
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS ω -3 SOBRE EL SISTEMA
DOPAMINÉRGICO NIGROESTRIATAL ANTE EL DAÑO GENERADO POR
ROTENONA, MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE
PARKINSON**

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctora en Biología Experimental

PRESENTA

M. en C. Norma Serrano García

COMITÉ TUTORAL:

Codirectora: Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Codirector: Dr. José Pedraza Chaverri

Asesora: Dra. Verónica Pérez de la Cruz

Ciudad de México a 11 de Octubre del 2019

MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobó la tesis titulada “**EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS ω -3 SOBRE EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO NIGROESTRIATAL ANTE EL DAÑO GENERADO POR ROTENONA, MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**”, que presentó la M. en C. Norma Serrano García el día 11 de octubre del 2019.

Dra. Verónica Souza Arroyo (Presidente)

Profesor Titular “C”, T.C.
Laboratorio de Fisiología Celular
Departamento Ciencias de La Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Dra. Sonia Galván Arzate (Secretario)

Departamento de Neuroquímica
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
“Manuel Velasco Suárez”

Dra. Leticia Granados Rojas (Vocal)

Laboratorio de Neurociencias.
Instituto Nacional de Pediatría

Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez (Vocal)

Laboratorio de Patología Vasculare
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
“Manuel Velasco Suárez”

AGRADECIMIENTO

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Esta tesis de doctorado se realizó en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” y en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. El proyecto fue parcialmente apoyado por CONACyT proyecto otorgado a la Dra. Marisol Orozco Ibarra (número 168356) y el proyecto UAMI otorgado a la Dra. Anabel Jiménez Anguiano (número 14407025).

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Co-directora

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Área de Neurociencias

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Co-director

Dr. José Pedraza Chaverri

Departamento de Biología

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesora

Dra. Verónica Pérez de la Cruz

Departamento de Neuroquímica

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

“Manuel Velasco Suárez”

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, por permitirme realizar mis estudios de doctorado.

Agradezco las facilidades brindadas por el laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” y al Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el espacio, materiales, reactivos y animales brindados para la realización del proyecto.

Agradezco a mi comité de sinodales por sus comentarios constructivos al escrito de mis tesis:

Dra. Verónica Souza Arroyo, Dra. Sonia Galván Arzate, Dra. Leticia Granados Rojas y Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

Agradezco al Dr. José Pedraza Chaverri por aceptarme en su laboratorio y apoyarme en este largo y duro camino que recorrimos para culminar con el escrito de esta tesis. Gracias.

Dra. Anabel Jiménez Anguiano, le agradezco por su confianza, paciencia y apoyarme para conseguir esta meta académica a pesar de todos los altibajos profundos que vivimos. Gracias por creer en mí.

Dra. Marisol Orozco Ibarra agradezco todos sus consejos y enseñanzas académicas durante mi adaptación en el laboratorio, también la paciencia que me tuvo para conseguir esta meta muy importante en mi formación académica. Mil gracias Doctora.

Gracias a todos los miembros que han formado y forman parte del laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular: Erika, Jazmin, Nancy Jazmin, Francisco José, Anayeli, Janet, María Fernanda, Enrique, Omar, Nancy, Ana Ofelia, Antonio, Aldo, Minerva, Rubio y Fabiola. Gracias por su apoyo técnico, moral y compañerismo, el cual debe existir en todo equipo de trabajo. Gracias totales.

Gracias a la Dra. Juanita Villeda Hernández (†), por ese apoyo y consejo moral que me brindo para llegar a este punto de mi vida académica.

Francisca y Sandra Fernández Valverde compañeras, amigas y colegas que siempre estuvieron dandome ánimo y apoyo en momentos difíciles durante este camino. En verdad gracias por todo su apoyo.

Gracias a las Doctoras Sonia Galván y Laura Osorio por su tiempo y paciencia en escucharme cuando el estrés rebasaba mis límites de autocontrol. Infinitamente gracias.

Gracias Vero Custodio por tu amistad, compañerismo y apoyo en todos estos años de vida laboral y académica. Este logro alcanzado es gracias a tu ánimo y ayuda que me has brindado en todos estos años.

Gracias Dra. Mónica Torres por la sinaptofisina, fue un gran apoyo para terminar el estudio.

**A menos que Jehová mismo edifique la casa de nada vale
que sus edificadores hayan trabajado duro en ella.
La bendición de Jehová.... eso es lo que enriquece...
Por eso daré gracias oh Jehová entre las naciones.
(Sal. 127:1, Prob. 10:22, 2Sam. 22:50)**

Dedicó esta tesis a:

Mis hijos Febe Irma y Sergio Adriel por su apoyo y comprensión durante todos estos años de angustia, estrés y desesperación, sin ustedes esta meta no se hubiera culminando. Gracias por su paciencia, apoyo y benevolencia hacia esta madre que estuvo loca e histérica mientras realizaba sus estudios de doctorado. Gracias mis amores.

A mi madre Irma García Tagle (†) quien me dijo siempre, antes de partir, que no dejara de estudiar y así lo hice, no he dejado de estudiar desde el día que se fue.

A mi padre Sergio Serrano Moreno y mi hermano Edmundo Serrano García por su apoyo incondicional para asistir a mis hijos en mi ausencia para realizar los miles de experimentos y escribir esta tesis. Mil gracias por todo lo que hicieron, sin su ayuda esto hubiera sido mucho más difícil de lo fue.

A José Juan Mares Sámano, por su apoyo incondicional y enseñanza, que aunque esta fue muy dura también muy fructífera. Gracias por tu silencio y sustento moral durante estos años de estudio. Agradezco esa compañía incomparable de un gran amigo que ama sin condición. "En todo tiempo ama el amigo, y es como un hermano en tiempo de angustia" Proverbios 17:17.

RESUMEN

Debido al aumento en la esperanza de vida se ha incrementado la proporción de adultos en casi todos los países y México no es la excepción, llevando a un incremento en la incidencia de enfermedades neurodegenerativas, de las cuales se desconocen las causas. Sin embargo, se ha postulado que el estrés oxidante, toxinas exógenas, acumulación intracelular de metabolitos tóxicos, infecciones virales, excitotoxicidad, agregados proteicos y disfunción mitocondrial, pueden favorecer la aparición de la muerte neuronal y con ello los síntomas de las enfermedades neurodegenerativas. Dentro de estas enfermedades se encuentra la enfermedad de Parkinson (EP) que es la segunda de importancia a nivel mundial, después de la enfermedad de Alzheimer (EA). Dentro de los modelos experimentales de la EP que se emplean para su estudio se encuentra la administración sistémica de rotenona, la cual genera muerte en las neuronas dopaminérgicas al inhibir el complejo I mitocondrial, mecanismo observado en la patogénesis de la EP. Por otro lado, se ha descubierto que los ácidos grasos poliinsaturados esenciales tienen un efecto importante en el sistema nervioso, en la biogénesis mitocondrial, así como en la función dopaminérgica. En este estudio se analizó el efecto neuroprotector del ácido docosahexaenoico (DHA) sobre la función dopaminérgica nigroestriatal en el parkinsonismo inducido por rotenona. Se utilizaron ratas machos Wistar y se formaron cuatro grupos experimentales: a) solución salina (SS)+SS, b) SS+rotenona, c) DHA+rotenona y d) DHA+SS. Se administró SS ó DHA (35 mg/kg/día, oral) durante siete días y posteriormente la SS ó rotenona (3 mg/kg/día, subcutánea) a diferentes tiempos de administración 8 ó 14 días a los cuales se les midió la actividad

exploratoria erguida. Posteriormente solo a 8 días de rotenona se cuantificó el número de neuronas dopaminérgicas, el contenido proteico de tirosina hidroxilasa, la expresión de tubulina y sinaptofisina, el complejo I mitocondrial, el índice de control respiratorio, el potencial de membrana mitocondrial, la capacidad de síntesis de adenosín trifosfato (ATP) y la ultraestructura mitocondrial. Los resultados mostraron que la rotenona disminuye la actividad exploratoria erguida a 8 y 14 días de rotenona y la administración del DHA ejerció efecto neuroprotector solamente a 8 días. En el número de neuronas dopaminérgicas, la expresión de tubulina y sinaptofisina se observó disminución a 8 días de administración con rotenona y el DHA previno dicha disminución. La actividad del complejo I mitocondrial, índice de control respiratorio, potencial mitocondrial transmembranal y la capacidad de síntesis de ATP no se vieron afectados por la rotenona, sin embargo, se observaron alteraciones ultraestructurales en mitocondria y el pretratamiento del DHA redujo estas alteraciones. Los resultados de este estudio, indican que el DHA atenúa la neurodegeneración dopaminérgica generada por la rotenona, posiblemente al prevenir la disminución en la expresión de tubulina y sinaptofisina producido por la toxicidad de la rotenona.

ABSTRACT

Due to the increase in life expectancy, the proportion of adults in almost all countries has increased and Mexico it is not the exception, increasing the incidence from neurodegenerative disease, of which the causes are unknown. However, it has been postulated that oxidative stress, exogenous toxins, intracellular accumulation of toxic metabolites, viral infections, excitotoxicity and protein aggregates and mitochondrial dysfunction, may favor the appearance of neuronal death and thus the symptoms of neurodegenerative diseases. Among these diseases, it's found Parkinson's disease (PD) which is the second most important worldwide, after Alzheimer's disease. Among the experimental models of the EP used for its study is the systemic administration of rotenone which generates death in dopaminergic neurons by inhibiting mitochondrial complex I, mechanisms observed in the pathogenesis of PD. On the other hand, it has been discovered that essential polyunsaturated fatty acids have an important effect on the nervous system, on mitochondrial biogenesis as well as on dopaminergic function. In this study, it was analyzed the neuroprotective effect of docosahexaenoic acid (DHA) on the nigrostriatal dopaminergic function in rotenone induced parkinsonism. Male Wister rats were used and they were formed four groups experimental: a) saline solution (ss)+ss, b) ss+rotenone, c) DHA + rotenone and d) ss+DHA. It was administered the ss or DHA (35 mg/kg/day, oral) for seven days and subsequently the ss or rotenone (3 mg/kg/days, subcutaneous). It was measured exploratory activity (rearing) to 8 and 14 days of rotenone, and the numbers dopaminergic neurons, the content protein the hydroxylase tyrosine, the expression of tubulin and synaptophysin, the mitochondria

complex I, respiratory control index, potential mitochondrial membrane, adenosine triphosphate (ATP) production activity and the mitochondrial ultrastructure was measured to 8 days of rotenone. The results showed that rotenone decreases exploratory activity (rearing) to 8 and 14 days of rotenone and administration of DHA exerted neuroprotective effects only to 8 days. In the number of dopaminergic neurons, the expression of tubulin and synaptophysin was observed decreased to 8 days of administration with rotenone and DHA prevented such decrease. The activity of complex I mitochondrial, respiratory control index, potential mitochondrial membrane and ATP production activity they were not affected by rotenone, however ultrastructural alterations were observed in mitochondria and the pretreatment of DHA decreased these alterations. The results of this study indicate that DHA attenuates neurodegeneration dopaminergic generated by the rotenone, possibly by preventing the diminution in the expression of tubulin and synaptophysin produced by the toxicity of rotenone.

INDICE

Resumen -----	7
Abstract -----	9
Abreviaturas -----	13
1. Introducción	
1.1. Envejecimiento y Enfermedades Neurodegenerativas -----	15
1.2. Patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas -----	16
1.2.1. Agregados de proteínas -----	16
1.2.2. Estrés oxidante -----	17
1.2.3. Alteración en la homeostasis de calcio-----	18
1.2.4. Toxinas exógenas-----	19
1.2.5. Infecciones virales-----	20
1.3. Mitocondria y disfunción mitocondrial -----	21
1.3.1. Estructura-----	21
1.3.2. Cadena de transporte de electrones-----	22
1.3.3. Potencial transmembranal y síntesis de ATP-----	23
1.3.4. Disfunción mitocondrial-----	25
1.4. Enfermedad de Parkinson -----	26
1.4.1. Síntomas y signos de la EP-----	27
1.4.2. Etiología de la EP-----	30
1.4.3. Enfermedad de Parkinson y disfunción mitocondrial-----	34
1.5. Modelos experimentales de la EP -----	34
1.5.1. 6-Hidroxidopamina-----	35
1.5.2. Paracuato-----	36
1.5.3. MPTP-----	37
1.5.4. Genéticos-----	38
1.5.5. Rotenona -----	39
1.6. Tratamiento de la Enfermedad de Parkinson -----	42
1.7. Ácidos grasos poliinsaturados esenciales -----	47
1.8. Efecto protector y neuroprotector del DHA -----	50
1.9. DHA y neuronas dopaminérgicas -----	54

2. Justificación -----	55
3. Hipótesis -----	57
4. Objetivos	
4.1. Objetivo general -----	57
4.2. Objetivos específicos -----	57
5. Materiales y métodos	
5.1. Reactivos -----	59
5.2. Animales -----	60
5.3. Grupos experimentales -----	60
5.4. Evaluación conductual -----	61
5.5. Análisis histoquímico e inmunohistoquímico -----	62
5.5.1. cuantificación estereológico-----	63
5.5.2. análisis densitométrico de TH en CE-----	63
5.5.3. análisis densitométrico de α -tubulina y sinaptofisina en CE-----	64
5.6. Aislamiento de mitocondrias -----	64
5.7. Determinación de la actividad del complejo I -----	65
5.8. Análisis de la proteína del complejo I por western blot -----	65
5.9. Parámetros respiratorios -----	66
5.10. Determinación de la capacidad de síntesis de ATP -----	66
5.11. Potencial de membrana -----	67
5.12. Microscopia electrónica -----	67
5.13. Análisis estadístico -----	68
6. Resultados -----	69
7. Discusión -----	83
8. Conclusión -----	89
9. Perspectivas -----	90
10. Referencias -----	91

ABREVIATURAS

3-NP: Ácido 3 nitropropiónico.
ADP: Adenosín difosfato.
AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico.
ATP: Adenosín trifosfato.
BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro.
BSA: Albúmina sérica bovina.
CE: Cuerpo estriado.
CTE: Cadena de transporte de electrones.
DA: Dopamina.
DCPIP: 2,6 diclorofenolindofenol.
DHA: Ácido docosaheptaenoico.
DNA: Ácido desoxirribonucleico.
EA: Enfermedad de Alzheimer.
ECMT: Estimulación de campo magnético transcranial.
EEM: Error estándar de la media.
EGTA: Ácido bis (2-aminoetil) etilenglicol N',N',N',N' tetracético.
EH: Enfermedad de Huntington.
EO: Estrés oxidante.
EP: Enfermedad de Parkinson.
ERO: Especies reactivas del oxígeno.
FAD: Flavín adenín dinucleótido.
FCCP: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona.
HEPES: N-2-Hidroxiethylpiperazina-N'-2 ácido etanosulfónico.
6-OHDA: 6-hidroxidopamina.
ICR: Índice de control respiratorio.
INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
KCN: Cianuro de potasio.
LCIG: infusión intestinal de gel de levodopa/carbidopa.
L-DOPA: L-3,4 dihidroxifenilalanina.
MPP⁺: 1-Metil-4-fenilpiridino.
MPPP: 4-Metil- α -pirrolidinopropiofenona.
MPTP: 1-Metil-4 fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.
NAD⁺: Nicotinamida adenin dinucleótido.
NADH: Nicotinamida adenin dinucleótido reducido.
NADP⁺: Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato.
NADPH: Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido.
SDS: Dodecil sulfato de sodio.
SNC: Sistema nervioso central.

SNpc: Sustancia nigra pars compacta.

SPSS: Paquete estadístico de ciencias sociales.

TH: Tirosina hidroxilasa.

VDAC-1: Canal anión dependiente de voltaje.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas*

Debido al aumento de la esperanza de vida y a la disminución de la tasa de fecundidad, la proporción de personas mayores de 60 años está aumentando más rápidamente que cualquier otro grupo de edad en casi todos los países (Organización Mundial de la Salud, 2019). En México, la esperanza de vida entre el último decenio del siglo pasado y el segundo del presente (1990-2016) ha tenido un incremento de 5 años. Para los varones pasó de 68 años en 1990, a 72 en el 2000 y a 73 en 2016; para las mujeres fue de 74 años en 1990, a 77 en el 2000 y a 78 en el 2016 (INEGI, 2017). Con estas modificaciones, la proporción de niños y adolescentes ha comenzado a disminuir y se ha incrementado la proporción de adultos. Según el Censo de Población y Vivienda de 1990 estimó que en México el grupo de personas mayores de 60 años creció a un índice anual de 2.4%, en tanto que el resto de la población lo hizo al 1.7%, lo que indica que en pocos años el problema sanitario por enfermedades neurodegenerativas se convertirá en una epidemia, por lo cual el siglo XXI podría caracterizarse por la pandemia de las alteraciones neurodegenerativas (Navarrete y cols., 2000; González y Hernández, 2013). En México son más de 10 millones de adultos mayores de 65 años, según indica el secretario de salud (Valadez, 2012), y uno de cada cuatro mexicanos puede padecer alguna enfermedad neurodegenerativa.

El término degenerativo se aplica a las enfermedades del sistema nervioso que cursan con alteraciones de las células neuronales. Estos padecimientos son de instalación gradual, generalmente simétricos e implacablemente progresivos. De

acuerdo con el grupo neuronal involucrado serán las manifestaciones clínicas que se presenten (Navarrete y cols., 2000). Actualmente se desconocen las causas de la muerte neuronal en las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, se ha postulado que el estrés oxidante, las toxinas exógenas, la acumulación intracelular de metabolitos tóxicos, las infecciones virales, la excitotoxicidad, alteraciones en la homeostasis de calcio, y disfunción mitocondrial, pueden favorecer la aparición de la muerte neuronal y con ello los síntomas de la enfermedad neurodegenerativa (Kumar y cols., 2005; Kim y Takahashi, 2006; Dexter y Jenner, 2013; Takalo y cols., 2013).

1.2. Patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas

1.2.1. Agregados de proteínas

La toxicidad de las proteínas se desarrolla tanto en los casos esporádicos como genéticos. El mecanismo por el cual los agregados proteicos ejercen su efecto es por medio de las mutaciones. En la enfermedad de Parkinson (EP) se han observado 5 mutaciones puntuales en los genes que codifican para la proteína alfa-sinucleína y más de 32 para la proteína precursora amiloide asociada a la enfermedad de Alzheimer (EA) (Flagmeier y cols., 2016; Hunter y Brayne, 2018). En la enfermedad de Huntington (EH) se ha identificado la mutación del gen *htt* que codifica para la proteína llamada huntingtina (Walker, 2007). Se han encontrado mutaciones en el gen *C9orf72* que conduce a producción de proteínas repetidas dipeptídicas y esta mutación representa hasta el 40% de la demencia frontotemporal de origen genético (Mori y cols., 2013). Aunado a esto, las proteínas aberrantes generadas independientemente de mutaciones genéticas pueden también contribuir

a los depósitos proteicos. Dichos depósitos pueden establecerse en el núcleo de la célula, en el citoplasma y en la mitocondria (Chung y cols., 2018).

1.2.2. *Estrés oxidante*

La cadena de transporte de electrones (CTE) en la mitocondria es la fuente principal de especies reactivas del oxígeno (ERO) en las células eucariontes. La generación de las ERO ocurre cuando la reducción del oxígeno es incompleta. Un pequeño porcentaje del anión superóxido es producido por los complejos I y III el cual puede ser convertido a peróxido de hidrógeno por la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso. La glutatión peroxidasa que se localiza en la mitocondria cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a agua y a una molécula de oxígeno (Hauser y Hastings, 2013). Sin embargo, existen ciertas situaciones que pueden causar que la producción de las ERO sobrepase la capacidad de las enzimas antioxidantes de la célula. A esta condición se le denomina estrés oxidante, que puede generar daño a macromoléculas de la célula y conducir a la muerte celular. Este daño se da a través de las ERO como son: el radical superóxido, el radical hidroxilo, el oxígeno singulete, el hidroperóxido y el peroxinitrito (Nakazawa y cols., 1996; Pohl y Kong Thoo Lin, 2018). El sitio blanco de acción de estos radicales son los enlaces entre los ácidos grasos quienes desestabilizan la unión e inician una reacción en cadena para dañar otras moléculas de ácidos grasos vecinos. Este proceso de oxidación se conoce como peroxidación de lípidos. El sistema nervioso central (SNC) es blanco de las ERO debido a que está conformado mayoritariamente por ácidos grasos poliinsaturados, tiene niveles bajos de actividad antioxidante y

concentraciones altas de metales pesados como el hierro. Estos tres factores permiten al SNC ser más susceptible al daño oxidante en comparación con otros tejidos corporales y se ha descrito que la generación de estas ERO contribuyen a la pérdida neuronal en muchas enfermedades neurodegenerativas (Uttara y cols., 2009).

1.2.3. *Alteración en la homeostasis de calcio*

Las alteraciones del calcio en la célula se inician por medio de la neurotransmisión de glutamato, éste activa los receptores de la membrana neuronal y si la exposición supera los 3 minutos desencadena rápidamente alteración en la concentración de calcio intracelular y a este proceso biológico se le denomina excitotoxicidad (Escobar-Betancourth y Medina-Marín, 2002). En las enfermedades neurodegenerativas se ha observado la presencia de este proceso neurotóxico, en EA las regiones cerebrales afectadas presentan un incremento en los niveles de calcio, y de la actividad de las enzimas dependientes de calcio. En la EP también se ha observado incremento de calcio intracelular vinculado a la excitotoxicidad generada por glutamato. Sin embargo, algunos autores postulan que no sólo el incremento de calcio genera la excitotoxicidad, la presencia de daños medioambientales como metales pesados y neurotoxinas desencadenan la muerte neuronal dopaminérgica (Wojda y cols., 2008). En la esclerosis lateral amiotrófica se ha demostrado que las neuronas motoras espinales presentan alteración del calcio intracelular favoreciendo el daño a estas neuronas por excitotoxicidad (Wojda y cols., 2008).

1.2.4. *Toxinas exógenas*

La teoría de las toxinas exógenas se consideró en los años 80's cuando un grupo de jóvenes adictos a las drogas desarrollaron rápidamente un síndrome parkinsoniano debido al uso intravenoso de una preparación ilícita de una heroína sintética denominada 4-metil- α -pirrolidinopropiofenona (MPPP), un derivado del narcótico meperidina. Durante la degradación de la MPPP se genera la toxina 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP), esta neurotoxina es la responsable del síndrome parkinsoniano (Langston y cols., 1983). Otros compuestos tóxicos que se han relacionado con las enfermedades neurodegenerativas son los metales, como el aluminio que se ha relacionado con la EA y es una neurotoxina que inhibe más de 200 funciones biológicas. La exposición a metales pesados como el hierro, zinc y cobre incrementa el riesgo de desarrollar parkinsonismo, así como compuestos organofosforados que se encuentran en los pesticidas, herbicidas e insecticidas (Campdelacreu, 2014). Otra de las enfermedades neurodegenerativas afectada por la exposición prolongada de los pesticidas y al trabajo en las fuerzas armadas norteamericanas (más de 30 años de exposición) es la esclerosis lateral amiotrófica (Mendez-López, 2016). Con respecto a la EH se ha asociado con la acción de toxinas endógenas y exógenas como el glutamato-aspartato, el kainato-quinolinato y el ácido 3-nitropropiónico (3-NP). Esta última se conoce desde hace un siglo y se encuentra en una gran variedad de especies de plantas y hongos. Una niña que comió un pedazo de caña con moho a los pocos minutos comenzó a presentar

movimientos distónicos, siendo este el primer informe de los efectos por exposición al 3-NP (Francis y cols., 2013; Ming, 1995).

