weiser, M. (2005) The homeopathic preparation Vertigoheel versus *Ginkgo biloba* in the treatment of vertigo in an elderly population: a double blinded, randomized, controlled clinical trial. *J Altern Complement Med* 11: 155–160.
- Iverson, L.L. *The Uptake and Storage of Noradrenaline in Sympathetic Nerves*. London, Cambridge Univ. Press, 1991.
- jnm.snmjournals.org (consultado el 10 de enero de 2009)
- Kalueff, A.V., Wheaton, M., Murphy, D.L. (2007) What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modelling of anxiety and depression. *Behav Brain Res* 179: 1–18.
- Katz, R.J. (1982) Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol Biochem Behav* 6: 965–968.
- Katz, R.J., Roth, K.A., Carroll, B.J. (1981) Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biochem Rev* 5: 247–251.
- Katzung, B.G. *Farmacología básica y aplicada (8ª edición)*. México, Manual Moderno, 2002. pp. 401-414.
- Kaushik, S., Kaur, J. (2003) Chronic cold exposure affects the antioxidant defence system in various rat tissues. *Clin Chim Acta* 333: 69-77.
- Kelliher, P., Connor, T.J., Kelly, J.P., Leonard, B.E. (1998) Novel correlates of re-uptake inhibitor activity in the rat forced swim test. *J Psychopharmacol Suppl.* 12: A12.

- Kirby, L.G., Chou-Green, J.M., Davis, K., Lucki, I. (1997) The effects of different stressors on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Res* 760: 218-230.
- Kishimoto, T., Radulovic, J., Radulovic, M., Lin, C.R., Schrick, C., Hooshmand, F., Hermanson, O., Rosenfeld, M.G., Spiess, J. (2000) Deletion of *Crhr2* reveals an anxiolytic role of corticotrophin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet* 24: 415-419.
- Kleijnen, J., Knipschild, P. (1992) *Ginkgo biloba*. *Lancet* 340: 1136–1139.
- Koch, E. (2005) Inhibition of platelet activating factor (PAF)-induced aggregation of human thrombocytes by ginkgolides: considerations on possible bleeding complications after oral intake of *Ginkgo biloba* extracts. *Phytomedicine* 12: 10-16.
- Koltei, M., Hosford, D., Guinot, P., Esanu, A., Braquet, P. (1991) PAF. A review of its effects, antagonists and possible future clinical implications (Part I). *Drugs* 42: 9–29.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. *Robbins & Cotran Patología humana (7ª edición)*. España, Elsevier, 2005. pp. 16-18.
- Lawrence, R.A. y Burke, R.F. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71: 952-958.
- Le Bars, P., Katz, M.M., Berman, N., Itil, T.M., Freedman, A.M., Schatzberg, A.F. (1997) A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of *Ginkgo biloba* for dementia. *J Am Med Assoc* 278: 1327–1332.
- Lester, H.A., Cao, Y., Mager, S. (1996) Listening to neurotransmitter transporters. *Neuron* 17: 807–810.
- Li, X.M., Chlan-Fourney, J., Juorio, A.V., Bennet, B.L., Shrikhande, S., Bowen, R.C. (2000) Antidepressants up regulate messenger RNA levels of the neuroprotective enzyme superoxide dismutase (SOD1). *J Psychiatry Neurosci* 25: 43-47.
- Liggett, S.B. *Molecular basis of alpha2-adrenergic receptor subtype regulation by agonist*. En: Lanier, S., Limbird, L. (Eds.). *Alpha2-Adrenergic Receptors: Structure, Function and Therapeutic Implications*. London, Harwood Academic Publishers, 1996. pp. 113–121.
- Lores Arnaiz, S., Travacio, M., Llesuy, S., Rodriguez de Lores Arnaiz, G. (1998) Regional vulnerability to oxidative stress in a model of experimental epilepsy. *Neurochem Res* 23: 1477-1483.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