1.2.5. *Infecciones virales*

La encefalitis letárgica es una forma atípica de encefalitis que causó una epidemia entre 1917 y 1928 con millones de muertos en todo el mundo. Posteriormente en los años 60's se diagnosticó una mayor incidencia de enfermos con Parkinson (Korell y Tanner, 2005). Por lo tanto, se planteó la hipótesis que la mayoría de los casos con "síndrome de Parkinson" eran sobrevivientes de la encefalitis letal pandémica y que la etiología subyacente era una infección subclínica de gripe que dio como resultado la aparición de síntomas parkinsonianos varias décadas después (Wirdefeldt y cols., 2011). Con base a estos hechos, se sospechó que la exposición a infecciones virales es la causa de las enfermedades neurodegenerativas. En el caso de la EA, se ha sugerido que infecciones en el SNC o administración sistémica del virus herpes simple tipo 1, *C. pneumoniae* y espiroquetas son posibles agentes etiológicos para la EA, pero la evidencia es limitada y poco consistente (Campdelacreu, 2014). Otra enfermedad neurodegenerativa que se le asocia con infecciones virales es la esclerosis múltiple, los hallazgos encontrados apoyan la idea que el virus varicela zoster participa en la etiopatogenia de la esclerosis múltiple (Sotelo y cols., 2007).

1.3. Mitocondria y disfunción mitocondrial

1.3.1. Estructura

La mitocondria es un organelo importante en la célula porque genera energía en forma de adenosín trifosfato (ATP). En todo momento de la vida de un organismo se llevan a cabo funciones que requieren energía, es decir, síntesis de proteínas o ácidos nucleicos, transporte de iones a través de sus membranas, transmisión nerviosa, absorción de moléculas necesarias, excreción de sustancias indeseables, contracción muscular, etc. Esto implica que el ATP se gasta continuamente y, por lo tanto, se tiene que sintetizar constantemente. Formar el ATP que se gasta constituye la función fundamental de las mitocondrias (Gómez-Puyou y Gómez-Puyou, 2003). La mitocondria está constituida por dos membranas, una externa que da al citoplasma de la célula y el otro extremo hacia el espacio intermembranal. A este espacio le sigue la membrana interna, quien se encuentra limitada por la matriz mitocondrial, que es el espacio interno de la mitocondria. La membrana interna está muy plegada y forma numerosas ondulaciones o crestas porque en ellas se lleva a cabo la producción de energía mediante el transporte de electrones, a través de varios complejos proteicos que dan la fuerza motriz a algunas enzimas para la síntesis de ATP (Voet y cols., 2007) (Figura 1).

ESTRUCTURA DE LA MITOCONDRIA

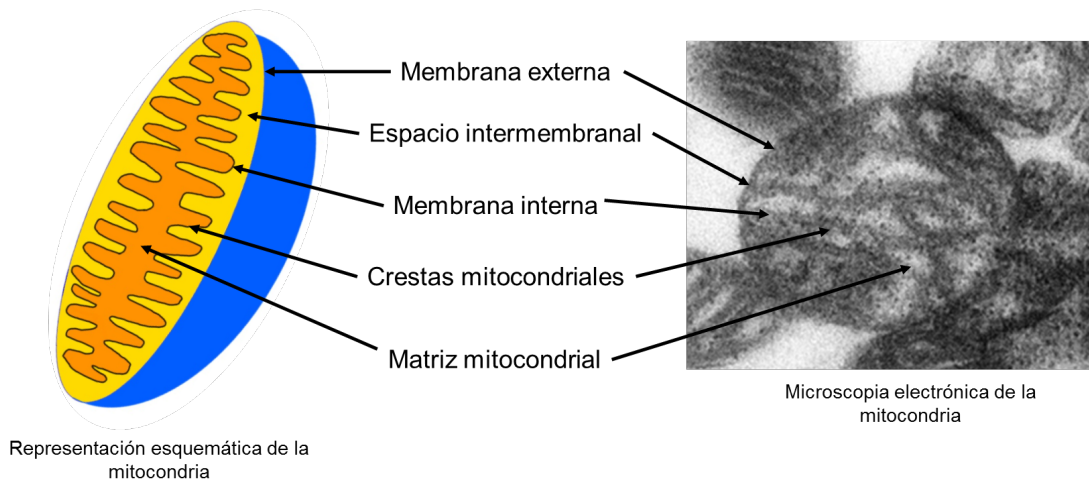


Figura 1. Estructura de la mitocondria (imagen de microscopia electrónica tomada de Serrano-García y cols., 2018).

1.3.2. Cadena de transporte de electrones:

Los complejos proteicos mitocondriales involucrados en la respiración y síntesis de ATP son cinco:

- Complejo I o nicotinamida adenín dinucleótido reducido (NADH)-ubiquinona oxidoreductasa o NADH-deshidrogenasa.
- Complejo II o succinato-deshidrogenasa.
- Complejo III o ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa.
- Complejo IV o citocromo oxidasa.
- Complejo V o ATP sintasa.

La cadena de transporte se inicia cuando la nicotinamida adenin dinucleótido (NAD^+) recibe los electrones, que se generaron en el ciclo de los ácidos tricarboxílico, y se reduce a NADH el cual, por medio de una NADH-deshidrogenasa,

los transfiere a la coenzima Q. La coenzima Q (también denominada ubiquinona) es una molécula relativamente pequeña, que se localiza en el interior de la membrana mitocondrial y tiene la capacidad de reducirse y oxidarse. El otro sitio aceptor de electrones es el succinato, otro sustrato del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que transfiere sus electrones a la succinato deshidrogenasa (una flavoproteína) que a su vez los pasa a la coenzima Q. La coenzima Q cede los electrones a la citocromo c oxidoreductasa y este al citocromo c, una proteína pequeña embebida en la membrana que funciona como transportador de electrones. El citocromo c cede sus electrones a la citocromo oxidasa o complejo IV. Finalmente, la citocromo oxidasa transfiere sus electrones al oxígeno y da lugar a la formación de una molécula de agua al combinarse con dos H^+ (Königsberg, 1992; Alberts y cols., 2015) (Figura 2).

1.3.3. *Potencial transmembranal y síntesis de ATP*

Durante el proceso en el que se transfieren los electrones en los complejos mitocondriales se genera un potencial electroquímico denominado también potencial transmembranal. Éste se establece entre ambos lados de la membrana y se expresa en mV; y, de acuerdo con Mitchell (1961), es la fuerza que impulsa la síntesis de ATP. Mitchell sugirió que la cadena de transporte está compuesta por una serie de reacciones de óxido-reducción acopladas de tal forma, que los electrones transferidos por los dos sustratos generados en la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (NADH y succinato), terminan con la generación de oxígeno. Este proceso conlleva la translocación de protones al espacio intermembranal de la mitocondria, que genera una diferencia de potencial electroquímico, y ésta a su vez

es utilizada por la bomba de protones, la enzima ATP-sintasa, para generar el ATP. El paso de protones no se da en todos los complejos, solo en los complejos I, III y IV (Königsberg, 1992; Gómez–Puyou y Gómez-Puyou, 2003) (Figura 2).

La enzima ATP sintasa es la responsable de la síntesis del ATP. Esta enzima consta de dos sectores o dominios bien definidos, uno que está embebido en la membrana interna de la mitocondria y que se conoce como Fo y otro que está en contacto con el medio interior o matriz de la mitocondria, conocido como F1 (Figura 3). Cuando los protones son liberados al espacio intermembranal por los complejos, como tienen una carga positiva, no se pueden difundir libremente a través de la membrana, por lo que se ven obligados a circular por un canal que se localiza en el sector Fo de la ATP sintasa (Dreyfus, 2015).

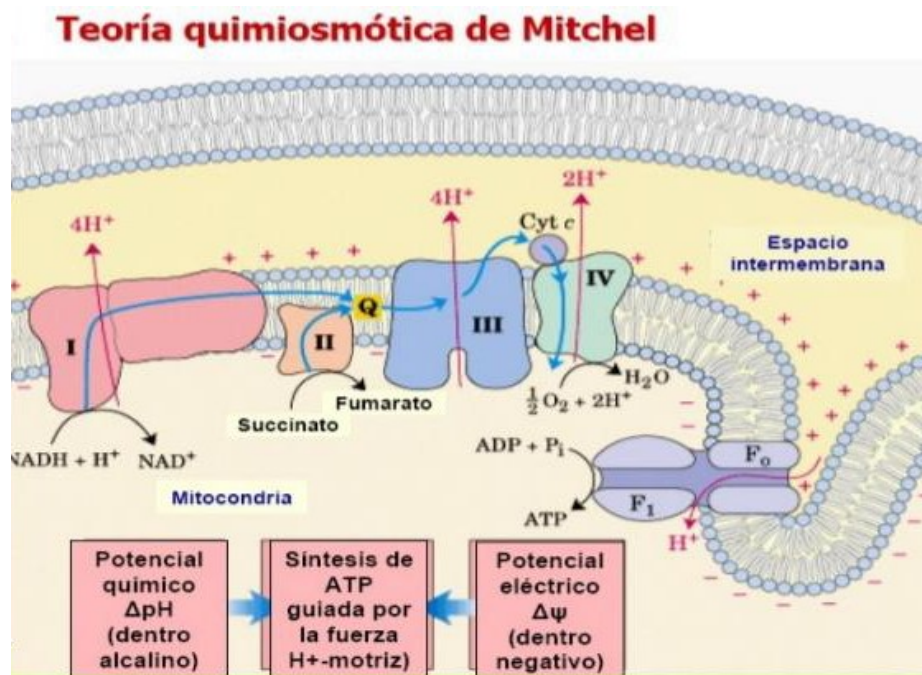


Figura 2. Esquema de los complejos mitocondriales de la cadena respiratoria. (Tomado Dreyfus, 2015)

ATP sintasa

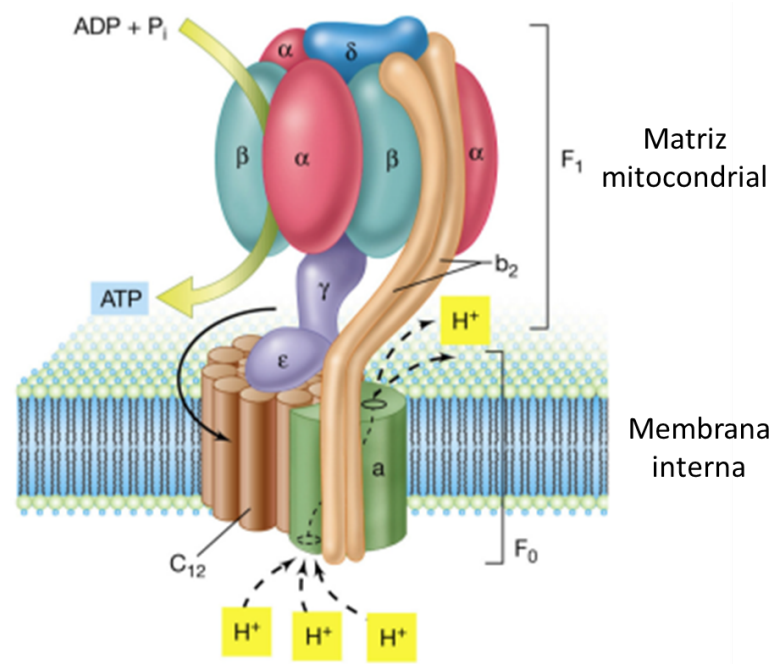


Figura 3. Dominios de la ATP sintasa (Tomado Dreyfus, 2015).

1.3.4. *Disfunción mitocondrial*

En la década de los 80's se habían descrito más de 60 enzimas mitocondriales dañadas por factores genéticos y medioambientales, dando pie a la clasificación bioquímica de enfermedades mitocondriales (Scholte, 1988). En la actualidad se le denomina disfunción mitocondrial y se refiere a los trastornos en la actividad de la CTE localizada en la mitocondria, ésta disfunción se ha relacionado con el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. En la EA se ha sugerido que las proteínas precursoras del amiloide son el causal de la disfunción mitocondrial. La beta-amiloide

inhibe el complejo alfa-cetoglutarato deshidrogenasa y reduce la actividad de la citocromo c oxidasa, así como se sugiere que la beta-amiloide modula proteínas que participan en los procesos de fusión/fisión (Casley y cols., 2002; Federico y cols., 2012). A pesar de que la EH es considerada como un trastorno autosómico dominante, la mutación de la huntingtina puede generar disfunción mitocondrial al interactuar directamente con el organelo, modulando la respiración, el potencial de membrana y la concentración de calcio (Kwong y cols., 2006). En la CTE, tanto en pacientes de la EH como en modelos experimentales, se ha observado que se encuentra reducida la actividad del complejo II (Federico y cols., 2012; Luis-García y cols., 2017). En la EP son varios los estudios en los que se han descrito alteraciones en la actividad del complejo I de la cadena respiratoria (Greenamyre y cols., 2001).

1.4. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad neurodegenerativa que ocupa el segundo lugar en incidencia después de la EA es la EP, padecimiento progresivo con características patológicas y clínicas bien definidas (Obeso y cols., 2017), presente en adultos mayores de 60 años. Se ha estimado que la incidencia en Estados Unidos es de 13.4 por 100 000 habitantes por año y una prevalencia del 0.3% (Obeso y cols., 2017). En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la Ciudad de México se ha informado una incidencia de 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes por año (Secretaría de Salud, 2001). La EP se caracteriza por alteraciones motoras que incluyen dificultad para iniciar movimientos (acinesia), lentitud en los movimientos voluntarios (bradicinesia), temblor en las extremidades durante el reposo (tremor) y rigidez

muscular (Utter y Basso, 2008). Los pacientes con la EP presentan degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNpc), que constituye uno de los principales grupos de neuronas productoras de dopamina (DA). En estudios postmortem, se demostró que la vía dopaminérgica nigroestriatal es especialmente vulnerable al envejecimiento (Stark y Pakkenberg, 2004).

La DA es el neurotransmisor responsable de transferir las señales entre la SNpc y el cuerpo estriado (CE), para producir actividad muscular con fluidez. La pérdida de DA hace que las neuronas del CE no equilibren la activación/inhibición de las señales eferentes de la SNpc, dejando a los pacientes incapaces de dirigir o controlar sus movimientos de forma normal (Orr y cols., 2002). Se ha encontrado que los síntomas motores aparecen cuando la pérdida de DA en el CE es alrededor del 80% y la muerte neuronal en la SNpc es alrededor del 50% (Figura 4) (Samii y cols., 2004; Schulz y Falkenburger, 2004).

1.4.1. *Síntomas y signos de la EP*

Los síntomas de la EP se desarrollan de forma gradual. A menudo comienzan con un ligero temblor en una mano y una sensación de rigidez en el cuerpo. Sin embargo, para categorizar si es un parkinsonismo idiopático se ha definido que el paciente debe presentar tres de los cuatro síntomas cardinales, o bien dos de manera asimétrica. Los síntomas son: temblor, rigidez muscular, bradicinesia y alteraciones de los reflejos posturales (Wirdefeldt y cols., 2011, Figura 5). Durante el desarrollo de la

Vía dopaminérgica nigroestriatal

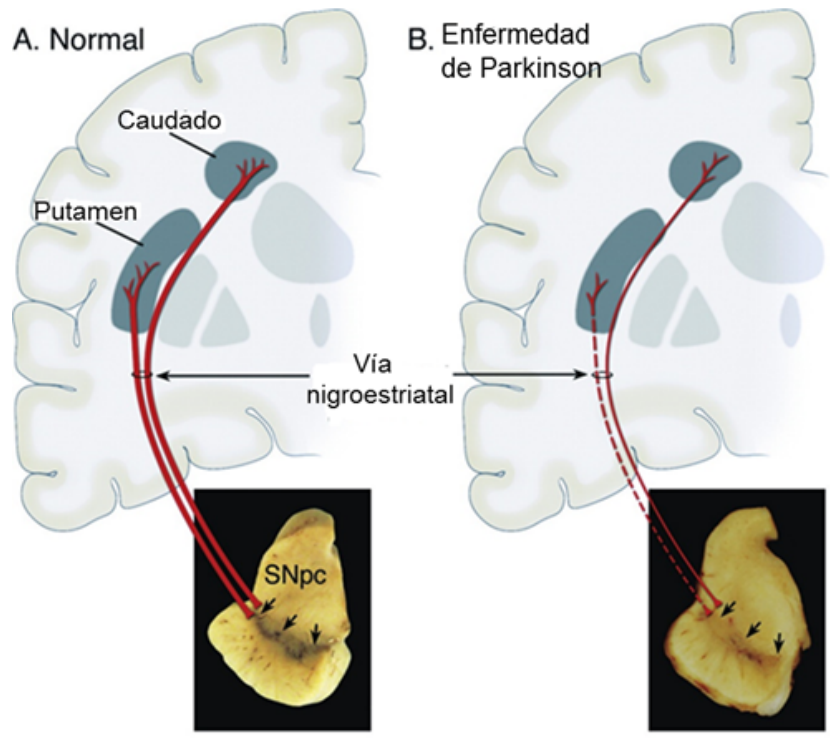


Figura 4. Representación esquemática de la vía dopaminérgica nigroestriatal. Los cuerpos neuronales dopaminérgicos se localizan en la sustancia nigra pars compacta (SNpc) marcadas por las flechas y las neuronas dopaminérgicas proyectan sus axones en el caudado Putamen. A). Esquema de pigmentación normal de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc producida por la neuromelanina localizada dentro de la neuronas. B). Esquema representativo de la enfermedad de Parkinson, se observa severa despigmentación en las neuronas dopaminérgicas en la SNpc (tomado de Dauer y Przedborski, 2003).

enfermedad se presentan diferentes etapas de alteración en el movimiento, las cuales se evalúan de acuerdo a la escala UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale). Leve es cuando las alteraciones del movimiento se presentan en un solo lado del cuerpo, cambios en la postura del cuerpo y leve dificultad para caminar. Moderado, cuando las alteraciones del movimiento se dan en ambos lados del cuerpo, el equilibrio y la coordinación están deteriorados y los episodios de

congelamiento son evidentes. En la etapa avanzada hay daño cognitivo con alucinaciones visuales y delirio, dificultad significativa para caminar y se requiere asistencia de una persona (Bhat y cols., 2018). Antes de que aparezca el daño motor

Postura típica del enfermo de Parkinson

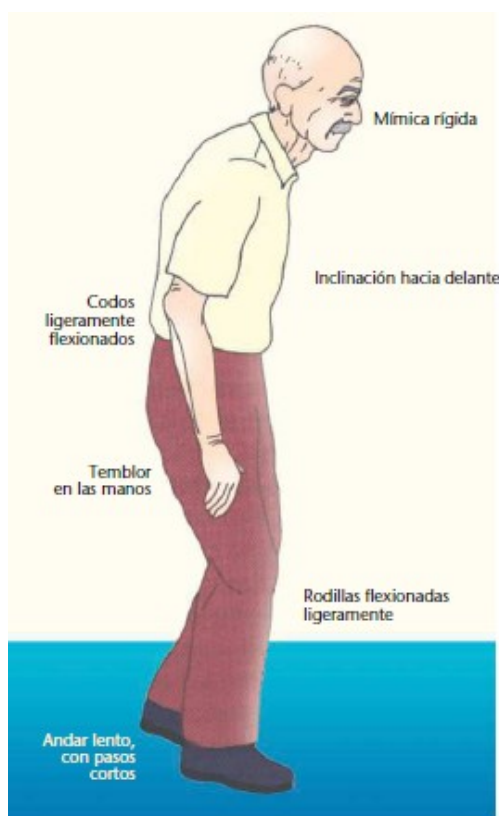


Figura 5. Síntomas motores característicos de la enfermedad de Parkinson (tomado de Gómez-Ayala, 2007).

y se diagnostique la EP, previamente los pacientes presentan una gran variedad de síntomas pre-motores, como la falta de compromiso e interés emocional (apatía) o excesiva somnolencia diurna. Los problemas de sueño y estreñimiento pueden

ocurrir de un 60 a 70% en los pacientes antes del diagnóstico, incapacidad de experimentar el placer (anhedonia), pérdida del olfato y el gusto, trastorno del estado de ánimo, sudoración excesiva, fatiga y dolor. La depresión y la ansiedad pueden ocurrir mucho antes de que se haga el diagnóstico. Estos síntomas pre-motores varían de un paciente a otro y continuarán progresando independientemente de la aparición de los síntomas motores durante el curso clínico de la enfermedad (Sveinbjornsdottir, 2016). En la mayoría de las personas, los síntomas aparecen a la edad de 60 años o más, pero en los últimos años ha disminuido ese rango de edad. Se tienen casos de la presencia de la EP a los 45 años tanto en hombres y mujeres (Pringsheim y cols., 2014).

1.4.2. *Etiología de la EP*

Actualmente se sabe que la EP se desarrolla debido a la disminución de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc. Sin embargo, aún se desconoce que genera esta muerte neuronal. Alrededor del 80% de la población que padece la EP es considerada como idiopática y el otro 20% es de origen genético (Bhat y cols., 2018). Aunque no se debe descartar que ambos factores juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Dauer y Przedborski, 2003).

La hipótesis medio ambiental y la exposición ocupacional proponen que la EP se desarrolla por la exposición a neurotoxinas que dañan las neuronas dopaminérgicas. En los años 80's cuando se descubrió que la exposición a la MPTP generó parkinsonismo y degeneración de las neuronas dopaminérgicas en el humano, fue cuando tuvo gran auge la teoría medio ambiental (Langston y cols.,

1983). Otro de los factores de riesgo es la exposición ocupacional, como los trabajadores de la industria siderúrgica, construcción, carpinteros, empleados de limpieza y agricultores (Tanner y Goldman, 1996; Fall y cols., 1999; Mortimer y cols., 2012; Pezzoli y Cereda, 2013). Sin embargo, en los últimos años se ha considerado que la exposición ocasional a manganeso, soldadura, así como a los pesticidas, insecticidas y herbicidas no tienen ningún riesgo para desarrollar la enfermedad (Wirdefeldt y cols., 2011). No obstante, el riesgo puede existir si la exposición ocurre por un tiempo prolongado o si la misma persona está expuesta a otros compuestos dándose un efecto sinérgico (Pezzoli y Cereda, 2013). También se sabe que la exposición a niveles altos de manganeso genera una condición neurológica degenerativa llamada manganismo (Stepens y cols., 2008), por lo que aún sigue en controversia si este tipo de riesgos son un factor importante en el desarrollo de la EP.

En años recientes también se le ha asociado como factor de riesgo a las lesiones craneoencefálicas, de tal forma que regresamos al concepto original de James Parkinson en 1817; quien sugirió que el temblor en reposo se debe a una lesión en la parte superior de la médula espinal (Goldman y Goetz, 2005). Existe una gran variedad de mecanismos que explican la relación de este tipo de lesiones cerebrales y el riesgo con la EP. El mecanismo más aceptado derivado de las autopsias son los procesos inflamatorios, ya que se observa la presencia de células de la microglía activada y aumento de los niveles de citocinas inflamatorias en la SNpc y en el CE (Liu y cols., 2003; McGerr y McGeer, 2004). También los estudios en suero resultaron con niveles altos de marcadores inflamatorios en pacientes con la EP (Chen y cols., 2008). Otra consecuencia que puede generar una lesión cerebral

es el daño a la función mitocondrial y la excitotoxicidad de glutamato, eventos que se sabe están implicados en la EP (Jafari y cols., 2013).

Otra posible causa medioambiental que puede generar el desarrollo de la EP son las infecciones. Durante la pandemia de encefalitis letárgica que brotó en 1918, muchas personas que se infectaron, años después presentaron los síntomas de la enfermedad (Obeso, 2017). Sin embargo, hasta la fecha sigue en debate si este factor medioambiental tiene efecto o no, debido a que no se ha encontrado ninguna evidencia del virus de la influenza en el cerebro de los pacientes con la EP (Wirdefeldt y cols., 2011). Por último, si consideramos la hiposmia como daño medioambiental, la hipótesis de la disfunción olfatoria que no fue muy aceptada como pronóstico de la EP, en últimos años cobra mayor importancia, ya que algunos estudios prospectivos han examinado el riesgo de padecer la enfermedad años después de presentar daño olfatorio. Un estudio realizado en una familia con un grado 1 de pacientes con la EP, 4 de 25 familiares con alteraciones en el olfato tenían alteraciones en el transportador de DA en el CE. A los dos años del seguimiento 4 de los 40 familiares con hiposmia presentaron la EP, a los cinco años de seguimiento un pariente más con hiposmia presentó la EP. Todos los parientes que tuvieron hiposmia desarrollaron la EP y presentaron alteraciones. Por lo que, la presencia de este síntoma parece estar asociada con un mayor riesgo de desarrollar la EP, este síntoma se presenta de 2 a 7 años antes de aparecer la EP (Wirdefeldt y cols., 2011).

El parkinsonismo genético se presenta mayormente en personas menores de 50 años. Las principales mutaciones que se han observado en la EP y están bien

identificadas son: α -sinucleína (PARK 1) fue la primera mutación identificada en 1997, en una familia de origen italiana/americana y tres familias griegas que no estaban relacionadas, todas con herencia autosómica dominante (Polymeropoulos y cols., 1997). Parkina (PARK 2) en 1998 se identificó esta mutación en una familia japonesa con un parkinsonismo de inicio temprano autosómico recesivo (Kitada y cols., 1998). Representa aproximadamente la mitad de los casos con el EP, hasta la fecha se han informado cientos de casos con una amplia variedad de mutaciones de Parkina y se han encontrado en casi todas las etnias estudiadas. Aunque son más frecuentes los casos de inicio temprano y familiares, también se han detectado casos de inicio tardío. La Parkina es una ubiquitina ligasa con varios sustratos, uno de ellos es el glucosilado que forma la α -sinucleína (Schlossmacher y Shimura, 2005; Wirdefeldt y cols., 2011). Otras mutaciones que se han encontrado con menor frecuencia son: PINK 1 (PARK 6), en este gen se describieron dos mutaciones puntuales en familias italianas y una española con parkinsonismo autosómico recesivo. Debido a que la proteína PINK se encuentra situada en la mitocondria puede proteger a las neuronas de una disfunción mitocondrial (Valente y cols., 2004); y PARK 7 se han encontrado dos mutaciones en el gen DJ-1 en una familia holandesa y otra italiana con parkinsonismo de inicio temprano (Bonifati y cols., 2003). No se tiene mucho conocimiento de la función de esta proteína, sin embargo, se ha observado que incrementa en condiciones de estrés oxidante (Mitsumoto y Nakagawa, 2001).

Aunque se han reportado al menos 11 genes de la EP, la mayoría de ellos están asociados con la EP autosómica dominante o recesiva y los datos disponibles

indican que la proporción de enfermos con Parkinson atribuibles a mutaciones en ciertos genes es pequeña en comparación con el Parkinson esporádico.

1.4.3. *EP y disfunción mitocondrial*

Varios estudios sugieren que la disfunción mitocondrial participa en la patogénesis de la EP, ya que la actividad del complejo I mitocondrial de las neuronas dopaminérgicas se encuentra inhibido (Schapira y cols., 1989). Parker y cols. (1989) encontraron que la actividad del complejo I se encuentra disminuido (50%) en mitocondrias de plaquetas de pacientes con la EP. Otros autores describen una disminución del 35% en la actividad del complejo I de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Schapira, 2007) y del 59% en la corteza prefrontal (Navarro y cols., 2009). En esta misma región cerebral de pacientes con la EP una disminución del 54% de genes de proteínas que conforman el complejo I (Thomas y cols., 2012). Todas estas evidencias indican el daño al complejo mitocondrial; sin embargo, sigue siendo controvertido si la disfunción mitocondrial es una causa o consecuencia de la neurodegeneración en la EP.

1.5. Modelos experimentales de la EP

Se sabe que la disfunción mitocondrial participa en la fisiopatología de la EP; por lo que el generar modelos experimentales con daño mitocondrial es importante.

1.5.1. *6-hidroxidopamina (6-OHDA)*

Esta neurotoxina fue el primer modelo experimental de la EP que se empleó y se introdujo hace 30 años, aplicándola en cultivos celulares y animales para demostrar su efecto tóxico (6-OHDA) (Dauer y Przedborski, 2003; Petzinger y Jakowec, 2005). La similitud estructural entre la 6-OHDA y los neurotransmisores DA y norepinefrina, la hacen altamente afín al transportador de dichas catecolaminas. Una vez dentro de la neurona, la 6-OHDA se acumula en el citosol para posteriormente oxidarse y generar peróxido de hidrógeno a través de un proceso de oxidación enzimática mitocondrial (Yamato y cols., 2011) y paraquinonas, siendo estos altamente tóxicos para la neurona (Meredith y cols., 2008). Tiempos prolongados con dosis altas de 6-OHDA inducen daño parcial de la actividad del complejo I mitocondrial y generación del radical superóxido (Kupsch y cols., 2014). Todos estos compuestos tóxicos pueden dañar la permeabilidad de la membrana celular, oxidar proteínas y ácidos nucleicos (Berlett y Stadtman, 1997). Como la 6-OHDA no atraviesa la barrera hematoencefálica se administra directamente en la SNpc y el CE mediante una inyección unilateral (Javoy y col., 1976). La administración de 6-OHDA en ratas es el mejor modelo para evaluar: 1) acción farmacológica de nuevos compuestos del sistema dopaminérgico, 2) alteraciones de la conducta motora y 3) la neuroplasticidad de los ganglios basales ante el daño generado por la lesión en la vía nigroestriatal. También se puede emplear como un modelo de disfunción de la DA. La inyección estereotáxica de la 6-OHDA no modela todas las características patológicas de la EP, como daño en otras regiones cerebrales (locus coeruleus, núcleos basales de Meynert y núcleos del rafe).

Además, la formación de cuerpos de Lewy, característica patológica de la EP no se reproducen con este modelo (Petzinger y Jakowec, 2005).

Con respecto al papel de los mecanismos fisiológicos, se puede hacer la siguiente declaración simplificada: si la lesión con 6-OHDA no es extremadamente grave, excediendo una disminución del 80% de la DA en el CE, entonces difícilmente se podría generar el modelo experimental y el animal se recuperará varios días después de la lesión (Schwartz y Huston, 1996).

1.5.2. *Paraquat*

El paraquat es un herbicida que se descubrió en 1955 y desde entonces su uso se ha extendido a la agricultura, como método de prevención de la propagación de malezas acuáticas invasivas en diferentes tipos de sistemas acuáticos (Zhang y cols., 2016). Esta es la razón por la cual lo asocian como un factor de riesgo para desarrollar la EP (Dauer y Przedborski, 2003). El paraquat, al ser altamente lipofílico, atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y estando dentro de la célula es reducido por la nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido (NADPH) reductasa (Ratner y Feldman, 2005). Se sabe que esta toxina daña la actividad del complejo I mitocondrial (Chen y cols., 2017) y su toxicidad es producida por las ERO dentro de la mitocondria. Varios investigadores han demostrado que la administración de paraquat genera una pequeña disminución no significativa de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y desarrolla agregados de alfa-sinucleína (Meredith y cols., 2008). Recientemente se ha descrito que el paraquat es capaz de inducir la entrada rápida de Zn^{2+} extracelular a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, a

través de la activación del receptor ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA). El Zn^{2+} dentro de la neurona induce daño por la producción de las ERO (Tamano y cols., 2018). También se han estudiado los efectos del paraquat en los receptores D1 y D2, encontrando que el D1 se inhibe (vía directa) y el D2 se activa (vía indirecta). El desequilibrio en la modulación de los receptores nigroestriatales puede generar cambios en los mecanismos de señalización celular como quinasa G y ERK1/ MAP2 (Xu y cols., 2011). A pesar de estos estudios aún falta demostrar la muerte neuronal de manera progresiva y el daño motor

1.5.3. *MPTP*

La neurotoxina MPTP, como previamente se comentó, es un derivado meperidínico; es capaz de producir parkinsonismo en el hombre, primates y roedores (Dorman, 2015). La MPTP tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y ser metabolizado a 1-metil-4-fenilpiridino (MPP^+) por la monoamina oxidasa B en las células gliales. El MPP^+ como comparte semejanza estructural con la DA, fácilmente entra a las neuronas dopaminérgicas a través del sitio de recaptura del neurotransmisor (Dauer y Przedborski, 2003). Por lo cual, tiene la capacidad de destruir de manera selectiva a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, logrando de esta forma un modelo que reproduce algunos aspectos sintomatológicos, neuropatológicos y bioquímicos de la EP (Ratner y Feldman, 2005). Dentro de la neurona el MPP^+ puede permanecer en el citosol interactuando con enzimas citosólicas, especialmente con aquellas que tienen carga negativa. Los

niveles elevados del MPP⁺ en el citoplasma generan liberación y acumulo de glutamato, calcio libre y ERO dentro de la neurona. Esto conduce a la inhibición del complejo I de la CTE en la mitocondria y con ello se afecta la producción de ATP, llevando finalmente a la muerte neuronal (Dauer y Przedborski, 2003; Zeng y cols., 2018). Estudios neurofisiológicos muestran que en la línea de neuronas dopaminérgicas N27 expuestas a MPP⁺, ocurre disminución en la tasa de disparo, un menor número de picos e intervalos interpicos más espaciosos (Mythri y cols., 2017). En monos *Macaca mulatta* administrados con MPTP encontraron pérdida parcial de las proyecciones cortico-subtalámicas generando cambios funcionales en este sistema (Mathai y cols., 2015)

A diferencia de los otros modelos que si desarrollan los depósitos de alfa-sinucleína, el MPP⁺ no los produce (Dorman, 2015).

1.5.4. Genéticos

Como se mencionó anteriormente, es una minoría los casos de la EP generados por mutaciones genéticas autosómicas dominantes o recesivas. Sin embargo, estos casos son muy interesantes ya que la etiología de la enfermedad está, al menos en parte, identificada y ofrece el fundamento para el desarrollo de modelos experimentales con animales (Gubellini y Kachidian, 2015). Estos modelos se generan en ratones transgénicos y dependiendo del gen de interés, éste se puede alterar. Los “Knock out” son aquellos ratones en los que se modifican genéticamente uno o varios genes, en éstos se inactiva el genoma a través de técnicas de bloqueo de genes. En los “Knock in” se introduce un gen exógeno en un lugar específico en el

genoma y el último grupo es el de los “Knock down” a los cuales se les reduce la expresión de uno o más genes de su cromosoma a través de la inserción de pequeños fragmentos u oligonucleótidos cortos de ADN (Petzinger y Jakowec, 2005). Estos modelos transgénicos se han desarrollado para alterar proteínas como alfa-sinucleína, Parkina, PINK 1 y Dj-1, proteínas con alta prevalencia en la EP (Konnova y Swanberg, 2018; Gubellini y Kachidian, 2015). De los cuatro modelos transgénicos descritos, el que tiene relación con la función mitocondrial es PINK 1. Como se explicó anteriormente se encuentra dentro de la mitocondria y se considera que protege a las células de la disfunción mitocondrial (Valente y cols., 2004).

Respecto al mecanismo neurofisiológico poco se ha estudiado en estos modelos experimentales, sin embargo, en un modelo Knock out de Parkina en larvas de mosca *Drosophila* se describió el registro de nervios y observaron las frecuencias de ráfagas se redujeron con respecto a los normales, generando alteraciones en la actividad tónica. También el potencial de membrana en los knockout es más positivo y, por lo tanto, más cercano al potencial de inversión sináptica quedando el lado intracelular electropositivo con respecto al extracelular. Esta alteración electroquímica se denomina impulso nervioso. Este potencial de acción se convierte en un impulso propagado a lo largo de la fibra nerviosa, generando alteraciones motoras semejante al temblor en reposo en la EP (Vincent y cols., 2012).

1.5.5. *Rotenona*

La rotenona es un insecticida de origen natural extraído de las raíces de las plantas del género *Lonchocarpus* en el sur de América y *Derris* en Asia, y de algunas

plantas de la familia *Leguminosae* (Figura 6). Geoffroy en 1895, fue el primer investigador en aislar rotenona en condición pura y quien lo nombró fue Nagai en 1902, un químico hindú quien aisló el principio activo a partir de la planta del género *Derris chinensis* y le dio el nombre de “Roh-Ten” (Howard, 1942; Grünwald, 1942). Tiene características de insecticida reconocidas en el siglo XIX (Gruber y López, 2004). Es una molécula altamente lipofílica, por lo que atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y cualquier membrana celular (Jackson-Lewis y cols., 2012; Blesa y cols., 2012). Dentro de la célula, inhibe el complejo I mitocondrial de la CTE (Öberg, 1961; Gutman y cols., 1970) e incrementa las ERO en el citosol, que pueden generar daño oxidante al ácido desoxirribonucleico (DNA, siglas en inglés) como proteínas y lípidos de la célula. También las ERO pueden interactuar con el óxido nítrico, especialmente con el radical superóxido, dando origen a la formación del peroxinitrito que dañan los componentes de las neuronas dopaminérgicas (Cicchetti y cols., 2009). Además, se ha observado en líneas celulares que la rotenona puede inducir la desestabilización de microtúbulos *in vitro*, lo que aumenta la tubulina libre y reduce la tubulina polimerizada (Hongo y cols., 2012; Maldonado y cols., 2010; Choi y cols., 2011). La tubulina es el elemento funcional de los microtúbulos (tubos estrechos y huecos del interior de la célula), que participa en varios procesos intracelulares como el crecimiento neuronal, la morfología, el tráfico y la polaridad. La disfunción del citoesqueleto ha comenzado recientemente a estudiarse como un mecanismo importante involucrado en la neurodegeneración (Bisbal y Sanchez, 2019). En los últimos años la rotenona se ha empleado para generar daño al sistema dopaminérgico nigroestriatal (Greenamyre y cols., 2010; Lin y cols., 2012). La

infusión en ratas genera daño en las fibras dopaminérgica del CE, semejante a la EP idiopática (Greenamyre y cols., 2010). A nivel conductual se observa reducción en la movilidad, postura flexionada y en algunos casos rigidez muscular (Cannon y cols., 2009). La rotenona induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas con la formación de los cuerpos de Lewy, diferencia marcada con los otros dos modelos más utilizados para estudiar la EP, generados con MPTP o 6-OHDA (Perier y cols., 2003; Blesa y cols., 2012).

La EP tiene diferentes fenotipos y etiologías, y se acepta que la EP es el resultado de la interacción entre la herencia y los factores medioambientales. Actualmente, se dispone de varios modelos neurotóxicos de EP, en los que generalmente se obtiene la degeneración nigrostriatal de forma importante, y los síntomas motores de EP están bien replicados. Cada modelo tiene ventajas y desventajas, como han discutido en varios artículos. Dependiendo de la investigación que se quiera realizar será el modelo a escoger.

En este caso la administración de rotenona genera el modelo de daño mitocondrial al inhibir el complejo I, permitiendo modelar la patogénesis de la inhibición de este complejo en la EP (Schapira y cols., 1989; Navarro y cols., 2009). También el modelo genera los cuerpos de Lewy observados en la EP idiopática, cuerpos que no se ha observado en otros modelos experimentales (Perier y cols., 2003; Jackson-Lewis y cols., 2012). Además, debido a que la muerte celular dopaminérgica inducida por la rotenona ocurre más lentamente que en otros modelos experimentales, y solo después de la administración repetida, el uso de rotenona

Especies de plantas para extraer rotenona



Lonchocarpus



Derris elliptica



Piscidia erythrina

Figura 6. Especies de plantas de donde se extrae la rotenona (imágenes tomadas de los sitios rareflora, antropocene y medicalherbs: <https://www.rareflora.com/lonchocarpusvi.html>.; <https://antropocene.it/es/tag/derris-elliptica-y-rotenone/> y <http://medicalherbs.co.il/en/indexes/>).

permite el estudio de los cambios que se producen en las etapas iniciales de la EP (Greenamyre y cols., 2010; Johnson y cols., 2015; Bai y cols., 2016).

1.6. Tratamiento de la Enfermedad de Parkinson.

La EP no solo se define por alteraciones motoras, puede haber alteraciones en otras funciones del sistema nervioso, y estos síntomas se les conocen como no motores. Algunos de los síntomas pueden ser provocados o agravados por el tratamiento dopaminérgico (Sveinbjornsdottir, 2016).

Dentro del tratamiento para los síntomas motores esta la levodopa que es el “gold-standard” y fármaco más eficaz, desde que se descubrió en la década de los

50's (Carlsson y cols., 1957). Aunque el tratamiento de levodopa/carbidopa de preferencia se recomienda para personas de mayor edad, para las personas de inicio temprano con la enfermedad se comienza con agonistas dopaminérgicos ergóticos como la bromocriptina y cabergolina. Existen otros fármacos que han demostrado eficacia para el tratamiento de la enfermedad tanto en el aspecto motor como en el de los no motores. Entre ellos destacan la rasagilina (un inhibidor de la monoamina oxidasa B) y los agonistas dopaminérgicos no ergóticos como la rotigotina, pramipexol o ropinirol. Estos fármacos pueden ayudar a aminorar las fluctuaciones de la levodopa, disminuyendo los estados de "on" con discinesias o alteraciones comportamentales y los "off" o deterioro de fin de dosis (Martínez-Fernández y cols., 2016; Seppi y cols., 2019).

Dentro de los síntomas no motores se han observado depresión, ansiedad, psicosis, trastornos del sueño, hipotensión ortostática, disfunción genitourinaria, deterioro cognitivo y estreñimiento. Estos síntomas pueden presentarse debido al estado hipodopaminérgico del cerebro, por lo cual es preferible administrar agonistas dopaminérgicos o levodopa primeramente. De hecho, se ha demostrado que pueden mejorar síntomas como la apatía o el dolor tras la administración de estos fármacos. Dentro de los efectos adversos por el uso de estos fármacos encontramos: cefaleas, náuseas, edema, somnolencia, hipotensión, alucinaciones y pesadillas (Martínez-Fernández y cols., 2016).

La terapia quirúrgica es otro de los tratamientos de la EP y a este procedimiento se le denomina estimulación cerebral profunda, consiste en colocar un microelectrodo en una estructura cerebral estereotáxicamente e implantar un

estimulador en la pared torácica del paciente donde los parámetros de estimulación se ajustan por telemetría. Los electrodos se pueden colocar en el núcleo subtalámico, en el globo pálido o donde el neurólogo haya programado la instalación (Heumann y cols., 2014). Este procedimiento no solo mejora los signos y síntomas motores, también ayuda a reducir la dosis de levodopa diaria. Este tipo de cirugía moderna para el tratamiento del temblor y la EP fue introducida en 1987 por Benabid (Benabid y cols., 1988). Lamentablemente no todos los enfermos con Parkinson son candidatos a la estimulación subtalámica o del globo pálido. El estudio EarlyStim reveló que los pacientes con una duración corta de la enfermedad (<7,5 años) y una menor duración de las fluctuaciones motoras (<1,5 años) presentaron mejoras similares en la calidad de vida por la estimulación subtalámica en comparación con los pacientes más avanzados. También sólo son aspirantes los pacientes que respondan al tratamiento con levodopa (Sperens y cols., 2017).

Otro tratamiento “avanzado” es la bomba de infusión intestinal de gel de levodopa/carbidopa (LCIG siglas en inglés). Este gel contiene levodopa y carbidopa inhibidora de la descarboxilasa a concentraciones de 20 y 5 mg/ml, respectivamente. La forma en que se emplea este tratamiento es realizando una gastrostomía percutánea para la colocación de una sonda a nivel del duodeno, ésta se conecta con una bomba de perfusión que administra de manera continua levodopa en forma de gel. El fundamento de este tratamiento es evitar el paso de la medicación por el estómago, permitiendo una absorción menos errática del fármaco y, por lo tanto, una estimulación dopaminérgica continua. Basándose en este mecanismo, se ha demostrado que la LCIG mejora las fluctuaciones motoras y reduce las discinesias, y

es eficaz en el tratamiento de los síntomas no motores como el sueño, la fatiga o las alteraciones gastrointestinales (Timpka y cols., 2017).

Hace dos décadas se comenzó un nuevo tratamiento del que existe una amplia experiencia clínica y es la bomba de perfusión subcutánea de apomorfina. Se trata de un dispositivo que aporta de manera continua una dosis regulable de apomorfina a través de una aguja subcutánea que normalmente se coloca a nivel del abdomen. Se ha demostrado la eficacia de este tratamiento, tanto para los síntomas motores de la EP (Pahwa y cols., 2007) así como para las complicaciones derivadas del uso de la levodopa (García-Ruiz y cols., 2008) y aspectos no motores como el sueño (García-Ruiz, 2006), síntomas gastrointestinales (Martínez-Martin y cols., 2011) o urinarios (Christmas y cols., 1988).

Dentro del tratamiento para la EP se ha explorado la estimulación de campo magnético transcraneal (ECMT), es un método seguro y no invasivo que actúa a la corteza cerebral y no estructuras profundas. La capacidad de estimular las vías motoras corticoespinales permite evaluar su función en muchas afecciones neurológicas o controlarse durante los procedimientos quirúrgicos (Barker y cols., 1985). La técnica de ECMT se pueden usar para diagnosticar trastornos del movimiento y la evidencia indica su utilidad como herramienta terapéutica en la EP. Los estudios de ECMT han documentado varios cambios funcionales y coinciden en que hay una mayor inhibición en la corteza cerebral en pacientes con EP, lo que sugiere que la excitabilidad cortical está reducida. El nivel de excitabilidad cortical en pacientes con EP parece estar relacionado indirectamente con el funcionamiento nigrostriatal y el nivel de excitabilidad intracortical alterado se correlaciona con la

dosis total diaria de L-DOPA (L-3,4 dihidroxifenilalanina). Se han desarrollado varias técnicas de ECMT para investigar los circuitos inhibidores de la corteza motora primaria y se ha demostrado que existe un fuerte vínculo entre la plasticidad de la corteza motora primaria y el aprendizaje motor, ya que este último se ve afectado en pacientes con EP (Heumann y cols., 2014). Recientemente en varios estudios se reportó que la aplicación de los ECMT en modelos experimentales neurodegenerativos, no solamente previene la muerte neuronal, también induce la neurogénesis en la zona subventricular e incrementa el número de neuronas positivas a tirosina hidroxilasa (TH). Así como la recuperación de la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Medina-Fernández y cols., 2018).

Finalmente, es posible que se esté viviendo un renacer con respecto a las lesiones cerebrales para el tratamiento de la EP gracias al desarrollo del ultrasonido focal de alta intensidad guiado por Resonancia Magnética (High Intensity Focused Ultrasound). Este procedimiento, basado en la realización de termolesiones por confluencia de haces de ultrasonido en un punto del cerebro guiadas por Resonancia Magnética, se ha demostrado que el procedimiento es seguro y eficaz para el tratamiento del temblor esencial y parkinsoniano en el tálamo. Actualmente, se están realizando lesiones en los núcleos subtálamicos con resultados prometedores. Las principales ventajas de esta técnica son: 1) al no ser un tratamiento quirúrgico, se reduce drásticamente el aspecto invasivo y las posibles complicaciones derivadas de una cirugía; y 2) se reduce el periodo de convalecencia pos-tratamiento, que es virtualmente inexistente (Martínez-Fernández y cols., 2016).

A pesar de todos los tratamientos existentes para contrarrestar la sintomatología de la EP, ninguno consigue inhibir la muerte neuronal, por lo que es de vital interés encontrar compuestos coadyuvantes que contrarresten el daño a las neuronas dopaminérgicas sin que generen efectos colaterales severos.

1.7. Ácidos grasos poliinsaturados esenciales

Los ácidos grasos poliinsaturados esenciales son aquellos que el cuerpo no es capaz de sintetizar y deben incorporarse al organismo a través de la dieta. Estos ácidos grasos participan en el desarrollo y mantenimiento de una correcta función cerebral, en la visión, en el sistema inmune y la respuesta inflamatoria (Coronado-Herrera y cols., 2006). Los ácidos grasos son constituyentes tanto de los triglicéridos como de los lípidos complejos y pueden esterificar al colesterol. Los ácidos grasos de interés biológico son aquellos que tienen de 4 a 26 átomos de carbono; son en general insolubles en agua y ricos en energía metabólica. Se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo con la longitud de su cadena: cadena corta (4-6 carbonos), cadena media (8-12 carbonos), cadena larga (14-18 carbonos) y de cadena muy larga (20 ó más carbonos). También se clasifican de acuerdo a los dobles enlaces que presenten en: monoinsaturados (un doble enlace) ó poliinsaturados (más de un doble enlace) (Mataix y Gil, 2004).