- Lucca, G., Commin, C.M., Valvassori, S.S., Réus, G.Z., Vuolo, F., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Gavioli, E.C., Quevedo, J. (2009) Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int* 54: 358-362.
- MacLennan, K.M., Cynthia, L.D., Smith, P.F. (2002) The CNS effects of *Ginkgo biloba* extracts and ginkgolide B. *Prog Neurobiol* 67: 235-257.
- McArthur, R., Borsini, F. (2006) Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharmacol Biochem Behav* 84: 436-452.
- McEwen, B.S. (2001) Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Ann NY Acad Sci* 933: 265-277.
- Mahadevan, S., Park, Y. (2008) Multifaceted therapeutic benefits of *Ginkgo biloba* L.: chemistry, efficacy, safety and uses. *J Food Sci* 73 (1): R14-R19.
- Malberg, J.E., Blendy, J.A. (2005) Antidepressant action: to the nucleus and beyond. *Trends Pharmacol Sci* 26 (12): 631-638.
- Marcocci, L., Packer, L., Droy-Lefaix, M.T., Sekaki, A., Gardès-Albert, M. (1994) Antioxidant action of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Methods Enzymol* 46: 462-475.
- Masson, J., Sagne, C., Hamon, M., El Mestikawy, S. (1999) Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 51: 439-464.
- Maurer, K., Ihl, R., Dierks, T., Frölich, L. (1997) Clinical efficacy of *Ginkgo biloba* special extract EGb-761 in dementia of the Alzheimer type. *J Psychiatric Res* 31 (6): 645-655.
- McArthur, R., Borsini, F. (2006) Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharmacol Biochem Behav* 84: 436-452.
- Mitchell, P.J. (2005) Antidepressant treatment and rodent aggressive behaviour. *Eur J Pharmacol* 526: 147-162.
- Mix, J., Crews, W. Jr. (2002) A double-blind, placebo-controlled, randomized trial of *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in a sample of cognitively intact older adults: neuropsychological findings. *Hum Psychopharmacol* 17: 267-277.
- Mohutsky, M.A., Anderson, G.D., Miller, J.W., Elmer, G.W. (2006) *Ginkgo biloba*: evaluation of CYP2C9 drug interactions in vitro and in vivo. *Am J Ther* 13: 24-31.
- Mongeau, R., Blier, P., de Montigny, C. (1997) The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res Rev* 23: 145-195.
- Montgomery, S.A. (1995) Are 2-week trials sufficient to indicate efficacy? *Psychopharmacol Bull* 31: 41-44.

- Moreau, J.P., Eck, J., McCabe, J., Skinner, S. (1986) Absorption, distribution et élimination de l'extract marqué *Ginkgo biloba* chez le rat. *Presse Méd* 15 : 1458-1463.
- Müller, H.W., Haught, C.A., McNatt, J.M., Cui, K., Gaskell, S.J., Johnston, D.A., Willerson, J.T. (1995) Measurement of platelet-activating factor in a canine model of coronary thrombosis and in endarterectomy samples from patients with advanced coronary artery disease. *Circ Res* 77: 54–63.
- Neer, E.J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249–257.
- Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., Monteggia, L.M. (2002) Neurobiology of Depression. *Neuron* 34: 13-25.
- 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, 115-118.
- Nieder, M. *Pharmakokinetik der Ginkgo-Flavonole im plasma*. Münch. Med. Wochenschr. 1991. 133 (Suppl. 1), S61-S62.
- Oberley, L.W.S., Spitz, D.R. (1984) Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* 105: 457-464.
- Overmier, J.B., Seligman, M.E. (1967) Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *J Comp Physiol Psychol* 63: 28–33.
- Overstreet, D.H., Friedman, E., Mathe, A.A., Yadid, G. (2005) The Flinders Sensitive Line rat: a selectively bred putative animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 739–759.
- Oyama, Y., Chikahisa, L., Ueha, T., Kanemaru, K., Noda, K. (1996) *Ginkgo biloba* extract protects brain neurons against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Brain Res* 712: 349-352.
- Pajović, S.B., Pejić, S., Stojiljković, V., Gavrilović, Lj., Dronjak, S., Kanazir, D.T. (2006) Alterations in brain antioxidant enzyme activities and sympatho-adrenomedullary system of rats in response to different stress models. *Physiol Res* 55: 453-460.
- Pal, S.N., Dandiya, P.C. (1994) Glutathione as a cerebral substrate in depressive behaviour. *Pharmacol Biochem Behav* 48 (4): 845-851.
- Palermo-Neto, J. (1997) Dopaminergic systems and dopamine receptors. *Psychiatr Clin North Am* 20 (4): 705-721.

- Palmer, T.D., Markakis, E.A., Willhoite, A.R., Safar, F., Gage, F.H. (1999) Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 19: 8487-8497.
- Pedraza-Chaverri, J., Maldonado, P.D., Medina-Campos, O.N., Olivares-Corichi, I.M., Granados-Silvestre, M.A., Hernandez-Pando, M., Ibarra-Rubio, M.E. (2000) Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Rad Biol Med* 29: 602-611.
- Pedraza-Chaverri, A., Arcaya, J.L., Carrizo, E., Mosquera, J. (2006) Forced swimming test increases superoxide anion positive cells and angiotensin II positive cells in the cerebrum and cerebellum of the rat. *Brain Res Bull* 71: 18-22.
- Piñeyro, G., Blier, P. (1999) Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev* 51: 533–591.
- Pierre, S., Jamme, I., Droy-Lefaix, M.T., Nouvelot, A., Maixent, J.M. (1999) *Ginkgo biloba* extract (EGb-761) protects Na,K-ATPase activity during cerebral ischemia in mice. *Neuroreport* 10: 47–51.
- Pigolet, E., Corbisier, P., Houbion, A. (1990) Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase inactivation by peroxides and oxygen-derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 51: 283-287.
- Pincemail, J., Dupuis, M., Nasr, C., Hans, P., Haag-Berrurier, M., Anton, R., Deby, C. (1989) Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of *Ginkgo biloba* extract. *Experientia* 45: 708-712.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M. (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47: 379-391.
- Porsolt, R.D., Roux, S., Drieu, K. (2000) Evaluation of a *Ginkgo biloba* extract (EGb-761) in functional tests for monoamine oxidase inhibition. *Arzneim Forsch Drug Res* 50 (1): 232-235.
- Porsolt, R.D., Le Pinchon, M., Jalfre, M. (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266: 730–732.
- Rai, G.S., Shovlin, C., Wesnes, K.A. (1991) A double-blind, placebo controlled study of *Ginkgo biloba* extract ('Tanakan') in elderly outpatients with mild to moderate memory impairment. *Curr Med Res Opin* 12: 350-355.

- Ramassamy, C., Christen, Y., Clostre, F., Costentin, J. (1992a) The *Ginkgo biloba* extract, EGb 761, increases synaptosomal uptake of 5-hydroxytryptamine: In-vitro and ex-vivo studies. *J Pharm Pharmacol* 44: 943-945.
- Ramassamy, C., Clostre, F., Christen, Y., Costentin, J. (1992b) In vivo *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects against neurotoxic effects induced by MPTP: investigations into its mechanism(s) of action. En *Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on the central nervous system*. Elsevier, Paris. pp. 27-36.
- Ramassamy, C., Longpré, F., Christen, Y. (2007) *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) in Alzheimer's disease: Is there any evidence? *Curr Alz Res* 4: 253-262.
- Ramassamy, C., Naudin, B., Christen, Y., Clostre, F., Costentin, J. (1992c) Prevention by *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and trolox C of the decrease in synaptosomal dopamine or serotonin uptake after following incubation. *Biochem Pharmacol* 44: 2395-2401.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K. *Farmacología (5ª edición)*. España, Elsevier, 2004. pp. 161-196, 535-549.
- Renard, C.E., Dailly, E., David, D.J.P., Hascoet, M., Bourin, M. (2003) Monoamine metabolism changes following the mouse forced swimming test but not the tail suspension test. *Fund Clin Pharmacol* 17: 449-455.
- Rice-Evans, C., Burdon, R. (1993) Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* 32 (1): 71–110.
- 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: 1245-1251.
- Rojas, P., Rios, C. (1993) Increased striatal lipid peroxidation after intracerebroventricular MPP+ administration to mice. *Pharmacol Toxicol* 72: 364-368.
- Rojas, P., Rojas, C., Ebadi, M., Montes, S., Monroy-Noyola, A., Serrano-Garcia, N. (2004) EGb 761 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-Sámano, J.J., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverri, J., Ögren, S.V. (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.
- Rosenblatt, M., Mindel, J. (1997) Spontaneous hyphema associated with ingestion of *Ginkgo biloba* extract (letter). *N Engl J Med* 336: 1108.