Los ácidos grasos poliinsaturados se dividen en dos familias: omega-3 y omega-6. La identificación de la estructura de los ácidos grasos omega-3 y omega-6 se da de acuerdo con la ubicación de la primera doble ligadura a partir del metilo terminal (CH_3). En los primeros, esta doble ligadura se encuentra en el carbono 3

(C3-C4) y se pueden identificar también como n-3. En los segundos, la doble ligadura se encuentra en el carbono 6 (C6-C7) y se conocen como n-6. De estos ácidos grasos, el linoleico (omega-6), el α -linolénico (omega-3), el ácido araquidónico (omega-6), el ácido eicosapentaenoico (omega-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, omega-3) se ingieren a través de los alimentos y el organismo los utiliza para preservar las membranas de las células nerviosas (Coronado-Herrera y cols., 2006) (Figura 7).

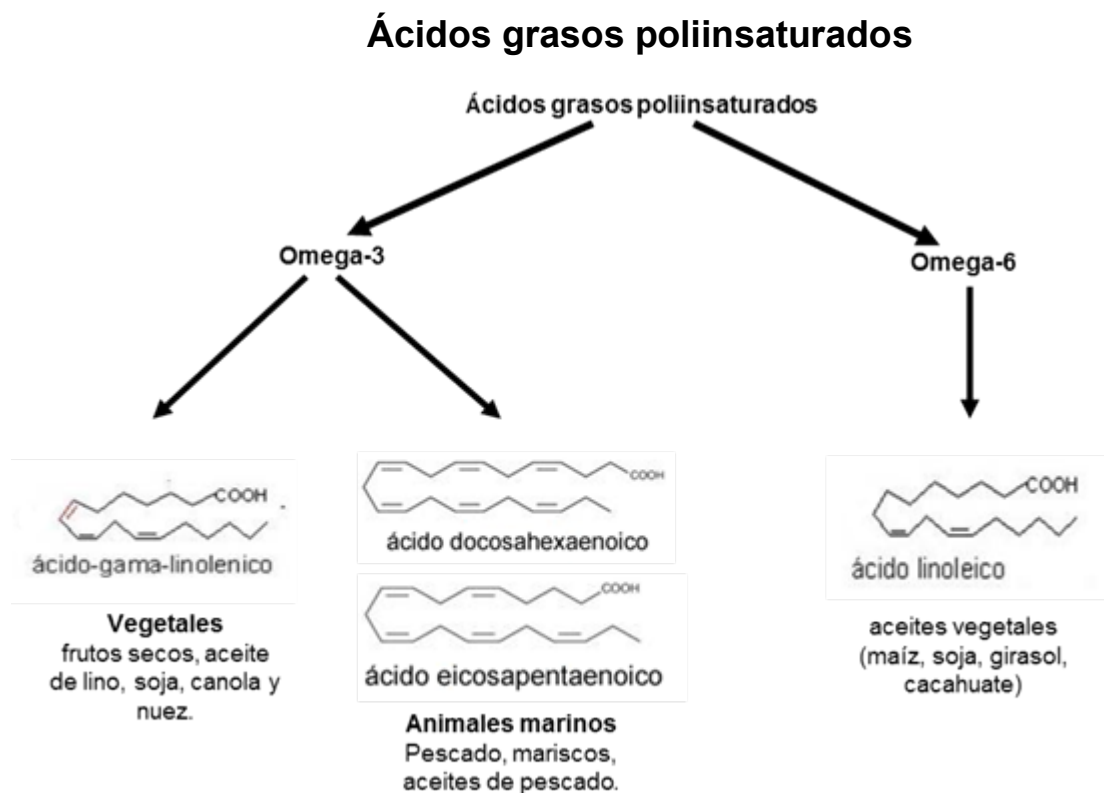


Figura 7. Clasificación de los ácidos grasos poliinsaturados.

Las plantas y las algas marinas poseen cierta maquinaria enzimática para sintetizar ácidos grasos omega-3, a partir de precursores de dos átomos de carbono.

Los peces se alimentan de las algas y éstos sintetizan ácidos grasos de cadena más larga, como el ácido eicosapentaenoico y el DHA (Bazan y cols., 2011). Los ácidos grasos omega-3 se pueden encontrar en el salmón, atún, fletán y camarones. También se encuentran en los aceites de semillas, como la chía y las semillas de lino, y en hojas verdes de plantas. Entre los alimentos que contienen ácidos grasos omega-6 se incluyen los aceites vegetales, como el de soja, cártamo o maíz, en frutos secos, germen de trigo, pepita de uva, cacahuate, semillas y en pequeñas cantidades en la carne y el huevo (Mataix y Gil, 2004).

El α -linolénico se absorbe en el intestino delgado distal de los peces y pasa a los enterocitos desde donde los quilomicrones lo llevan al hígado. En el retículo endoplásmico de los hepatocitos, el α -linolénico se biotransforma al ácido eicosapentaenoico y ácido tetracosahexaenoico, por una serie de reacciones de saturación y elongación. El ácido tetracosahexaenoico es dirigido al peroxisoma del hepatocito donde se remueven dos carbonos a través de una β -degradación y se forma el DHA en el hígado. No se tiene mucho conocimiento de los eventos celulares y moleculares que se llevan a cabo para captar y retener al DHA en el SNC, cuando el humano consume la carne de pescado. (Bazan y cols., 2011). Sin embargo, se sabe que el DHA que está empaquetado como lipoproteína de baja densidad ó unido a la albúmina, este es separado por las lipasas de lipoproteínas endoteliales de los capilares neurovasculares. Este DHA libre es tomado por los transportadores de ácidos grasos tipo 1, localizados en las células endoteliales, son dirigidos hacia los astrocitos para proveer soporte al endotelio y otras células del SNC. Los astrocitos

son la conexión directa entre los capilares neurovasculares, las sinapsis y otras redes neuronales. De tal manera, que el DHA es incorporado en las membranas celulares de los astrocitos y éstos los transfieren a las neuronas (Figura 8) (Moore y cols., 1991; Valenzuela y cols., 2008, Bazan y cols., 2011).

Síntesis del DHA y transporte a la neurona

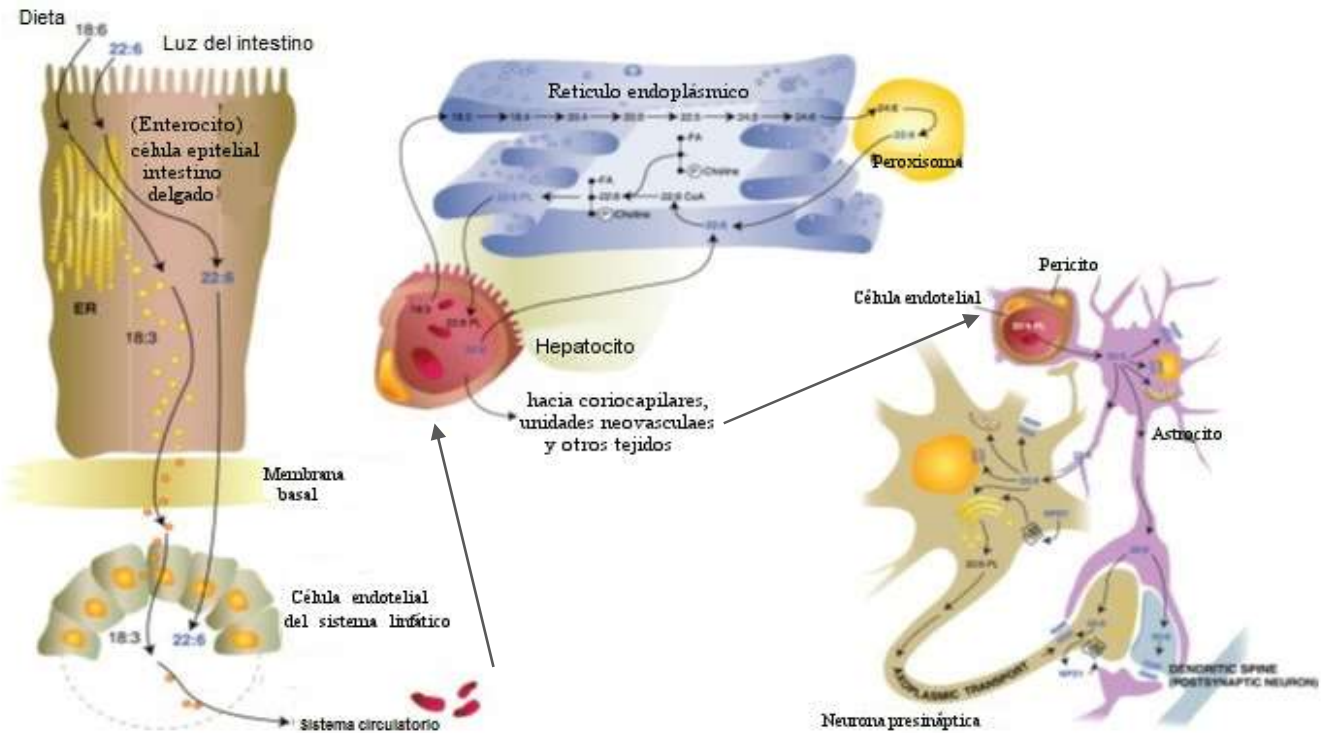


Figura 8. Síntesis del DHA en peces y su transportación hasta la neurona (modificado de Bazan y cols, 2001). DHA: ácido docosaheptaenoico

1.8. Efecto protector y neuroprotector del DHA

Cuando George y Mildred Burr en 1929 descubrieron los ácidos grasos poliinsaturados esenciales, demostraron que la falta de estos ácidos grasos en la

dieta produce problemas externos como resequedad de la piel y descamación, así como daño a los órganos internos que progresivamente puede llevar hasta la muerte (Burr y Burr, 1929). Por tal motivo, ha sido de gran interés estudiar el efecto de los ácidos grasos en la salud y en especial en el sistema nervioso, siendo éste la estructura del cuerpo humano que contiene gran abundancia de ácidos grasos poliinsaturados esenciales.

Pero antes de entrar al sistema nervioso es importante mencionar algunos de los efectos protectores de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3. Una dieta rica en éstos ácidos grasos (específicamente aceites de pescado) disminuyen del 25 al 30% los triglicéridos séricos (Gylling y Miettinen, 2001). Un meta-análisis que se realizó entre los años de 1985 al 2008, se observó que las personas que incluían en su dieta estos tipos de ácidos grasos, disminuía el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y los autores concluyeron que los omega-3, ricos en DHA, tenían efecto anti-inflamatorio, anti-hipertensivo e hipolipemiente (Nicholson y cols., 2013). Además se ha observado que tiene efectos sobre la función y la biogénesis mitocondrial del sistema nervioso (Kitajka y cols., 2002; Flachs y cols., 2005; Eckert y cols., 2013; Afshordel y cols., 2015).

Uno de los miembros más importante de los ácidos grasos polinsaturados es el DHA. El cerebro está conformado por 60% de ácidos grasos, de este porcentaje el 30 a 40% es DHA, que mayoritariamente se encuentra anclado en los fosfolípidos de la membrana celular (Figura 9, Horrocks y Farooqui, 2004). Se ha observado que el DHA juega un papel muy importante durante el desarrollo del sistema nervioso tanto

en la etapa embrionaria como en la posnatal (Janssen y Kiliaan, 2014; Gharami y cols., 2015).

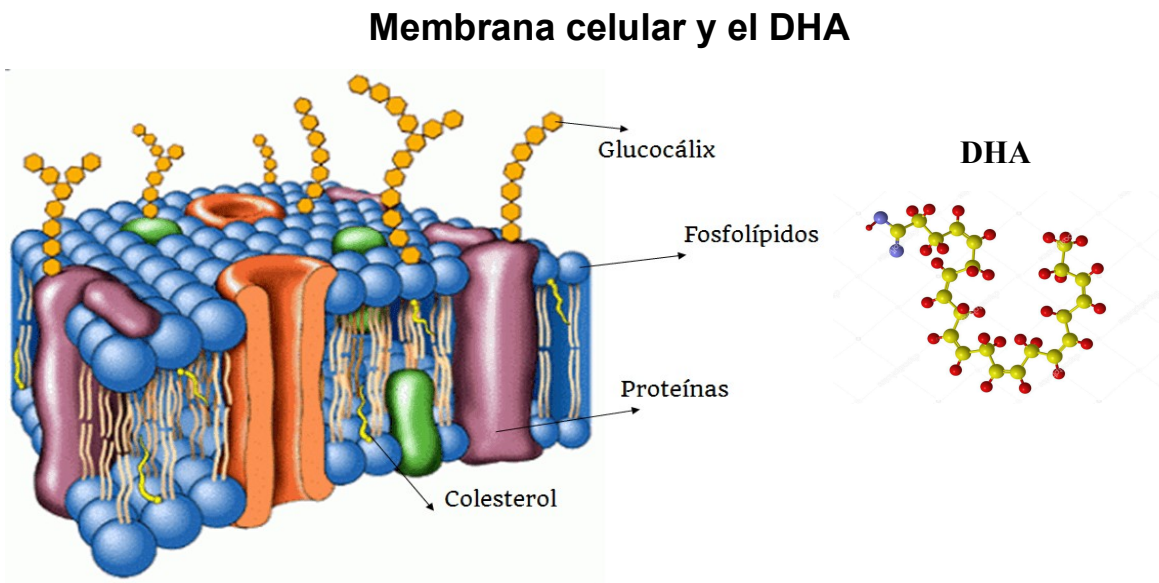


Figura 9. Ubicación del ácido docosahexaenoico (DHA) en la membrana celular.

Uno de los efectos neuroprotectores del DHA se ha observado en procesos inflamatorios, al ser precursor de la serie-3 de prostaglandinas y tromboxanos, así como de la serie-5 de leucotrienos que se sabe que tienen propiedades antiinflamatorias (Nicholson y cols., 2013). El DHA disminuye la expresión de proteínas que intervienen en las adhesiones intercelulares como la molécula de adhesión vascular que activa procesos inflamatorios (Calder, 2017). En pacientes de edad avanzada que presentaban deterioro cognitivo, el tratamiento con DHA (900 mg) durante 24 semanas mejora los procesos de aprendizaje y memoria. Estos

resultados apoyan la idea de que el suplemento alimenticio con DHA mejora los procesos cognitivos durante el envejecimiento (Yurko-Mauro y cols., 2010), sin que los pacientes presenten efectos secundarios adversos durante el tratamiento.

La acción protectora del DHA se debe a sus derivados como neuroprotectina D1, maresinas, neuroprostanos y derivados de cadenas de 22 carbonos (Bazan y cols., 2011). Dentro de estos derivados del DHA el más estudiado es la neuroprotectina D1, la cual se forma de la oxigenación del DHA por la 15-lipoxigenasa-1 (Calandria y cols., 2009). Este derivado induce señales de homeostasis/sobrevivencia en respuesta a un daño celular y sistémico y se ha observado que incrementa proteínas antiapoptóticas (Bcl2 y Bcl-xL) y disminuye proteínas proapoptóticas (Bax y Bad) ante el estrés oxidante y la activación de citocinas (Lukiw y cols., 2005; Hacioglu y cols., 2012; Afshordel y cols., 2015). Además, modula las acciones de las citocinas por su efecto anti-inflamatorio (Schwab y cols., 2007; Murphy, 2013). El DHA inhibe la expresión y actividad de la ciclooxigenasa-2 (Lee y cols., 2009) y recientemente se encontró que incrementa los niveles de proteínas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, siglas en inglés), sinaptofisina y PSD-95 (una proteína muy abundante en la zona postináptica), estas proteínas están involucradas en incrementar la memoria (Hashimoto y cols., 2017). Esto evidencia la participación activa del DHA en los procesos sinápticos ya que es uno de los componentes estructurales de la membrana neuronal (Tanaka y cols., 2012).

1.9. DHA y neuronas dopaminérgicas

Estudios postmortem en cerebros de pacientes con la EP, revelan alteraciones en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la membrana plasmática de la neurona, en particular el DHA y el araquidónico (Fabelo y cols., 2011). Se ha demostrado que la administración de DHA tiene efecto neuroprotector en las neuronas dopaminérgicas, empleando los modelos experimentales de la EP con 6-OHDA y MPTP en ratas. En el primer modelo el DHA aumenta los niveles de TH y sinapsina 1 en CE y con ello generó recuperación en la sinapsis nigroestriatal (Cansev y cols., 2008). En otro modelo se observó que el DHA incrementa la expresión del factor neurotrófico derivado de una línea celular glial (Tanriover y cols., 2010) y el número de neuronas positivas a TH en la SNpc, después de 30 días de administración con el DHA (Ozsoy y cols., 2011a). También regula la expresión del factor de transcripción Nrf2 y la expresión de la proteína antioxidante hemoxygenasa-1 (Ozkan y cols., 2016) e inhibe la expresión y actividad de la ciclooxigenasa-2, reduciendo el contenido de prostaglandinas-2, siendo estas inductoras de inflamación (Ozsoy y cols., 2011b). Como ya se había descrito el DHA activa proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 en la SNpc (Hacioglu y cols., 2012). Finalmente, la administración de DHA en primates lesionados con MPTP y posteriormente tratados con levodopa, reduce las discinesias generadas por el fármaco (Samadi y cols., 2006).

2. JUSTIFICACIÓN

La EP ha adquirido gran importancia por el aumento en el número de casos que se presentan cada año, al menos en México llegan al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” 250 casos anuales. Considerando esta incidencia, como la aparición de la enfermedad que se está presentando en edades jóvenes (25-35 años), pone a esta enfermedad neurodegenerativa como la segunda de relevancia a nivel mundial. Cuando en los años sesentas se descubrió que el neurotransmisor DA se concentra en CE y es quien controla la función motora, se dedicaron a realizar más estudios y llegaron a la conclusión de que la DA participa en la EP. Esto fue clave para encontrar el tratamiento de la enfermedad con la L-DOPA o también llamada levodopa (precursor de la DA). Durante años este tratamiento ayudó a combatir la acinesia (dificultad para iniciar movimientos) en los pacientes con Parkinson, sin embargo, se describieron efectos colaterales asociados con la terapia de L-DOPA. Después de un tratamiento prolongado con la L-DOPA aparecieron las discinesias y fluctuaciones motoras, afectando la calidad de vida de los pacientes. Todas las investigaciones para el tratamiento de la enfermedad se han enfocado en controlar los síntomas de la enfermedad, sin considerar la fuente iniciadora de la sintomatología, que es la muerte neuronal dopaminérgica. El enfoque de este estudio es buscar alternativas de tratamiento para inhibir la muerte neuronal progresiva que se presenta en la enfermedad. Es de vital interés encontrar compuestos coadyuvantes que contrarresten el daño a las neuronas dopaminérgicas, y también que estos compuestos no generen severos efectos colaterales como los medicamentos que

actualmente se emplean para el tratamiento, estos son: daño hepático, náuseas, vómito, alucinaciones, vasoespasmo, eritromelalgia, y somnolencia, entre otros. Todos estos efectos colaterales generan una pobre la calidad de vida a los pacientes sin tener alguna otra alternativa. Los ácidos grasos omega-3 pueden ser la opción para prevenir la muerte neuronal y con ello la aparición de la EP, de igual manera ser un coadyuvante en el tratamiento farmacológico al reducir la ingesta o eliminar, en un momento dado, los medicamentos que generan efectos colaterales severos. Este trabajo muestra el efecto del DHA sobre la función mitocondrial de las neuronas dopaminérgicas tras la administración de rotenona, un modelo útil en el estudio de las etapas tempranas de la EP.

3. HIPÓTESIS

La neuroprotección que confiere el DHA a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc se debe a que atenuará el daño en la función mitocondrial y proteínas que participan en la transmisión sináptica (sinaptofisina y tubulina).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Estudiar el efecto del DHA sobre la función mitocondrial de la vía dopaminérgica, así como los niveles de las proteínas tubulina y sinaptofisina en un modelo experimental de la EP realizado con rotenona.

4.2. Objetivos específicos

Evaluar en un modelo experimental de la EP inducido por rotenona el efecto del DHA sobre

- a) la actividad exploratoria erguida.
- b) el número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc.
- c) la densidad óptica de la marca de la TH en el CE.
- d) los núcleos celulares de la SNpc y el CE.

- e) la actividad del complejo I, los niveles de la proteína del complejo I, el consumo de oxígeno, la capacidad de síntesis de ATP y el potencial de membrana de mitocondrias aisladas del mesencéfalo y el CE.
- f) la ultraestructura de las mitocondrias de la SNpc y el CE.
- g) Los niveles de tubulina y sinaptofisina en el CE.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Reactivos adquiridos con Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA): DHA, dimetilsulfóxido, paraformaldehído, sacarosa, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, poli-L-lisina, hematoxilina, eosina, Tritón X-100, albúmina sérica bovina (BSA), carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), 2,6 diclorofenolindofenol (DCPIP), antimicina A, safranina O, hexokinasa, ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA), adenosin difosfato (ADP), rotenona, oligomicina A, ácido succinico, N-2-Hidroxiethylpiperazina-N'-2 ácido etanosulfónico (HEPES), dodecil sulfato de sodio (SDS), flavín adenín dinucleótido (FAD), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP+), digitonina, ubiquinone, sacarosa, cianuro de potasio (KCN), glutamato, manitol, cloruro de magnesio, percoll y un anticuerpo monoclonal α -tubulina (clone DM1A).

Anticuerpos adquiridos con Abcam (Cambridge, Reino Unido): anticuerpos primarios contra complejo I mitocondrial de la subunidad NDUFS3 y el canal anión dependiente de voltaje (VDAC-1).

Anticuerpo adquirido con Merck-Millipore (Darmstadt, Alemania): anticuerpo primario contra TH.

Anticuerpos adquiridos con Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, EUA): anticuerpo primario contra sinaptofisina y anticuerpos secundarios para inmunohistoquímica.

El estuche de sustrato de quimioluminiscencia Novex ECL se compró de Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

Los otros reactivos utilizados fueron de grado analítico y disponibles en el mercado.

5.2. Animales

Se utilizaron 120 ratas macho Wistar de 240-260 g, y los animales se mantuvieron en condiciones estándar (12/12 h de ciclo luz/obscuridad), temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad relativa (40%) con acceso al agua y alimento *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron bajo la Norma Oficial Mexicana sobre Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y fueron aprobados por el comité de cuidado y uso de animales del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en el protocolo (No. 07/12).

5.3. Grupos experimentales

Los animales se dividieron en cuatro grupos con 30 ratas cada uno:

Grupo Control: se administró solución salina (SS) oral durante 7 días y al siguiente día SS subcutáneamente durante 8 ó 14 días.

Grupo Rot: se administró SS oral durante 7 días y al siguiente día rotenona 3 mg/kg, subcutáneamente durante 8 ó 14 días.

Grupo DHA+Rot: se administró DHA 35 mg/kg, oral durante 7 días y al día siguiente rotenona 3 mg/kg, subcutáneamente durante 8 ó 14 días.

Grupo DHA: se administró DHA 35 mg/kg, oral durante 7 días y al siguiente día SS subcutáneamente durante 8 ó 14 días.

Previamente se ha observado que la administración de rotenona a estos días produce una disminución en la actividad locomotora y movimiento (Fleming y cols., 2004), reducción en los niveles de la proteína TH (Sonia Angeline y cols., 2012) como incremento en el número de células apoptóticas (Lin y cols., 2012). De tal manera que se administró un primer lote de animales a dos tiempos diferentes de rotenona para analizar la conducta exploratoria erguida, 24 horas después 8 ó 14 dosis de la toxina. El DHA (35 mg/Kg/24h) se administró vía intragástrica durante 7 días previo al tratamiento con rotenona. La dosis de DHA se escogió con base a la neuroprotección observada de 0.5 ml/kg de aceite de hígado de bacalao (Orozco-Ibarra y cols., 2018) y el contenido mínimo de DHA en el aceite de hígado de bacalao es aproximadamente el 7% (European Pharmacopoeia, 2007; Denny Joseph and Muralidhara, 2015), por lo cual calculamos la dosis de 35 mg/kg de DHA. De hecho, esta misma dosis se ha utilizado en otros estudios sobre la EP, se ha encontrado un efecto neuroprotector en varias pruebas de conducta (Ozkan, 2016).

5.4. Evaluación conductual

La actividad exploratoria es un índice indirecto para analizar el contenido del neurotransmisor de DA en el CE, ya que dicho neurotransmisor está involucrado en la regulación de la locomoción. El análisis conductual se realizó evaluando el número

de levantamientos del animal durante 5 min, en un cilindro de acrílico de 30 cm de largo y 19.5 cm de circunferencia (Schaar y cols., 2010), previo a su sacrificio. Todos los experimentos se realizaron por un solo operador en la fase de luz del ciclo circadiano entre las 7:00 y las 9:00 a.m. La prueba del cilindro es fácil de aplicar y da una evaluación objetiva sensible del daño crónico en las extremidades, que otras pruebas no detectan y tiene una alta fiabilidad (Brooks & Dunnett, 2009). Los resultados se expresaron como número de levantamientos durante 5 min.

5.5. Análisis histoquímico e inmunohistoquímico

Después del tratamiento, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (80 mg/kg, intraperitoneal) y se perfundieron vía intracardiaca con solución salina y posteriormente con paraformaldehído al 4%. Los cerebros se extrajeron y se pos-fijaron en paraformaldehído (4%) y se embebieron en parafina. Se realizaron cortes coronales (5 μ m) de cinco cerebros por grupo en donde se visualizaron el CE y la SNpc, estos cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina para analizar la morfología celular y la inmunohistoquímica en CE de alfa-tubulina y sinaptofisina. La cuantificación se realizó en 5 áreas (1392 X 1040 pixeles por cuadro) del CE de 4 cortes de cada animal, y se tomaron imágenes a un aumento de 40X usando el software Q-Capture Pro 7, 2010 adaptado en un microscopio Eclipse E200 Nikon. Los resultados se expresaron como número de núcleos dañados por área.

5.5.1. Cuantificación estereológica

Se realizaron cortes frontales (40 μm) de toda la SNpc y de seis a ocho cortes se emplearon para la inmunotinción de TH y los cortes se incubaron por flotación durante 48 h (1:500, en amortiguador de fosfatos conteniendo 0.3% de Triton X-100). Se empleó el sistema de inmunoperoxidasa de avidina-biotina (Santa Cruz) junto con el cromógeno tetracloruro de 3,3'diaminobenzidina (0.3%). El número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc se estimó con un método estereológico (West y cols., 1991), utilizando un software estereológico versión 11 (MBF Bioscience) integrado por un microscopio Olympus BX51 conectado a una cámara de video digital (MBF Bioscience). El conteo se realizó con el objetivo 60X y un fraccionador óptico con las siguientes dimensiones 87 X 130 μm . El análisis se realizó sin que el observador estuviera enterado del tratamiento del animal.

5.5.2. Análisis densitométrico de TH en CE

Se obtuvieron cortes frontales (5 μm) de CE para la tinción de la TH en las fibras estriatales. Las imágenes se capturaron usando el software Q-Capture Pro 7, 2010 adaptado a un microscopio Eclipse E200 Nikon, posteriormente con el programa Imagen J (Rasband, 1997-2016, versión 1.45) se determinó la densidad de la TH de la manera previamente descrita (Rojas y cols., 2008). Se digitalizó cada imagen a ocho bits delineando el estriado y utilizamos valores de escala de grises que oscilaban entre 0 y 255 píxeles. Se examinaron ocho secciones de tejido de cada animal con un aumento de 1X. Los resultados se expresaron como densidad óptica integrada.

5.5.3. Análisis densitométrico de α -tubulina y sinaptofisina en CE

Se emplearon otros cortes de CE para incubarlos con los anticuerpos α -tubulina (1:500) y sinaptofisina (1:500). Después de la incubación con los anticuerpos primarios a temperatura ambiente durante 40 min se incubó con un anticuerpo secundario anti-ratón IgG biotilado. Subsecuentemente se incubó con estreptavidina por 40 minutos y se visualizó la marca con diaminobencidina. Los cortes de las cuatro condiciones experimentales se procesaron al mismo tiempo, a fin de disminuir las variaciones en la tinción. El análisis densitométrico de la inmunotinción de α -tubulina y sinaptofisina se realizó igual que el de TH. Se examinaron 5 áreas en CE de seis a ocho cortes por rata con un aumento de 40X. Cada imagen se digitalizó a 8 bits con un tamaño de imagen de 11.8 x 8.8 cm, proporcionando valores de escala de grises entre 0 y 255 píxeles. Los resultados se expresaron como densidad óptica integrada.

5.6. Aislamiento de mitocondrias

Las mitocondrias del CE y mesencéfalo ventral (región cerebral donde se localiza la SNpc) se aislaron por el método de Chinopoulos y cols., (2011). El tejido se homogenizó en un amortiguador de aislamiento frío con la siguiente composición: manitol 225 mM, sacarosa 75 mM, EGTA 1 mM, albúmina sérica bovina 0.1%, y HEPES 10 mM, pH 7.2. La separación de las mitocondrias se realizó con centrifugaciones en diferentes gradientes de percoll. Para comprobar la pureza de la

extracción mitocondrial se realizaron pruebas de microscopia electrónica de acuerdo a lo descrito por Luis-García y cols. (2017).

5.7. Determinación de la actividad del complejo I

Para evaluar el grado de inhibición del complejo I generado por el tratamiento con rotenona, se midió la actividad de este complejo de la manera previamente descrita (Luis-García y cols., 2017). Se preparó una mezcla de reacción con albúmina sérica bovina 3 mg/ml, decil ubiquinona 60 μ M, NADH 60 μ M, KCN 2 mM y antimicina A 2 μ M y DCPIP 160 μ M. Cuando la reacción comenzó se adicionaron 5 μ l de muestra de la fracción mitocondrial y se midió la disminución en la absorbancia a 340 nm por 3 minutos. En una reacción paralela, se determinó la actividad insensible a rotenona al adicionar rotenona 4 μ M a la mezcla de reacción. Los resultados se expresaron en nmoles de DCPIP por minuto por mg proteína.

5.8. Análisis de la proteína del complejo I por western blot

Se utilizó SDS-PAGE para separar las proteínas mitocondriales del mesencéfalo ventral y del CE, se transfirieron a las membranas de difluoruro de polivinilideno (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.). Las membranas se incubaron con leche al 5% en PBS con Tween al 0.01% durante dos horas. Posteriormente, se incubaron las membranas en anticuerpos primarios contra la subunidad NDUFS3 del complejo I mitocondrial (1:5000; ab14711) durante la noche. Al día siguiente, las membranas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG hecho en cabra conjugado con peroxidasa de rábano a una dilución de 1:15000. La

quimioluminiscencia se analizó por ImageJ (Rasband, 1997-2016, versión 1.45). Los resultados se expresaron densidad de complejo I / VDAC-1.

5.9. Parámetros respiratorios

La respiración mitocondrial (consumo de oxígeno) se midió con un electrodo tipo Clark, tal como Luis-García y cols. (2017) utilizando un medio de respiración compuesto por $MgCl_2$ 15 mM, sacarosa 210 mM, manitol 660 mM, KH_2PO_4 30 mM, EGTA 30 mM, BSA 0.3%. La CTE se alimentó con glutamato/malato 10 mM/ 5 mM para el complejo I y succinato 14 mM para complejo II. El consumo de oxígeno en estado estacionario (respiración en estado 4*) se inició por la adición de 0.5 a 1.0 mg de proteína mitocondrial a este medio. La respiración en estado fosforilante (respiración en estado 3*) se inició agregando ADP 200 μM . Una vez que se ha consumido el ADP, se adicionó oligomicina 1 μM para inhibir la reacción. El índice de control respiratorio (ICR) es la relación entre la velocidad del consumo de oxígeno en estado 3 sobre el estado 4 y proporcionó la estimación del acoplamiento de la síntesis de ATP al flujo de electrones. Un ICR de 1 ocurre en mitocondrias no acopladas, mientras que un $ICR > 4$ se presente en mitocondrias acopladas. Por lo cual se consideraron valores mayores a 3 de ICR en el grupo control para el análisis estadístico.

5.10. Determinación de la capacidad de síntesis de ATP

La capacidad de síntesis de ATP se midió mediante un ensayo enzimático basado en la detección del incremento en la producción de NADPH a partir de

NADP⁺ (Luis-García y cols., 2017). Se preparó una mezcla de reacción con 163 µg/ml hexocinasa, 2 U/mL glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 20 mM glucosa, 1.4 mM NADP⁺ y como sustratos (10 mM/5 mM glutamato/malato o 14 mM succinato) que reaccionó con 10 µg de proteína mitocondrial. Todas las evaluaciones se hicieron por duplicado para determinar la síntesis basal de ATP. El cambio en la absorbancia debido a la reducción del NADP⁺ se midió a 340 nm. El cálculo de la actividad se realizó usando el coeficiente de extinción del NADPH ($6.22 \times 10^3 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$). Los resultados se expresaron como nmol por minuto por miligramos de proteína.

5.11. Potencial de membrana

El potencial de membrana mitocondrial se estimó mediante los cambios en la fluorescencia de la safranina O como previamente describieron Luis-García y cols., (2017). La mezcla de reacción contenía 25 µg de proteína mitocondrial, 10 µM safranina O y los sustratos mitocondriales (10 mM/ 5 mM glutamato/malato o 14 mM succinato). El potencial transmembranal se disipó al adicionar 200 µM FCCP y se registraron los cambios de fluorescencia a 495 y 586 nm de excitación y emisión, respectivamente. Los resultados se expresaron como porcentaje de cambio de fluorescencia con respecto al control.

5.12. Microscopía electrónica

Se extrajeron la SNpc y el CE que se fijaron en glutaraldehído 2.5% durante 1 h, posteriormente se post-fijaron en tetróxido de osmio 1% por 1 h y subsecuentemente el tejido se deshidrató hasta incluirse en Epon. Se realizaron

cortes semifinos de 1 mm, en un ultramicrotomo Sorval MT 6000, de cada bloque y se tiñeron con azul de toluidina para identificar el área de interés, una vez identificada se hicieron cortes ultrafinos de la SNpc y el CE. Se obtuvieron de once a trece cortes seriados ultrafinos (60–80 nm) de cada bloque con una cuchilla de diamante y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Con ayuda de un microscopio electrónico de transmisión (JEM-1400 Plus, JEOL), se tomaron imágenes para visualizar la ultraestructura mitocondrial.

5.13. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como promedio \pm error estándar de la media (EEM) y se hizo el análisis de ANOVA de una vía seguida de la prueba de mínima diferencia significativa entre grupos de Duncan y se realizó mediante el paquete estadístico de ciencias sociales (SPSS). Las diferencias se consideraron significativas con un valor de mínimo de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

Efecto neuroprotector del DHA

La administración subcutánea de rotenona (3 mg/kg/día) durante 8 o 14 días disminuyó la actividad exploratoria 43% a 8 días y 56% a 14 días (Figura 10). La administración intragástrica de DHA (35 mg/kg/día) previno la disminución en la actividad exploratoria del 54% cuando se compara con el grupo de animales administrados con rotenona (Figura 10A). En el grupo de 14 días de administración con rotenona, el DHA no tuvo ningún efecto protector en la evaluación conductual (Figura 10B). La simple administración de DHA no modificó la conducta exploratoria en ambos tiempos de la inyección subcutánea de rotenona (Figura 10A y 10B). Dados estos hallazgos, el resto de las evaluaciones sólo se realizaron después de ocho días de administración de rotenona.

Se analizó el efecto de la rotenona y el DHA en la morfología celular y el número de neuronas dopaminérgicas en SNpc. En la Figura 11 se presentan imágenes representativas de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc, así como las fibras del CE positivas a TH. Las neuronas dopaminérgicas disminuyeron (21%) en la SNpc de ratas tratadas con rotenona en comparación con los controles, y la administración de DHA impidió la reducción en el número de neuronas (grupo DHA + Rot) en aproximadamente un 30% al comparar con el grupo de rotenona. El análisis densitométrico reveló que la densidad de las fibras estriatales positivas a TH en CE se redujo en aproximadamente un 20% en ratas tratadas con rotenona, pero este efecto no fue estadísticamente significativo. Sin embargo, la densidad de las fibras del estriado positivas a TH aumentó significativamente en aproximadamente un 34%

en el grupo tratado con DHA y rotenona en comparación con el grupo que recibió rotenona solamente (Figura 12B).

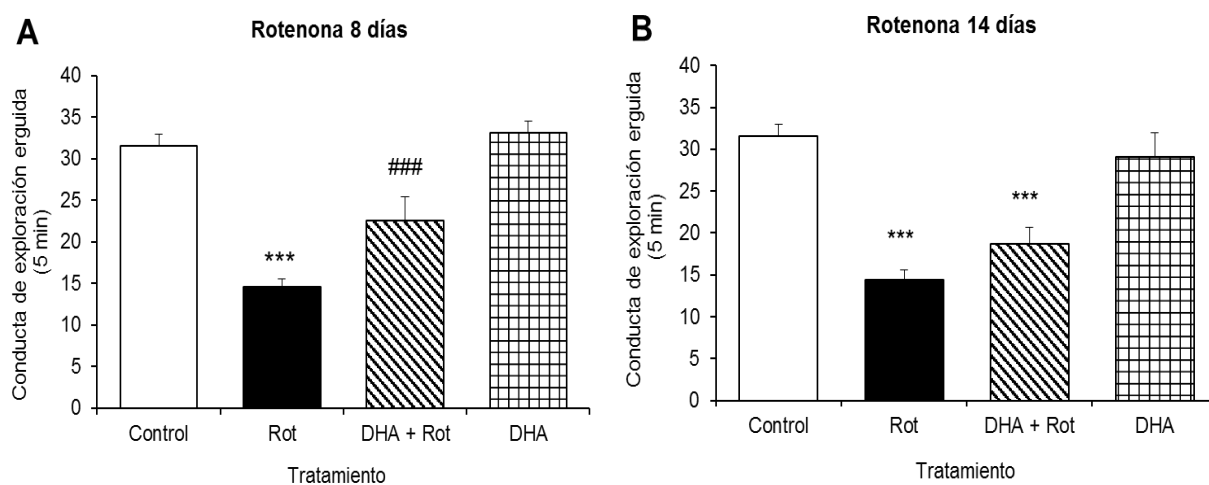


Figura 10. Efecto de la Rot y del DHA en la conducta de exploración erguida. Se cuantifico el número de veces que la rata se pone en posición erguida y toca la pared del cilindro durante el tiempo de 5 minutos, valor de media \pm Error estándar, $n=5-10$ por grupo. (A) ocho y (B) catorce días de rotenona. Las diferencias estadísticas se analizaron con ANOVA de una vía seguido de una post hoc de Duncan. *** $p<0.001$ vs control y ### $p<0.001$ vs Rot.

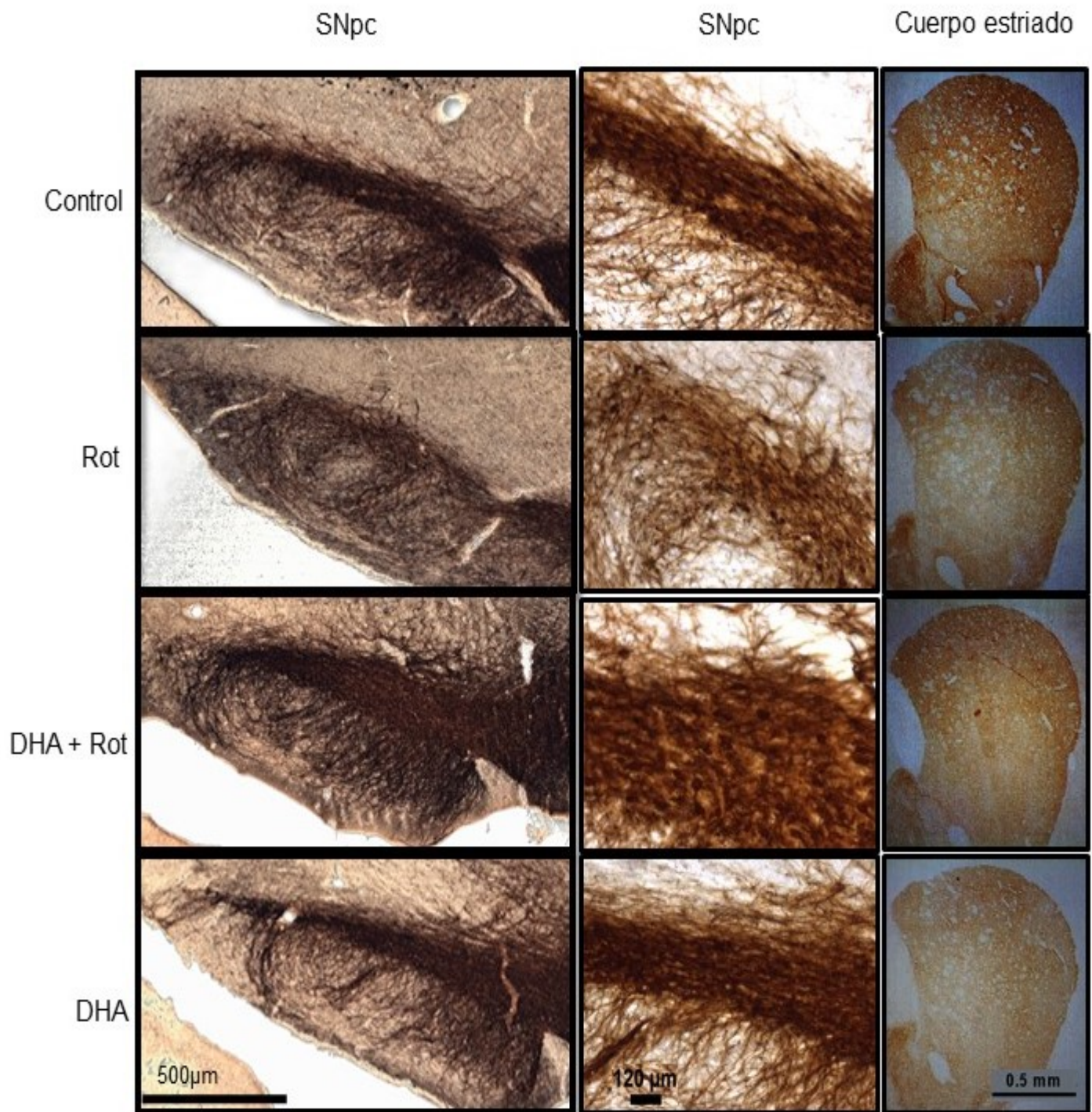


Figura 11. Imágenes representativas de la cuantificación del número de neuronas y densidad óptica integrada del efecto de la Rot y del DHA en la expresión de TH en la SNpc y cuerpo estriado.

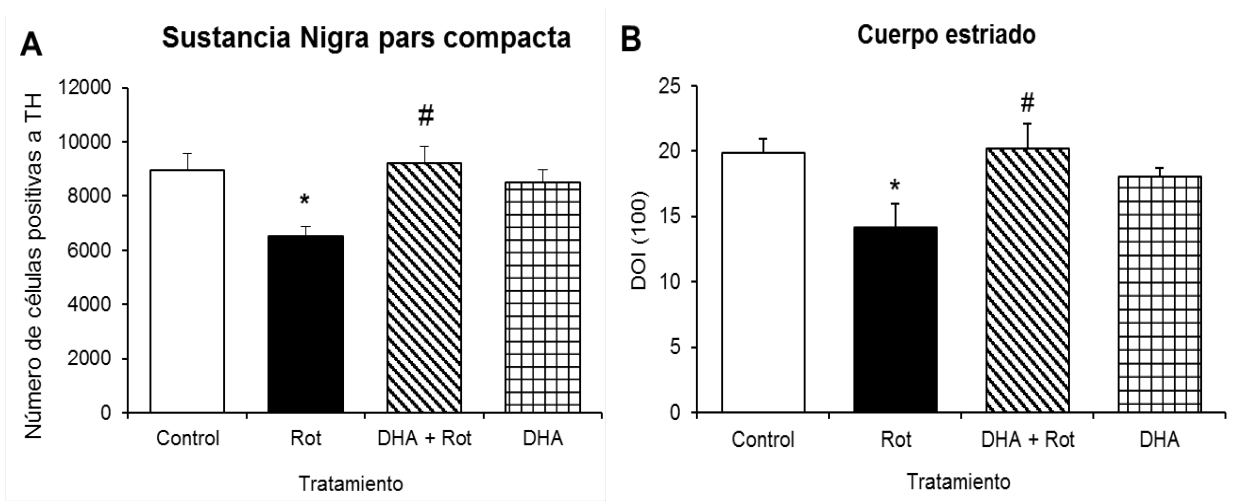


Figura 12. Efecto de la Rot y del DHA en la expresión de TH en SNpc y cuerpo estriado. A) Cuantificación del número de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta. B) Densidad óptica integrada (DOI) de las fibras estriatales positivas a TH. Valor de media \pm error estándar, $n=5$ por grupo. Las diferencias estadísticas se analizaron con ANOVA de una vía seguido de una post hoc de Duncan. * $p<0.05$ vs control y # $p<0.05$ vs Rot.

La tinción de hematoxilina y eosina evidenció daño en la morfología celular de SNpc y CE en ratas administradas con rotenona al comparar con el grupo control (Figura 13C vs 13A y Figura 13D vs 13B). La administración de DHA previno parcialmente el daño morfológico generado por la rotenona en ambas regiones cerebrales (Figura 13E vs 13F). El grupo de animales administrados solamente con DHA no se modificó la morfología celular en SNpc (Figura 13G) y CE (Figura 13H). En el análisis estadístico se observó un incremento significativo en el número de núcleos dañados en el grupo administrado con rotenona, al compararse con el grupo control en SNpc (294%) y CE (368%), siendo esta última la región cerebral la más afectada (Figura 14). El pretratamiento con el DHA previno dicho incremento generado por la rotenona en la SNpc y el CE (32% y 44%, respectivamente).