- Rupniak, N.M. (2003) Animal models of depression: challenges from a drug development perspective. *Behav Pharmacol* 14: 385–390.
- Şahin, E., Gümüşlü, S. (2004) Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behav Brain Res* 155: 241-248.
- Sahu, S.C., Gray, G.C. (1996) Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett* 104: 193-196.
- Sakakibara, H., Ishida, K., Grundman, O., Hakajima, J., Seo, S., Butterweck, V., Minami, Y., Kawai, Y., Nakaya, Y., Terao, J. (2006) Antidepressant effect of extracts from *Ginkgo biloba* leaves in behavioral models. *Biol Pharm Bull* 29 (8): 1767-1770.
- Sarandol, A., Sarandol, E., Eker, S.S., Erdin, S., Vatansever, E., Kirli, S. (2007) Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative–antioxidative systems. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 22: 67–73.
- Sarko, J. (2000) Antidepressants, old and new. A review of their adverse effects and toxicity in overdose. *Emerg Med Clin North Am* 18 (4): 637-654.
- Sastre, J., Millán, A., De la Asunción, J.G., Plá, R., Juan, G., Pallardo, F.V., O'Connor, E., Martin, J.A., Droy-Lefaix, M.T., Viña, J. (1998) A *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 24 (2):298–304.
- Schildkraut, J.J. (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122: 509–522.
- Seay, B., Hansen, E., Harlow H.F. (1962) Mother–infant separation in monkeys. *J Child Psychol Psychiatry* 3: 3–32.
- Soley, B.D., Urichuk, L.J., Morley, P., Durkin, J., Shan, J.J., Pang, P.K.T., Coutts, R.T. (2000) Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential neuroprotectant in extract of *Ginkgo biloba* leaves. *J Pharm Pharmacol* 52: 451-459.
- Smith, J.V., Luo, Y. (2004) Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 465-472.
- Solomon, P., Adams, F., Silver, A., Zimmer, J., DeVeaux, R. (2002) Ginkgo for memory enhancement: a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* 288: 835–840.
- Somani, S.M., Husain, K., Díaz-Phillips, L., Lanzotti, D.J., Kareti, K.R., Trammell, G.L. (1996) Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat. *Alcohol* 13: 603-610.

- Soulié, C., Nicole, A. Christen, Y., Ceballos-Picot, I. (2002) The *Ginkgo biloba* extract EGb 761 increases viability of hNT human neurons in culture and affects the expression of genes implicated in stress response. *Cell Mol Biol* 48: 641-646.
- Spasić, M.B., Saičić, Z.S., Buzadžić, B., Blagojević, D., Petrović, V.M. (1993) Effects of long term exposure to cold on the antioxidant defence system in the rat. *Free Radic Mol Biol Med* 15: 291-299.
- Spieß, E., Juretzek, W. (1993) Ginkgo. En: *Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis (5th edition) Vol. 5*. Haensel, R., Keller, K., Rimpler, H., and Schneider, G., eds. Springer-Verlag, Berlin. pp. 269-292.
- Spiess, J., Rivier, J., Rivier, C., Vale, W.W. (1981) Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6517-6521.
- Squire, L. (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99: 195–231.
- Starkey, S.J., Skingle, M. (1994) 5-HT_{1D} as well as 5-HT_{1A} autoreceptors modulate 5-HT release in the guinea-pig dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacol* 33: 393–402.
- Steinke, B., Müller, B., Wagner, H. (1993) Biologische Standardisierungsmethode für Ginkgo-Extrakte. *Planta Med* 59: 155–160.
- Stéru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P. (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85: 367–70.
- Tang, J., Sun, J., Zhang, Y., Li, L., Cui, F., He, Z. (2007) Herb-drug interactions: effect of *Ginkgo biloba* extract on the pharmacokinetics of theophylline in rats. *Food Chem Toxicol* 45: 2441–2445.
- Taussig, R., Gilman, A.G. (1995) Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 270: 1–4.
- Taylor, J.E. (1990) *In vitro* inhibition of [³H]5-HT, [³H] norepinephrine (NE), and [³H] dopamine (DA) uptake by an extract of the *Ginkgo biloba* plant. *Soc. Neurosci. Annu Meet St. Louis* (Abstract 32.11).
- Taylor, J.E., Odell, A., Bonnin, A. (1991) The effect of EGb 761 treatment on *ex vivo* biogenic amine uptake. *Biomeasure, Inc.*, Internal Report No. 288-4, 12.
- Todorovic, C., Jahn, O., Tezval, H., Hippel, C., Spiess, J. (2005) The role of CRF receptors in anxiety and depression: implications of the novel CRF₁ agonist cortagine. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1323-1333.

- Tresguerres, J.A.F. *Fisiología humana (1ª edición)*. Madrid, Interamericana-McGraw-Hill, 1992. pp. 73-75.
- Tsankova, N.M., Berton, O., Renthal, W., Kumar, A., Neve, R.L., Nestler, E.J. (2006) Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci* 9: 519-525.
- Tsuboi, H., Tatsumi, A., Yamamoto, K., Kobayashi, F., Shimoi, K., Kinoshita N. (2006) Possible connections among job stress, depressive symptoms, lipid modulation and antioxidants. *J Affect Disord* 91: 63–70.
- Valenti, M., Benabarre, A., Bernardo, M., Garcia-Amador, M., Amann, B., Vieta, E. (2007) Electroconvulsive therapy in the treatment of bipolar depression. *Acta Esp Psiquiatr* 35 (3): 199-207.
- Varghese, F.P., Brown, E.S. (2001) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in major depressive disorder: a brief primer for primary care physicians. *J Clin Psychiatry* 2 (4): 151-155.
- Velasco, A., San Roman del Barrio, L., Serrano, J.S., Martínez, R., Cadavid, M.I. *Farmacología Fundamental*. Madrid, McGraw-Hill Interamericana de España, 2003. pp. 243-255, 284-297.
- Waravdekar, V.S., Saslaw, L.D. (1959) A sensitive colorimetric method for the estimation of 2-deoxy-sugars with the use of malonaldehyde thiobarbituric acid reaction. *J. Biol. Chem.* 234: 1945-1950.
- Warner-Schmidt, J.L., Duman, R.S. (2006) Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16: 239-249.
- Winter, E. (1991) Effects of an extract of *Ginkgo biloba* on learning and memory in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 38: 109–114.
- Winter, J. (1998) The effects of an extract of *Ginkgo biloba*, EGb 761, on cognitive behavior and longevity in the rat. *Physiol Behav* 63: 425–433.
- Winterbourn, C.C., Hawkins, E.R., Brian, M., Carrel, R.W. (1975) The estimation of cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 85: 337-342.
- Wong, M.L., Licinio, J. (2004) From monoamines to genomic targets: a paradigm shift for drug discovery in depression. *Nat Rev Drug Discov* 3:136–151.
- Wu, W.R., Zhu, X.Z. (1999) Involvement of monoamine oxidase inhibition in neuroprotective and neurorestorative effects of *Ginkgo biloba* extract against MPTP-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity in C57 mice. *Life Sci* 65 (2): 157–164.

- Yeung, J.M., Friedman, E. (1991) Effect of aging and diet restriction on monoamines and aminoacids in cerebral cortex of Fischer-344 rats. *Growth Develop Aging* 55: 275-283
- Zafir, A., Ara, A., Banu, N. (2008) *In vivo* antioxidant status: A putative target of antidepressant action. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33: 220-228.
- Zimmermann, M., Colciaghi, F., Cattabeni, F., Di Luca, M. (2002) *Ginkgo biloba* extract: from molecular mechanisms to the treatment of Alzheimer's disease. *Cell Mol Biol* 48: 613–623.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

- jnm.snmjournals.org (Consultada el 25 de Junio de 2008)
- www.ophraparks.uk (Consultada el 23 de Octubre de 2009)