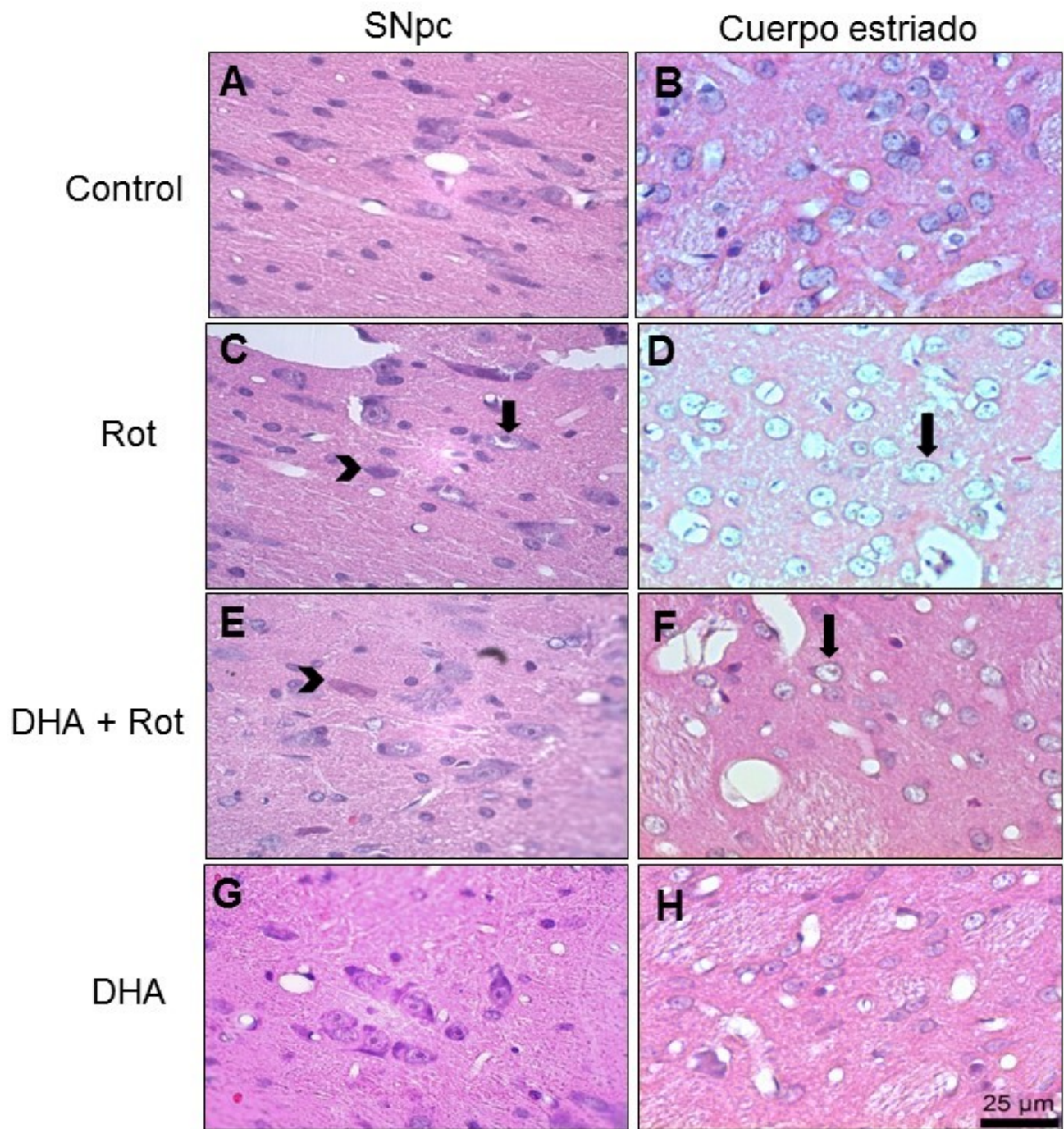


Figura 13. Tinción de Hematoxilina-eosina. Cortes coronales de SNpc y cuerpo estriado, imágenes tomadas a 100X. Flechas indican células con núcleos dañados. Cabezas de flechas indican células degeneradas. Rot: Rotenona. DHA: Ácido docosahexaenoico.

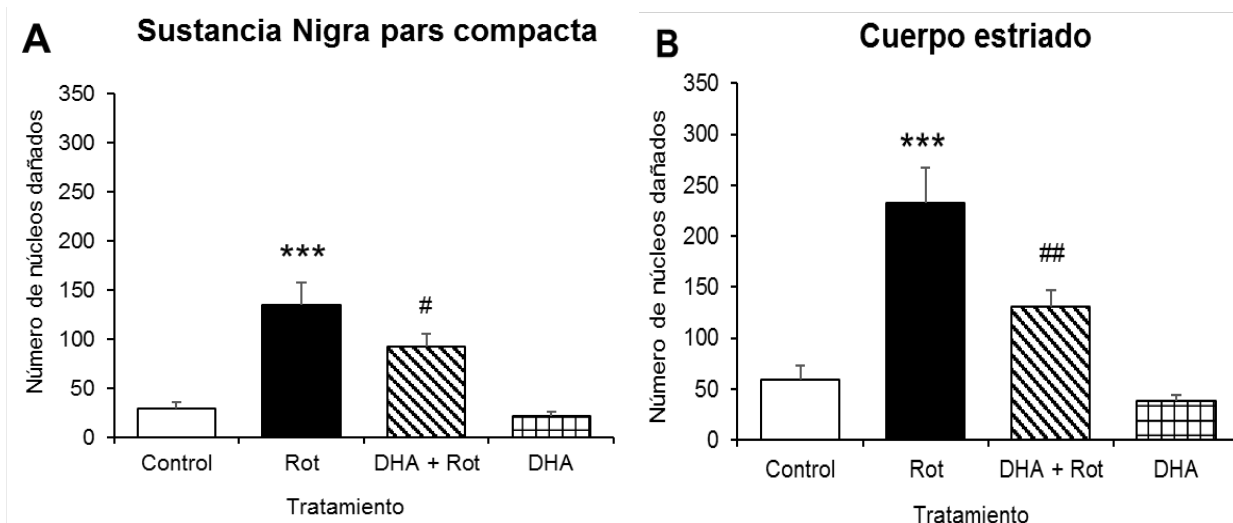


Figura 14. Cuantificación del número de núcleos dañados en (A) sustancia nigra pars compacta y (B) cuerpo estriado. Se presentan valores de media \pm error estándar, $n=5$ por grupo. Las diferencias estadísticas se analizaron con ANOVA de una vía seguido de una post hoc de Duncan. *** $p<0.001$ vs control. # $p<0.05$ vs Rotenona y ## $p<0.01$ vs Rotenona. Rot: Rotenona. DHA: Ácido docosahexaenoico.

Función mitocondrial

Para corroborar que el aislamiento mitocondrial estuviera puro y con mitocondrias intactas, se realizó un estudio de ultraestructura (Figura 15). La fracción mitocondrial que se extrajo fue de una pureza alta, no se observó contaminación de otros organelos de la célula y las crestas mitocondriales se preservaron durante la extracción (Figura 15B). El primer parámetro de la función mitocondrial analizado fue la actividad del complejo I, para evidenciar si la rotenona inhibió su actividad. La administración de rotenona durante 8 días no afectó la actividad del complejo I en mesencéfalo y CE de igual forma el DHA sólo o como pretratamiento antes de la rotenona, no modificó la actividad del complejo (Tabla 1).

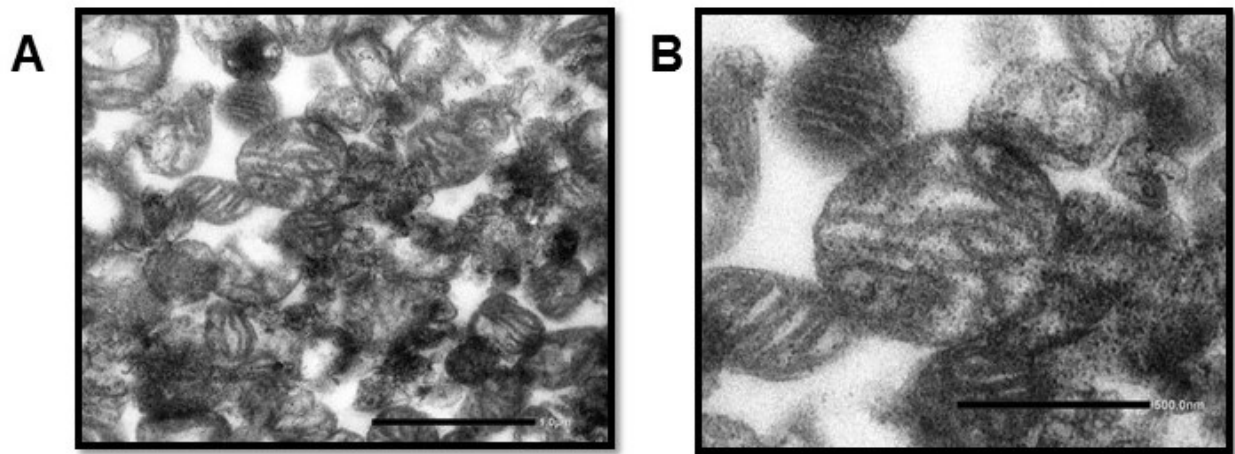


Figura 15. Imagen representativa del aislamiento de la fracción mitocondrial de cuerpo estriado, de ratas sin tratamiento. A) Imagen panorámica de mitocondrias sin contaminación de otros organelos. B). Imagen representativa de la preservación de las crestas mitocondriales. El aislamiento esta descrito en material y método.

Tabla 1. Actividad del complejo I mitocondrial

	Mesencéfalo	Cuerpo estriado
Control	71.7 ± 8.4	62.6 ± 4.8
Rot	62.4 ± 8.9	64.2 ± 5.7
DHA + Rot	73.3 ± 10.9	58.6 ± 8.1
DHA	68 ± 8.5	63.2 ± 7.9

Efecto de Rot y el DHA en la actividad del complejo I mitocondrial. Se muestran valores de media ± error estándar, n=8 por grupo. Diferencias estadísticas se analizaron con ANOVA de una vía seguido de una post hoc de Duncan.

El análisis de los niveles de proteína del complejo I por western blot, confirmó que la rotenona no afecta los niveles de proteína del complejo en el mesencéfalo como en CE (Figura 16). Sin embargo, la administración de DHA incrementó los niveles de proteína en mesencéfalo cuando se compara con el grupo rotenona (Figura 16A).

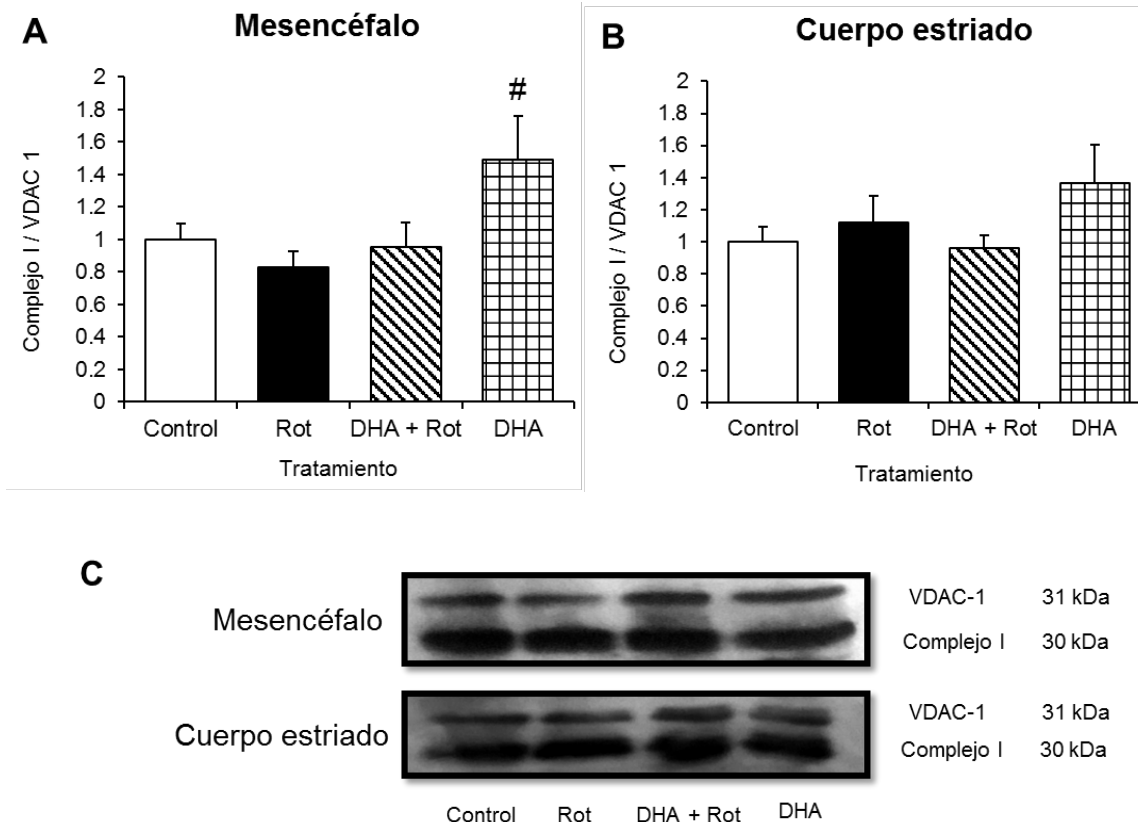


Figura 16. Efecto de Rot y el DHA en la expresión de la proteína del complejo I mitocondrial en (A) mesencéfalo y (B) cuerpo estriado. (C) Western blot representativo del complejo I y el canal anión dependiente de voltaje (VDAC-1) empleados para el análisis densitométrico de complejo I / VDAC-1. Se presentan valores de media \pm error estándar, $n=4$ por grupo. Las diferencias estadísticas se analizaron con ANOVA de una vía seguido de una post hoc de Duncan. # $p<0.05$ vs Rotenona.

Los siguientes parámetros de la función mitocondrial que se analizaron fueron ICR, capacidad de síntesis de ATP y el potencial transmembranal en mesencéfalo (Tabla 2), alimentando la cadena de transporte de electrones con glutamato/malato ó succinato. La rotenona o el DHA no tuvieron efecto sobre la función de los parámetros mitocondriales analizados.

Tabla 2. Análisis de parámetros funcionales de mitocondria en mesencéfalo. Alimentando la cadena de transporte de electrones con glutamato/malato y succinato.

Mesencéfalo	Glutamato/malato			Succinato		
	ICR	Capacidad de Síntesis de ATP	Potencial transmembranal	ICR	Capacidad de Síntesis de ATP	Potencial transmembranal
Control	6.5 ± 1.0	104.2 ± 6.7	100 ± 25.6	3.3 ± 0.2	67.3 ± 7.4	100 ± 14.3
Rot	5.2 ± 1.0	98.0 ± 9.9	105 ± 17.2	3.2 ± 0.1	66.7 ± 5.2	107 ± 14.9
DHA + Rot	5.9 ± 1.2	117.5 ± 6.6	94.7 ± 10.0	3.2 ± 0.1	86.7 ± 9.4	91.8 ± 24.1
DHA	7.7 ± 0.4	95.6 ± 3.7	103.3 ± 13.0	3.5 ± 0.4	66.8 ± 8.8	96.9 ± 8.1

Se muestran valores de media ± error estándar, n=3-5 por grupo. Diferencias estadísticas se analizaron con ANOVA de una vía seguido de una post hoc de Duncan.

En la tabla 3 se muestran los resultados del análisis de la función mitocondrial en el CE y no mostró diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los parámetros analizados.

Tabla 3. Análisis de los parámetros funcionales de la mitocondria en el CE. Alimentando la cadena de transporte de electrones con glutamato/malato y succinato.

CE	Glutamato/malato			Succinato		
	ICR	Capacidad de Síntesis de ATP	Potencial transmembranal	ICR	Capacidad de Síntesis de ATP	Potencial transmembranal
Control	6.9 ± 1.0	104.9 ± 7.5	100 ± 6.7	3.0 ± 0.2	67.1 ± 5.7	100 ± 8.4
Rot	5.2 ± 1.0	103.2 ± 14.7	97.8 ± 12.7	3.2 ± 0.2	68.5 ± 15.0	97.7 ± 24.6
DHA + Rot	6.2 ± 0.0	110.6 ± 6.7	91.4 ± 10.5	3.3 ± 0.1	76.2 ± 7.1	98.8 ± 15.0
DHA	7.9 ± 0.8	107.9 ± 4.6	84.9 ± 7.0	3.6 ± 0.2	69.1 ± 15.6	99.5 ± 24.2

Se muestran valores de media ± error estándar, n=3-5 por grupo. Diferencias estadísticas se analizaron con ANOVA de una vía seguido de una post hoc de Duncan.

En el análisis ultraestructural se observaron células normales (material granular denso en el soma, algunas vesículas lisosómicas y pocas vacuolas fagocíticas) en la SNpc del grupo control (Figura 17A). En el CE se muestran sinapsis axo-dendríticas con preservación mitocondrial adecuada (Figura 17B y 17C). La administración de rotenona en la SNpc (Figura 17D) y CE (Figura 17E y 17F) aumentó el número de vesículas lisosomales electrodensas, así como vesículas autofágicas que revelan diversos grados de degradación y mitocondrias hinchadas parcialmente destruidas. También se observaron numerosas vacuolas y presencia de microglía fagocítica reactiva en SNpc de ratas que recibieron la administración de rotenona (Figura 17D), mientras que el CE se observó dilatación por daño de mielina de las membranas y terminales nerviosas (Figuras 17E y 17F). El pretratamiento con DHA redujo la inflamación mitocondrial y la activación microglial, generado por la rotenona en la SNpc (Figura 17G) y en el CE (Figuras 17H y 17I). La sola administración del DHA no modificó la morfología ultraestructural de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Figura 17J), ni las terminales nerviosas en el CE (Figura 17K y 17L).

Por último, se analizó si la administración de rotenona o DHA tiene algún efecto sobre los microtúbulos que constituyen el citoesqueleto celular en el CE, y la rotenona disminuye la marca positiva de la α -tubulina en aproximadamente el 37% y el pretratamiento con DHA previno esta disminución generada por la rotenona en aproximadamente 39%. El grupo que sólo recibió DHA no mostró efectos sobre la α -tubulina (Figuras 18A y 18B). Finalmente, evaluamos el efecto de la administración de rotenona o DHA sobre la transmisión sináptica en el CE y los resultados de la

inmunohistoquímica revelaron que la rotenona redujo la sinaptofisina un 31% en comparación con el grupo control. La administración de DHA y posteriormente rotenona previno 39% esta reducción y la sola administración de DHA aumentó la sinaptofisina 12% en comparación con el grupo de control (Figuras 19A y 19B).

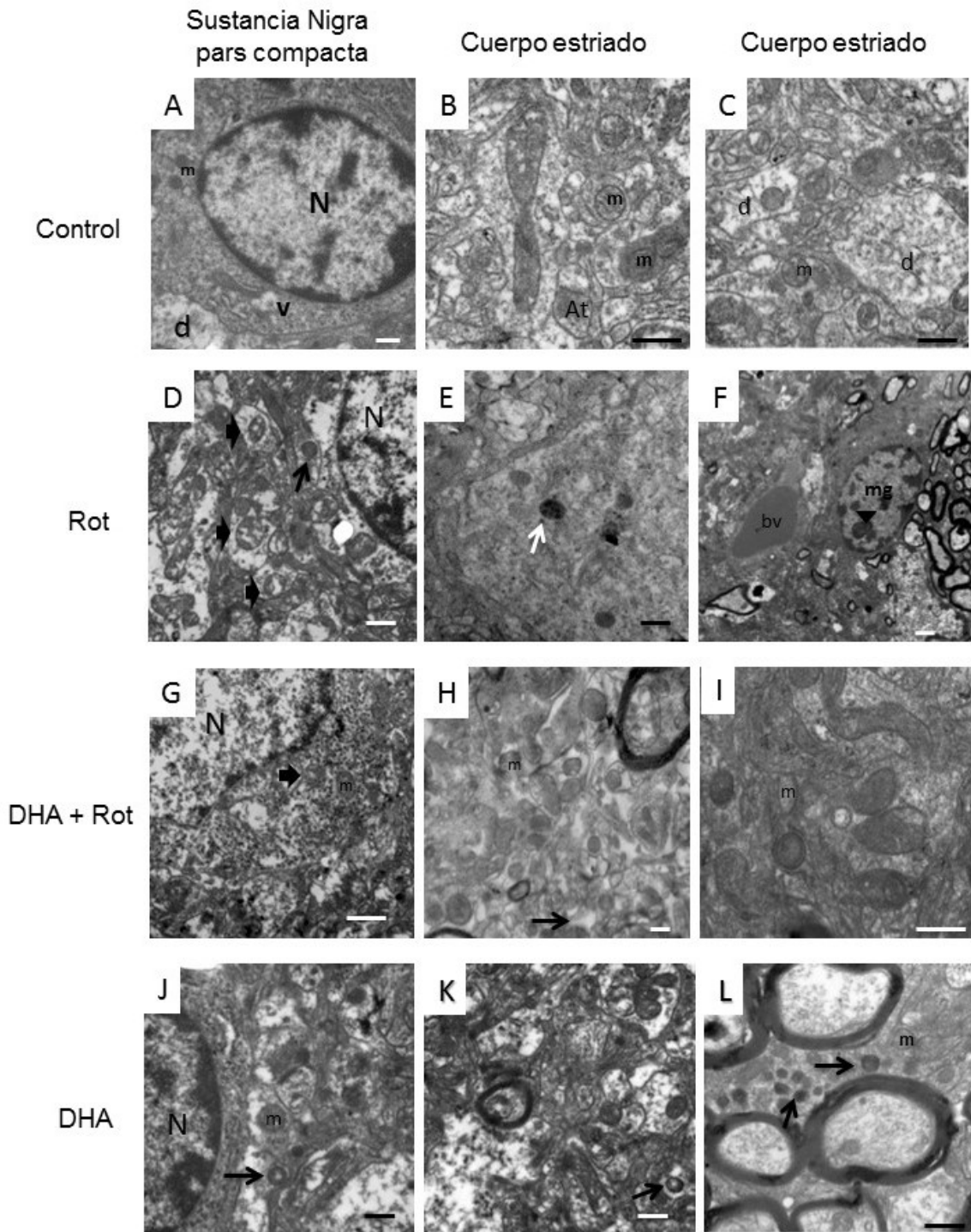
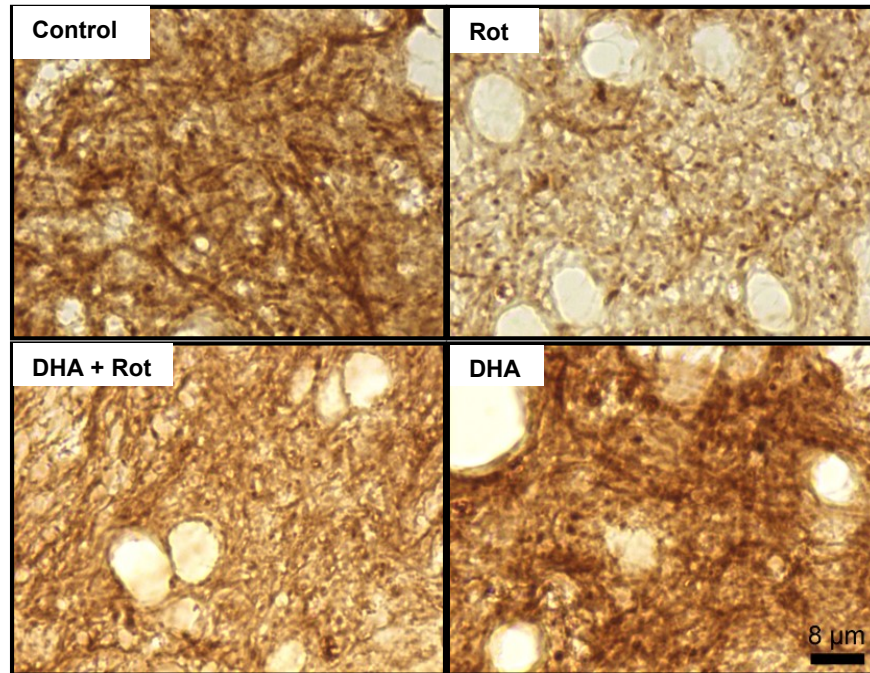


Figura 17. Micrografías de sustancia nigra pars compacta y cuerpo estriado. Imágenes representativas del grupo de control (A a C), grupo tratado con Rot (D a F), grupo administrado con DHA más Rot (G a I), grupo DHA (J a L). v: vacuolas, at: sinapsis axo-dendrítica, m: mitocondrias, d: dendrita, mg: microglia fagocítica reactiva, bv: vaso sanguíneo, N: núcleo. Flecha negra fina: vesícula lisosomal. Flecha blanca fina: vacuolas autofágicas. Flecha negra gruesa: mitocondrias hinchadas parcialmente destruidas. Barra de calibración 500 nm.

Tubulina

A



B

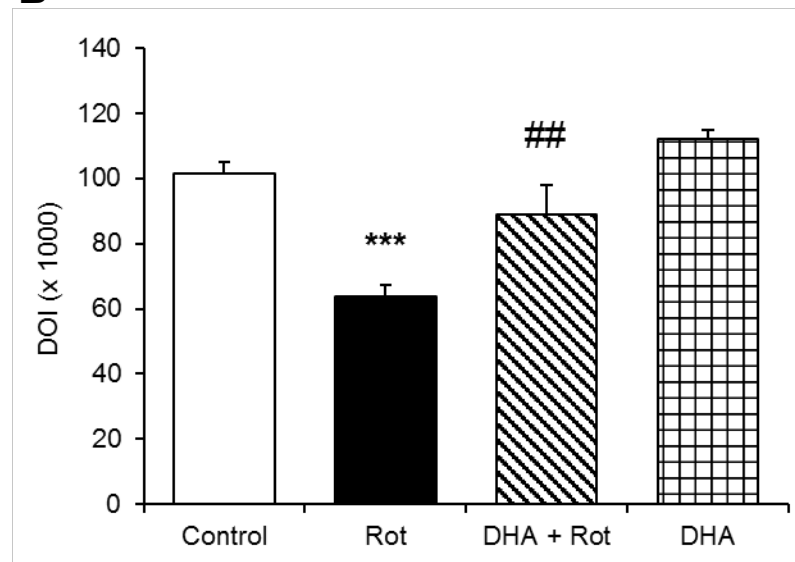
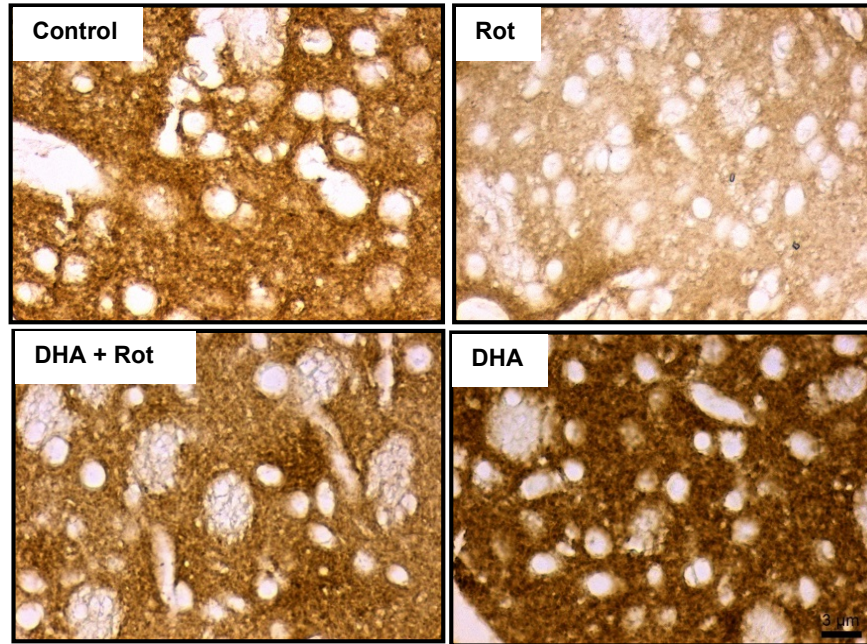


Figura 18. Efecto de la Rot y el DHA sobre la expresión de tubulina. (A) Imágenes representativas de tubulina en el estriado. (B) Cuantificación en estriado de tubulina. Se presentan valores de media \pm error estándar, n=5 por grupo. Las diferencias estadísticas se analizaron con ANOVA de una vía seguido de pruebas post hoc de Duncan. ***p<0.001 vs control y ##p<0.05 vs Rot.

Sinaptofisina

A



B

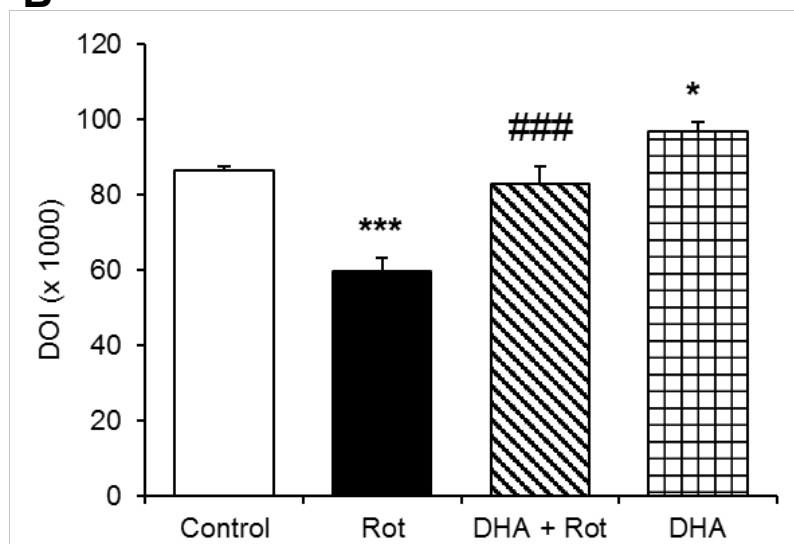


Figura 19. Efecto de la Rot y el DHA sobre la expresión de sinaptofisina. (A) Imágenes representativas de sinaptofisina en el estriado. (B) Cuantificación en estriado de sinaptofisina. Se presentan valores de media \pm error estándar, $n=5$ por grupo. Las diferencias estadísticas se analizaron con ANOVA de una vía seguido de pruebas post hoc de Duncan. * $p<0.05$ vs control; *** $p<0.001$ vs control y ### $p<0.001$ vs Rot.

7. DISCUSIÓN

Nuestros resultados confirman que la rotenona indujo un modelo experimental para estudiar el parkinsonismo idiopático y establecer un efecto neuroprotector ejercido por el DHA.

Primeramente, las ratas administradas con rotenona presentaron muerte celular significativa, así como disminución en la actividad exploratoria, esto evidencia el papel que tiene la rotenona como herramienta potencial para explorar las primeras etapas de la EP (Johnson y cols., 2015; Greenamyre y cols., 2010). El análisis histológico reveló que el CE, la región del cerebro que recibe las proyecciones de neuronas dopaminérgicas de la SNpc, fue la región con mayor daño por la rotenona. Esto puede deberse a la proximidad del CE con los ventrículos laterales, lo que lo convierte en el sitio primario de captación de toxinas, y esto concuerda con los hallazgos previos con respecto a la acción retrógrada de la rotenona en la lesión de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Melo y cols., 2013).

Debido a que las mitocondrias desempeñan un papel esencial en la regulación de los pasos clave que participan en la muerte celular, es importante explorar su participación en el inicio de la neurodegeneración. Esperábamos encontrar disfunción mitocondrial en ratas tratadas con rotenona dado que la rotenona es reconocida como un inhibidor clásico del complejo I mitocondrial (Lindahl y Öberg, 1960; Palmer y cols., 1968; Singer y Ramsay, 1994; Xiong y cols., 2012). Sin embargo, la inhibición del complejo I mitocondrial por la rotenona, la cual se ha documentado ampliamente, se ha producido en mitocondrias aisladas o en células permeabilizadas que se incuban directamente con el compuesto. Según nuestro conocimiento, éste estudio

es el primero en informar el efecto de la administración *in vivo* de la rotenona sobre la actividad del complejo I mitocondrial en CE y en el mesencéfalo de animales tratados *in vivo* con rotenona en las dosis y tiempos que utilizamos. Varios estudios *in vivo* se ha descrito la actividad mitocondrial después de la administración de rotenona diariamente durante largos periodos o utilizando dosis más altas (Betarbet y cols., 2000; Abdin y Hamouda, 2008; Denny Joseph y Muralidhara, 2015; Wen y cols., 2011). En otros experimentos, en los que se midió la función mitocondrial de todo el cerebro después de la administración de rotenona a corto plazo (6 días), no se encontró un ICR disminuido, a pesar de presentar reducciones significativas en el estado 3 (Panov y cols., 2005). Aun cuando la evidencia indica que hay una disminución en la actividad del complejo I mitocondrial en pacientes que murieron después de varios años de evolución de la EP (Jenner, 1993; Flønes y cols., 2018; Schapira, 2007), es posible que esta reducción en la actividad no desempeñe un papel importante en el proceso de neurodegeneración de la EP (Flønes y cols., 2018).

Lo mencionado anteriormente lo corroboramos en este estudio, encontramos ligeras alteraciones mitocondriales generadas por la rotenona, mientras buscábamos un vínculo entre los cambios ultraestructurales y las características bioquímicas en la SNpc y el CE. Sin embargo, estas alteraciones no fueron lo suficientemente importantes como para afectar la función mitocondrial. Esto está acorde con la evidencia previa en estudios *in vitro* que muestran cambios en la morfología mitocondrial en un modelo de la EA (con tratamiento con beta-amiloide en neuronas de la corteza primaria), sin cambios en la producción de ATP o el potencial

transmembranal (Hung y cols., 2018). Los hallazgos de este estudio incrementan la evidencia de que la disminución de la función mitocondrial es una consecuencia, más que una causa de la neurodegeneración. Una posible limitante del análisis en la función mitocondrial fue que se utilizó el mesencéfalo ventral y no solamente las neuronas dopaminérgicas dañadas por la rotenona localizadas en la SNpc. Además, las mitocondrias aisladas provinieron de diferentes linajes celulares presentes en el cerebro, y no existe información sobre si la rotenona tiene un efecto diferencial en los diferentes tipos de células presentes en el sistema nervioso. Otro aspecto importante a considerar es la dinámica mitocondrial que se presenta en la célula para adaptarse a los cambios del entorno celular. Esta dinámica mitocondrial consiste en dos eventos opuestos denominados fisión y fusión, y se producen de manera constante y equilibrada para crear nuevas mitocondrias o también segregar las mitocondrias dañadas (Suárez-Rivero y cols., 2017). Se ha sugerido que las ERO intracelulares y extracelulares pueden activar la fisión mitocondrial (Jahani-Asl y cols., 2007) e inclusive dañar la morfología de la red mitocondrial (Jendrach y cols., 2008). Ya se ha reportado que la rotenona incrementa la concentración de las ERO al inhibir la actividad del complejo I (Cicchetti y cols., 2009) y estas ERO podrían estar activando los procesos de fisión y fusión para resistir la toxicidad inducida por la rotenona, por lo cual no se observó daño a la función mitocondrial. Cabe mencionar que en este trabajo no se realizó un análisis del estrés oxidante para corroborar si a 8 días de administración de rotenona se incrementaron las ERO. Sin embargo, queda esta pregunta abierta para estudiar si este mecanismo de compensación está activado en

las mitocondrias y posiblemente sea esta la razón del porque no se observó disminución en la función mitocondrial.

Dentro de los hallazgos en el estudio se encontró que la rotenona disminuye la expresión de α -tubulina en el CE, este hallazgo concuerda con la evidencia de daño a los microtúbulos como un evento de neurodegeneración temprana que incluso se produce antes del daño mitocondrial en el parkinsonismo inducido por el MPP⁺ (Cartelli y cols., 2010). Debido a que el transporte de DA al CE desde la SNpc requiere de una función microtubular correcta, es posible que la desestabilización de los microtúbulos inducida por la rotenona afecte el transporte de DA. Puede existir un vínculo entre la función mitocondrial y la homeostasis del citoesqueleto, sin embargo, la disfunción mitocondrial se ha detectado antes (Esteves y cols., 2010) y después (Maldonado y cols., 2010) de la desestabilización de microtúbulos. Así mismo, se ha demostrado que la inhibición del complejo I mitocondrial potencia este daño, en lugar de provocar la muerte de las neuronas dopaminérgicas inducida por la rotenona. Del mismo modo, se ha demostrado que la inhibición del complejo I mitocondrial, más que una causa, potencia la muerte celular de las neuronas dopaminérgicas inducida por la rotenona y la despolimerización de los microtúbulos, siendo éste un mecanismo alternativo en la muerte neuronal inducida por la rotenona (Choi y cols., 2011).

Por otro lado, el efecto neuroprotector que ejerció el DHA se observó a través de la preservación de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y de las fibras del CE teñidas con la TH, en el grupo administrado con DHA y posteriormente la rotenona.

Este es el primer estudio que informa el efecto neuroprotector de la administración del DHA solo y por un corto período de tiempo en un modelo experimental de la EP. Aunque existen estudios similares en otros modelos experimentales de la EP como la MPTP y la 6-OHDA, en estos estudios se administró el DHA durante períodos prolongados o en combinación con otros compuestos (Ozkan y cols., 2016; Hacioglu y cols., 2012; Ozsoy y cols., 2011a; Tanriover y cols., 2010; Cansev y cols., 2008). En este trabajo encontramos que la administración del DHA a corto tiempo preserva la función de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, ya que se conservó el número de neuronas y se mejoró la conducta exploratoria en los animales administrados con rotenona. El efecto neuroprotector observado con el DHA puede deberse a su rápido transporte al cerebro (Bazan y cols., 2011).

Aunque el efecto neuroprotector del DHA se asoció directamente con la prevención en la disminución de la expresión de α -tubulina y sinaptofisina (ambas proteínas están estrechamente relacionadas con la transmisión sináptica), no se encontró alterada la función mitocondrial a pesar de la forma hinchada de la mitocondria, por lo tanto, fue sorprendente encontrar que el efecto neuroprotector del DHA no estaba relacionado con los cambios en la función mitocondrial.

La administración del DHA en éste estudio, evitó claramente la disminución en la expresión de α -tubulina, lo que indica su capacidad para prevenir la desestabilización de los microtúbulos, de manera similar se observó en trabajos previos (Wang y cols., 2010).

Por último, la rotenona generó disminución en la expresión de la sinaptofisina, y esta disminución se previno con la administración del DHA. En otros estudios se ha documentado una disminución similar de la sinaptofisina después de la infusión intracraneal de rotenona (Norazit y cols., 2010) o la administración de MPTP (Cao y cols., 2016), lo que sugiere que esta disminución es un sello distintivo de la EP. Sin embargo, la evidencia en general sigue siendo no consistente. Los estudios postmortem no revelan una diferencia significativa en la expresión de la sinaptofisina entre los pacientes con EP y los controles (Girault y cols., 1989), pero los estudios de neuroimagen revelan que las disfunciones sinápticas del CE en la etapa temprana precede a la neurodegeneración, dado que la neurodegeneración en la EP temprana es más grave en las terminales nerviosas y axones de la DA que en la SNpc (Bellucci y cols., 2017). En los modelos experimentales de EP, la pérdida de sinaptofisina se evita constantemente por varios agentes neuroprotectores (Cao y cols., 2016; Shin y cols., 2016). Debido a que el DHA puede mejorar la expresión de la sinaptofisina (Hashimoto y cols., 2017; Bate y cols., 2010) y detener su disminución, esto hace que el DHA sea un candidato potencial para modificar el curso de la EP en las etapas iniciales.

8. CONCLUSIONES

A partir de este trabajo podemos concluir:

1. La administración de rotenona no indujo disfunción mitocondrial
2. La rotenona generó desestabilización de los microtúbulos y se encontró pérdida de densidad sináptica.
3. El pretratamiento de DHA mostró efecto neuroprotector:
 - a) al prevenir el daño motor
 - b) disminuir las alteraciones morfológicas y de ultraestructura mitocondrial
 - c) prevenir la disminución en la expresión de tubulina y sinaptofisina, ambas proteínas relacionadas con la transmisión sináptica

9. PERSPECTIVAS

1. Diseñar experimentos que permitan describir los mecanismos involucrados en el efecto neuroprotector del DHA, particularmente como modula los niveles de tubulina y de sinaptofisina.
2. Conocer en que linaje celular la rotenona específicamente disminuye la tubulina y sinaptofisina

10. REFERENCIAS

- Abdin AA, Hamouda HE. (2008). Mechanism of the neuroprotective role of coenzyme Q10 with or without L-dopa in rotenone-induced parkinsonism. *Neuropharmacology* 55:1340-1346.
- Afshordel S, Hagl S, Werner D, Röhner N, Kögel D, Bazan NG, Eckert GP. (2015). Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve mitochondrial dysfunction in brain aging--impact of Bcl-2 and NPD-1 like metabolites. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 92:23-31.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff D, Roberts K, Walter P. (2015). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, Taylor & Francis Group. New York, NY. p.753-812.
- Bai Q, He J, Tang Y, Wang S, Qiu J, Wang Y, Yu C. (2016). Rotenone-induced energy stress decompensated in ventral mesocerebrum is associated with Parkinsonism progression in rats. *Exp Ther Med*. 12:1060-1066.
- Barker AT, Jalinous R, Freeston IL. (1985). Noninvasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet*. 1:1106–1107
- Bate C, Tayebi M, Salmons M, Diomedea L, Williams A. (2010). Polyunsaturated fatty acids protect against prion-mediated synapse damage in vitro. *Neurotox Res*. 17:203-214.
- Bazan NG, Molina MF, Gordon WC. (2011). Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *Annu Rev Nutr* 31:321-351.
- Bellucci A, Antonini A, Pizzi M, Spano P. (2017). The End Is the Beginning: Parkinson's Disease in the Light of Brain Imaging. *Front Aging Neurosci*. 9:330.
- Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S, de Rougemont J. (1988). Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*. 50: 344.
- Berlett BS, Stadtman ER. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 272:20313-20316.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*. 3:1301-1306.

Bhat S, Acharya UR, Hagiwara Y, Dadmehr N, Adeli H. (2018). Parkinson's disease: Cause factors, measurable indicators, and early diagnosis. *Comput Biol Med.* 102:234-241.

Bisbal M, Sanchez M. (2019). Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: a mechanistic approach. *Neural Regen Res.* 14:762-766.

Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. (2012). Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol.* 2012:845618.

Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science.* 299:256-269.

Brooks SP, Dunnett SB. (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: A user's guide. *Nat Rev Neurosc.* 10:519-529.

Burr GO, Burr MM. (1929). A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J Biol Chem* 82:345-367.

Calandria JM, Marcheselli VL, Mukherjee PK, Uddin J, Winkler JW, Petasis NA, Bazan NG Marcheselli VL, Mukherjee PK, Uddin J, Winkler JW. (2009). Selective survival rescue in 15-lipoxygenase-1-deficient retinal pigment epithelial cells by the novel docosahexaenoic acid-derived mediator, neuroprotectin D1. *J Biol Chem* 284:17877–17882.

Calder PC. (2017). Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem Soc Trans.* 455:1105-1115.

Campdelacreu J. (2014). Parkinson disease and Alzheimer disease: environmental risk factors. *Neurologia.* 29(9):541-549.

Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. (2009). A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 34:279-290.

Cansev M, Ulus IH, Wang L, Maher TJ, Wurtman RJ. (2008). Restorative effects of uridine plus docosahexaenoic acid in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Res.* 62:206–209.

Cao L, Li D, Feng P, Li L, Xue GF, Li G, Hölscher C. (2016). A novel dual GLP-1 and GIP incretin receptor agonist is neuroprotective in a mouse model of Parkinson's disease by reducing chronic inflammation in the brain. *Neuroreport.* 27:384-391.

- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*. 180(4596):1200.
- Cartelli D, Ronchi C, Maggioni MG, Rodighiero S, Giavini E, Cappelletti G. (2010). Microtubule dysfunction precedes transport impairment and mitochondria damage in MPP⁺-induced neurodegeneration. *J Neurochem*. 115:247-58.
- Casley CS, Canevari L, Land JM, Clark JB, Sharpe MA. (2002). Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J Neurochem*. 80:91-100.
- Chen H, O'Reilly EJ, Schwarzschild MA, Ascherio A. (2008). Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol*. 167:90-95.
- Chen T, Tan J, Wan Z, Zou Y, Afewerky HK, Zhang Z, Zhang T. (2017). Effects of Commonly Used Pesticides in China on the Mitochondria and Ubiquitin-Proteasome System in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 18:2507.
- Chinopoulos C, Zhang SF, Thomas B, Ten V, Starkov AA. (2011). Isolation and functional assessment of mitochondria from small amounts of mouse brain tissue. *Methods Mol Biol*. 793:311-324.
- Choi WS, Palmiter RD, Xia Z. (2011). Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. *J Cell Biol*. 192:873-882.
- Christmas TJ, Kempster PA, Chapple CR, Frankel JP, Lees AJ, Stern GM, Milroy EJ. (1988). Role of subcutaneous apomorphine in parkinsonian voiding dysfunction. *Lancet*. 2:1451-1453.
- Chung CG, Lee H, Lee SB. (2018). Mechanisms of protein toxicity in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci*. 75:3159-3180.
- Cicchetti F, Drouin-Ouellet J, Gross RE. (2009). Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends Pharmacol Sci*. 30:475-483.
- Coronado-Herrera M, Vega y León S, Gutiérrez-Tolentino R, García-Fernández B, Díaz-González G. (2006). Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: nutrición, bioquímica y salud. *Rev Educ Bioquím*. 25:72-79.
- Dauer W, Przedborski S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 39(6):889-909.

Denny Joseph KM, Muralidhara. (2015). Combined oral supplementation of fish oil and quercetin enhances neuroprotection in a chronic rotenone rat model: relevance to Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 40:894-905.

Dexter DT, Jenner P (2013). Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Rad Bio Med.* 62:132-44.

Dorman D. (2015). Extrapyramidal system neurotoxicity: animal models. *Handb Clin Neurol.* 131:207-223.

Dreyfus G (2015). La ATP sintasa, un viejo amor del doctor Gómez Puyou. *Revista Digital Universitaria.* 1 de enero de 2015, Vol. 16, No.1 [Consultada:]. Disponible en Internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num1/art03/index.html>. ISSN: 1607-6079.

Eckert GP, Lipka U, Muller WE. (2013). Omega-3 fatty acids in neurodegenerative diseases: focus on mitochondria. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 88:105-114.

Escobar Betancourth MI, Medina Marín AM. (2002). Sistema glutamatérgico, primera parte: sinaptología, homeostasis y muerte celular. *Rev Colomb Psiquiatr.* 31:187-212.

Esteves AR, Arduíno DM, Swerdlow RH, Oliveira CR, Cardoso SM. (2010). Microtubule depolymerization potentiates alpha-synuclein oligomerization. *Front Aging Neurosci.* 1:1-6.

European Pharmacopoeia Commission, European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare. 2007. *European pharmacopoeia (Vol. 2).* Council of Europe.

Fabelo N, Martín V, Santpere G, Marín R, Torrent L, Ferrer I, Díaz M. (2011). Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease. *Mol Med.* 17:1107-1118.

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

Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. (2012). Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci.* 322:254-262.

Flachs P, Horakova O, Brauner P, Rossmeisl M, Pecina P, Franssen-van Hal N, Ruzickova J, Sponarova J, Drahota Z, Vlcek C, Keijer J, Houstek J, Kopecky J. (2005). Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia.* 48:2365-2375.

Flagmeier P, Meisl G, Vendruscolo M, Knowles TP, Dobson CM, Buell AK, Galvagnion C. (2016). Mutations associated with familial Parkinson's disease alter the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 113(37):10328-10333.

Fleming SM, Zhu C, Fernagut PO, Mehta A, DiCarlo CD, Seaman RL, Chesselet MF. (2004). Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. *Exp Neurol*. 187:418-429.

Flønes IH, Fernandez-Vizarra E, Lykouri M, Brakedal B, Skeie GO, Miletic H, Lilleng PK, Alves G, Tysnes OB, Haugarvoll K, Dölle C, Zeviani M, Tzoulis C. (2018). Neuronal complex I deficiency occurs throughout the Parkinson's disease brain, but is not associated with neurodegeneration or mitochondrial DNA damage. *Acta Neuropathol*. 135:409-425.

Francis K, Smitherman C, Nishino SF, Spain JC, Gadda G. (2013). The biochemistry of the metabolic poison propionate 3-nitronate and its conjugate acid, 3-nitropropionate. *IUBMB Life*. 65:759-768.

Gharami K, Das M, Das S. (2015). Essential role of docosahexaenoic acid towards development of a smarter brain. *Neurochem Int*. 89:51-62.

Garcia Ruiz PJ. (2006). Nocturnal subcutaneous apomorphine infusion for severe insomnia in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 21(5):727-728.

Garcia Ruiz PJ, Sesar Ignacio A, Ares Pensado B, Castro Garcia A, Alonso Frech F, Alvarez Lopez M, Arbelo González J, Baiges Octavio J, Burguera Hernández JA, Calopa Garriga M, Campos Blanco D, Castaño García B, Carballo Cordero M, Chacón Peña J, Espino Ibáñez A, Gorospe Onisalde A, Giménez-Roldán S, Granés Ibáñez P, Hernández Vara J, Ibáñez Alonso R, Jiménez Jiménez FJ, Krupinski J, Kulisevsky Bojarsky J, Legarda Ramírez I, Lezcano García E, Martínez-Castrillo JC, Mateo González D, Miquel Rodríguez F, Mir P, Muñoz Fargas E, Obeso Inchausti J, Olivares Romero J, Olivé Plana J, Otermin Vallejo P, Pascual Sedano B, Pérez de Colosía Rama V, Pérez López-Fraile I, Planas Comes A, Puente Periz V, Rodríguez Oroz MC, Sevillano García D, Solís Pérez P, Suárez Muñoz J, Vaamonde Gamo J, Valero Merino C, Valldeoriola Serra F, Velázquez Pérez JM, Yáñez Baña R, Zamarbide Capdepon I. (2008). Efficacy of longterm continuous subcutaneous apomorphine infusion in advanced Parkinson's disease with motor fluctuations: a multicenter study. *Mov Disord*. 23:1130-1136.

Girault JA, Raisman-Vozari R, Agid Y, Greengard P. (1989). Striatal phosphoproteins in Parkinson disease and progressive supranuclear palsy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:2493-2497.

Goldman JC, Goetz CG (2005). James Parkinson. En: Ebadi M y Pfeifferi RF. Parkinson's disease. CRC Press. Florida. p.1-10.

Gómez Ayala Adela-Emilia (2007). Enfermedad de Parkinson. Farmacoterapia. 26(5): 70-78.

Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A. (2003). Las mitocondrias. En: Jiménez-García LF y Merchant H. Biología Celular y Molecular. Pearson Educación. Edo de México, México. p. 295-313.

Gonzales Loyola JG y Hernández Montiel HL. (2013). Síndrome metabólico, diabetes y estrés oxidativo en la enfermedad de Alzheimer y Parkinson. Papel potencial del pirofosfato de tiamina. Medicina Salud y Sociedad. 3:1-22.

Greenamyre JT, Sherer TB, Betarbet R, Panov AV. (2001). Complex I and Parkinson's disease. IUBMB Life. 52(3-5):135-141.

Greenamyre JT, Cannon JR, Drolet R, Mastroberardino PG. (2010). Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. Trends Pharmacol Sci. 31:141-142.

Gruber AK, López P. José Antonio. (2004). Control biológico de insectos mediante extractos botánicos. En: Carballo M, Guharay F. Control biológico de plagas agrícolas. Manual Técnico CATIE, Managua. Cap 9.

Grünwald O. (1942). La Industria del Barbasco y sus perspectivas para Venezuela. Rev Fac Nac Agron Medellín. 5:296-313.

Gubellini P, Kachidian P. (2015). Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. Rev Neurol (Paris). 171:750-761.

Gutman M, Singer TP, Beinert H, Casida JE. (1970). Reaction sites of rotenone, piericidin A, and amytal in relation to the nonheme iron components of NADH dehydrogenase. Proc Natl Acad Sci USA. 65:763-770.

Gylling H, Miettinen TA. (2001). A review of clinical trials in dietary interventions to decrease the incidence of coronary artery disease. Curr Control Trials Cardiovasc Med. 2:123-128.

Hacioglu G, Seval-Celik Y, Tanriover G, Ozsoy O, Saka-Topcuoglu E, Balkan S, Agar A. (2012). Docosahexaenoic acid provides protective mechanism in bilaterally MPTP-lesioned rat model of Parkinson's disease. Folia Histochem Cytobiol. 50:228-238.

Hashimoto M, Hossain S, Al Mamun A, Matsuzaki K, Arai H. (2017). Docosahexaenoic acid: one molecule diverse functions. Crit Rev Biotechnol. 37:579-597.

Hauser DN, Hastings TG. (2013). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol Dis.* 51:35-42.

Heumann R, Moratalla R, Herrero MT, Chakrabarty K, Drucker-Colín R, Garcia-Montes JR, Simola N, Morelli M. (2014). Dyskinesia in Parkinson's disease: mechanisms and current non-pharmacological interventions. *J Neurochem.* 130(4):472-489.

Hongo H, Kihara T, Kume T, Izumi Y, Niidome T, Sugimoto H, Akaike A. (2012). Glycogen synthase kinase-3 β activation mediates rotenone-induced cytotoxicity with the involvement of microtubule destabilization. *Biochem Biophys Res Commun.* 426:94-99.

Horrocks LA, Farooqui AA. (2004). Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 70:361-372.

Howard AJ. (1942). A review of methods for the chemical analysis of rotenone-bearing plants. U.S. Dept. of Agriculture, Bureau of Entomology and Plant Quarantine? Washington, USA. 82p.

Hung CH, Cheng SS, Cheung YT, Wuwongse S, Zhang NQ, Ho YS, Lee SM, Chang RC. (2018). A reciprocal relationship between reactive oxygen species and mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Redox Biol.* 14:7-19.

Hunter S, Brayne C. (2018). Understanding the roles of mutations in the amyloid precursor protein in Alzheimer disease. *Mol Psychiatry.* 23:81-93.

INEGI. (2017). Índice Nacional de Competitividad. Series originales. Esperanza de vida al nacer, años. Consulte este documento en la siguiente dirección: <https://www.inegi.org.mx/app/indicadores/?ind=6204482233#divFV6204482233#D6204482233>. El día 20 de mayo del 2019.

Jackson-Lewis V, Blesa J, Przedborski S. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord Suppl.* 1:S183-5.

Jafari S, Etminan M, Aminzadeh F, Samii A. (2013). Head injury and risk of Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 28:1222-1229.

Jahani-Asl A, Cheung ECC, Neuspiel M, MacLaurin JG, Fortin A, Park DS, McBride HM, Slack RS. (2007). Mitofusin 2 protects cerebellar granule neurons against injury-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 282:23788–23798.

Janssen CI, Kiliaan AJ. (2014). Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Prog Lipid Res.* 53:1-17.

Javoy F, Sotelo C, Herbet A, Agid Y. (1976). Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 102:201-215.

Jendrach M, Mai S, Pohl S, Vöth M, Bereiter-Hahn J. (2008). Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion.* 8:293–304.

Jenner P. (1993). Altered mitochondrial function, iron metabolism and glutathione levels in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl.* 146:6-13.

Johnson ME, Lim Y, Senthilkumaran M, Zhou XF, Bobrovskaya L. (2015). Investigation of tyrosine hydroxylase and BDNF in a low-dose rotenone model of Parkinson's disease. *J Chem Neuroanat.* 70:33-41.

Kim YJ, Takahashi R. (2006). Role of polyunsaturated fatty acids for misfolding protein aggregations: implication for neurodegenerative diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 1086:11-20.

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

Kitajka K, Puskás LG, Zvara A, Hackler L Jr, Barceló-Coblijn G, Yeo YK, Farkas T. (2002). The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:2619-2624.

Königsberg M. (1992). Bioenergética de la cadena respiratoria mitocondrial. *Libros de Texto y Manuales de Prácticas editados por la UAM.* México. 113p.

Konnova EA, Swanberg M. (2018). Animal Models of Parkinson's Disease. In: Stoker TB, Greenland JC, editors. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects.* Brisbane (AU): Codon Publications Chapter 5.

Korell M, Tanner CM. (2005). Epidemiology of Parkinson's Disease: An Overview. In Ebadi M, Pfeiffer RF. *Parkinson's disease.* CRC. Washington DC. p. 39-50.

Kumar A, Huang Z, Calne DB (2005). Parkinson's disease: Where are we? In: Ebadi M, Pfeiffer RF. *Parkinson's disease.* CRC. Washington DC p. 27-38.

Kupsch A, Schmidt W, Gizatullina Z, Debska-Vielhaber G, Voges J, Striggow F, Panther P, Schwegler H, Heinze HJ, Vielhaber S, Gellerich FN. (2014). 6-Hydroxydopamine impairs mitochondrial function in the rat model of Parkinson's disease: respirometric, histological, and behavioral analyses. *J Neural Transm (Vienna)*. 121:1245-1257.

Kwong JQ, Beal MF, Manfredi G. (2006). The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases. *J Neurochem*. 97:1659-1675.

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

Lee SA, Kim HJ, Chang KC, Baek JC, Park JK, Shin JK, Choi WJ, Lee JH, Paik WY (2009). DHA and EPA down-regulate COX-2 expression through suppression of NF-kappaB activity in LPS treated human umbilical vein endothelial cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 13:301-307.

Lin TK, Cheng CH, Chen SD, Liou CW, Huang CR, Chuang YC (2012) Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Promote Apoptotic Cell Death in the Striatum via Cytochrome c/Caspase-3 Signaling Cascade Following Chronic Rotenone Intoxication in Rats. *Int J Mol Sci*. 13:8722-8739.

Lindahl PE, Öberg KE. (1960). Mechanism of the physiological action of rotenone. *Nature*. 187:784.

Liu B, Gao HM, Hong JS. (2003). Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. *Environ Health Perspect*. 111:1065-1073.

Luis-García ER, Limón-Pacheco JH, Serrano-García N, Hernández-Pérez AD, Pedraza-Chaverri J, Orozco-Ibarra M. (2017). Sulforaphane prevents quinolinic acid-induced mitochondrial dysfunction in rat striatum. *J Biochem Mol Toxicol*. 31(2).

Lukiw WJ, Cui J, Marcheselli VL, Bodker M, Botkjaer A, Gotlinger K, Serhan CN, Bazan NG (2005). A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 115:2774-2783.

McGeer PL, McGeer EG. (2004). Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord. Suppl* 1:S3-S7.

Maldonado EN, Patnaik J, Mullins MR, Lemasters JJ. (2010). Free tubulin modulates mitochondrial membrane potential in cancer cells. *Cancer Res*. 70:10192-10201.

Martínez-Fernández R, Gasca-Salas C, Sánchez-Ferro A, Obeso JA. (2016). Actualización en la enfermedad de parkinson. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 27:363-379.

Martinez-Martin P, Rodriguez-Blazquez C, Kurtis MM, Chaudhuri KR. (2011). The impact of non-motor symptoms on health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 26(3):399-406.

Mataix J, Gil A. (2004). Libro blanco de los Omega-3: los ácidos grasos poliinsaturados Omega-3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud. Editorial Panamericana. España. 180 p.

Mathai A, Ma Y, Paré JF, Villalba RM, Wichmann T, Smith Y. (2015). Reduced cortical innervation of the subthalamic nucleus in MPTP-treated parkinsonian monkeys. *Brain*. 138(Pt 4):946-962.

Medina-Fernández FJ, Escribano BM, Padilla-Del-Campo C, Drucker-Colín R, Pascual-Leone Á, Túnez I. (2018). Transcranial magnetic stimulation as an antioxidant. *Free Radic Res*. 52:381-389.

Melo TQ, D'unhao AM, Martins SA, Farizatto KL, Chaves RS, Ferrari MF. (2013). Rotenone-dependent changes of anterograde motor protein expression and mitochondrial mobility in brain areas related to neurodegenerative diseases. *Cell Mol Neurobiol*. 33:327-335.

Mendez-López L. (2016). Toxinas ambientales y Esclerosis Lateral Amiotrófica. *Actualidad en Farmacología y Terapéutica*. 14:309-310.

Meredith GE, Sonsalla PK, Chesselet MF. (2008). Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathol*. 115:385-398.

Ming L. (1995). Moldy sugarcane poisoning--a case report with a brief review. *J Toxicol Clin Toxicol*. 33:363-367.

Mitchell P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemo-osmotic type of mechanism. *Nature*. 191:144-148.

Mitsumoto A, Nakagawa Y. (2001). DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic Res*. 35:885-893.

Moore SA, Yoder E, Murphy S, Dutton GR, Spector AA. (1991). Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 omega-3) and arachidonic acid (20:4 omega-6). *J Neurochem*. 56:518-524.

Mori K, Weng SM, Arzberger T, May S, Rentzsch K, Kremmer E, Schmid B, Kretschmar HA, Cruts M, Van Broeckhoven C, Haass C, Edbauer D. (2013). The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS. *Science*. 339:1335-1338.

Mortimer JA, Borenstein AR, Nelson LM. (2012). Associations of welding and manganese exposure with Parkinson disease: review and meta-analysis. *Neurology*. 79:1174-1180.

Murphy EJ. (2013). A lipid neurochemist's siren: docosahexaenoic acid and its elusive function in the central nervous system. *J Neurochem*. 127:299-302.

Mythri RB, Raghunath NR, Narwade SC, Pandareesh MDR, Sabitha KR, Aiyaz M, Chand B, Sule M, Ghosh K, Kumar S, Shankarappa B, Soundararajan S, Alladi PA, Purushottam M, Gayathri N, Deobagkar DD, Laxmi TR, Srinivas Bharath MM. (2017). Manganese- and 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity display differences in morphological, electrophysiological and genome-wide alterations: implications for idiopathic Parkinson's disease. *J Neurochem*. 143:334-358.

Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. (1996). Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol*. 46:15-32.

Navarrete E, Prospero O, Hudson R, Guevara R (2000). Enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia. *Gac Med Mex*. 136:189-200.

Navarro A, Boveris A, Báñez MJ, Sánchez-Pino MJ, Gómez C, Muntané G, Ferrer I (2009). Human brain cortex: mitochondrial oxidative damage and adaptive response in Parkinson disease and in dementia with Lewy bodies. *Free Radic Biol Med*. 46:1574-1580.

Nicholson T, Khademi H, Moghadasian MH. (2013). The role of marine n-3 fatty acids in improving cardiovascular health: a review. *Food Funct*. 4:357-365.

Norazit A, Meedeniya AC, Nguyen MN, Mackay-Sim A. (2010). Progressive loss of dopaminergic neurons induced by unilateral rotenone infusion into the medial forebrain bundle. *Brain Res*. 1360:119-129.

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Öberg KE. (1961). The site of the action of rotenone in the respiratory chain. *Exp Cell Res*. 24:163-164.

Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D, Burn D, Halliday GM, Bezard E, Przedborski S, Lehericy S, Brooks DJ, Rothwell JC, Hallett

M, DeLong MR, Marras C, Tanner CM, Ross GW, Langston JW, Klein C, Bonifati V, Jankovic J, Lozano AM, Deuschl G, Bergman H, Tolosa E, Rodriguez-Violante M, Fahn S, Postuma RB, Berg D, Marek K, Standaert DG, Surmeier DJ, Olanow CW, Kordower JH, Calabresi P, Schapira AHV, Stoessl AJ. (2017). Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov Disord.* 32:1264-1310.

Organización Mundial de la Salud. 2019. Ver página de internet <http://www.who.int/countries/mex/es/>

Orozco-Ibarra M, García-Morales J, Calvo-Silva FJ, Fernández-Valverde F, Serrano-García N. (2018). Striatal mitochondria response to 3-nitropropionic acid and fish oil treatment. *Nutr Neurosci.* 21:132-142.

Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. (2002). An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 68:325-340.

Ozsoy O, Seval-Celik Y, Hacioglu G, Yargicoglu P, Demir R, Agar A, Aslan M. (2011a). The influence and the mechanism of docosahexaenoic acid on a mouse model of Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 59:664-670.

Ozsoy O, Tanriover G, Derin N, Uysal N, Demir N, Gemici B, Kencebay C, Yargicoglu P, Agar A, Aslan M. (2011b). The effect of docosahexaenoic Acid on visual evoked potentials in a mouse model of Parkinson's disease: the role of cyclooxygenase-2 and nuclear factor kappa-B. *Neurotox Res.* 20:250-262.

Ozkan A, Parlak H, Tanriover G, Dilmac S, Ulker SN, Birsen I, Agar A. (2016). The protective mechanism of docosahexaenoic acid in mouse model of Parkinson: The role of hemeoxygenase. *Neurochem Int.* 101:110-119.

Pahwa R, Koller WC, Trosch RM, Sherry JH. (2007). Subcutaneous apomorphine in patients with advanced Parkinson's disease: a dose-escalation study with randomized, double-blind, placebo-controlled crossover evaluation of a single dose. *J Neurol Sci.* 258:137-143.

Palmer G, Horgan DJ, Tisdale H, Singer TP, Beinert H. (1968). Studies on the respiratory chain-linked reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase. XIV. Location of the sites of inhibition of rotenone, barbiturates, and piericidin by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem.* 243:844-847.

Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Taylor G, Sherer T, Greenamyre JT. (2005). Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *J Biol Chem.* 280:42026-42035.

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

Perier C, Bové J, Vila M, Przedborski S (2003). The rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 26:345-346.

Petzinger GM, Jakowec MW. (2005). Animal models of basal ganglia injury and degeneration and their application to Parkinson's disease research. In Ebadi M and Pfeifferi RF. *Parkinson's disease*. CRC Press. Florida. p.367-399.

Pezzoli G, Cereda E. (2013). Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease. *Neurology.* 80:2035-2041.

Pohl F, Kong Thoo Lin P. (2018). The Potential Use of Plant Natural Products and Plant Extracts with Antioxidant Properties for the Prevention/Treatment of Neurodegenerative Diseases: In Vitro, In Vivo and Clinical Trials. *Molecules.* 23(12). 3283.

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

Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TD. (2014). The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 29:1583-1590.

Rasband WS. 1997-2016. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>

Ratner MH, Fieldman RG. (2005). Environmental toxins and Parkinson's disease. In Ebadi M and Pfeifferi RF. *Parkinson's disease*. CRC Press. Florida. P.51-62.

Rojas P, Serrano-García N, Mares-Sámano JJ, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Ogren SO. (2008). EGb761 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(1):41-50.

Samadi P, Grégoire L, Rouillard C, Bédard PJ, Di Paolo T, Lévesque D. (2006). Docosahexaenoic acid reduces levodopa-induced dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys. *Biochemistry.* 45:15610-15616.

Samii A, Nutt JG, Ransom BR. (2004). Parkinson's disease. *Lancet.* 363:1783-93.

Schaar KL, Brenneman MM, Savitz SI. (2010). Functional assessments in the rodent stroke model. *Experimental & Translational Stroke Medicine*. 2:1-13.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet*. 1(8649):1269.

Schapira AH (2007). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell Death Differ* 14:1261-1266.

Shin MS, Jeong HY, An DI, Lee HY, Sung YH. (2016). Treadmill exercise facilitates synaptic plasticity on dopaminergic neurons and fibers in the mouse model with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 621:28-33.

Schlossmacher MG, Shimura H. (2005). Parkinson's disease: assays for the ubiquitin ligase activity of neural Parkin. *Methods Mol Biol*. 301:351-369.

Scholte HR. (1988). The biochemical basis of mitochondrial diseases. *J Bioenerg Biomembr*. 20:161-191.

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

Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. (2007). Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*. 447:869-874.

Schwartz RK, Huston JP. (1996). Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of mesostriatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Prog Neurobiol*. 49:215-266.

Secretaría de Salud. Programa Nacional de Salud 2001-2006. La democratización de la salud en México. Hacia un sistema universal de salud. 3a. edición. México: Secretaría de Salud, 2001:73-82.

Seppi K, Ray Chaudhuri K, Coelho M, Fox SH, Katzenschlager R, Perez Lloret S, Weintraub D, Sampaio C, and the collaborators of the Parkinson's Disease Update on Non-Motor Symptoms Study Group on behalf of the Movement Disorders Society Evidence-Based Medicine Committee. (2019). Update on treatments for nonmotor symptoms of Parkinson's disease-an evidence-based medicine review. *Mov Disord*. 34(2):180-198.

Singer TP, Ramsay RR. (1994). The reaction sites of rotenone and ubiquinone with mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*. 1187:198-202.

Sonia Angeline M, Chaterjee P, Anand K, Ambasta RK, Kumar P. (2012). Rotenone-induced parkinsonism elicits behavioral impairments and differential expression of parkin, heat shock proteins and caspases in the rat. *Neuroscience*. 220:291-301.

Sotelo J, Ordoñez G, Pineda B. (2007). Varicella-zoster virus at relapses of multiple sclerosis. *J Neurol*. 254:493-500.

Sperens M, Hamberg K, Hariz GM. (2017). Are Patients Ready for "EARLYSTIM"? Attitudes towards Deep Brain Stimulation among Female and Male Patients with Moderately Advanced Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis.*;2017:1939831.

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

Stepens A, Logina I, Liguts V, Aldins P, Eksteina I, Platkājis A, Mārtinsone I, Tērauds E, Rozentāle B, Donaghy M. (2008). A Parkinsonian syndrome in methcathinone users and the role of manganese. *N Engl J Med*. 358:1009-1017.

Suárez-Rivero JM, Villanueva-Paz M, de la Cruz-Ojeda P, de la Mata M, Cotán D, Oropesa-Ávila M, de Lavera I, Álvarez-Córdoba M, Luzón-Hidalgo R, Sánchez-Alcázar JA. (2017). Mitochondrial Dynamics in Mitochondrial Diseases. *Diseases*. 5(1):1. doi: 10.3390/diseases5010001.

Sveinbjornsdottir S. (2016). The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 139 Suppl 1:318-324.

Takalo M, Salminen A, Soininen H, Hiltunen M, Haapasalo A (2013). Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *Am J Neurodegener Dis*. 2:1-14.

Tamano H, Morioka H, Nishio R, Takeuchi A, Takeda A. (2018). Blockade of Rapid Influx of Extracellular Zn²⁺ into Nigral Dopaminergic Neurons Overcomes Paraquat-Induced Parkinson's Disease in Rats. *Mol Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-018-1398-9.

Tanaka K, Farooqui AA, Siddiqi NJ, Alhomida AS, Ong WY. (2012). Effects of docosahexaenoic Acid on neurotransmission. *Biomol Ther (Seoul)*. 20:152-157.

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

Tanriover G, Seval-Celik Y, Ozsoy O, Akkoyunlu G, Savcioglu F, Hacioglu G, Demir N, Agar A (2010). The effects of docosahexaenoic acid on glial derived neurotrophic factor and neurturin in bilateral rat model of Parkinson's disease. *Folia Histochem Cytobiol* 48:434-441.

Thomas RR, Keeney PM, Bennett JP. (2012). Impaired complex-I mitochondrial biogenesis in Parkinson disease frontal cortex. *J Parkinsons Dis.* 2(1):67-76.

Timpka J, Nitu B, Datieva V, Odin P, Antonini A. (2017). Device-Aided Treatment Strategies in Advanced Parkinson's Disease. *Int Rev Neurobiol.* 132:453-474.

Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol.* 7:65-74.

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

Valadez B. (2012). Salud de mexicanos, en riesgo por vivir 10 años más: OMS. Ver página de internet www.milenio.com/cdb/doc/impreso/9143720.

Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, González-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science.* 304:1158-1160

Valenzuela R, Bascuñan K, Valenzuela A (2008). Ácido docosahexaenoico (DHA): una perspectiva nutricional para la prevención de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Chil Nutr* 35:250-261.

Vincent A, Briggs L, Chatwin GF, Emery E, Tomlins R, Oswald M, Middleton CA, Evans GJ, Sweeney ST, Elliott CJ. (2012). Parkin-induced defects in neurophysiology and locomotion are generated by metabolic dysfunction and not oxidative stress. *Hum Mol Genet.* 21:1760-1769.

Voet D, Voet JG, Pratt CW. (2007). *Fundamentos De Bioquímica/ Fundamental of Biochemistry.* Ed. Médica Panamericana. ISBN 9789500623148

Walker FO. (2007). Huntington's disease. *Lancet.* 369:218-228.

Wang PY, Chen JJ, Su HM. (2010). Docosahexaenoic acid supplementation of primary rat hippocampal neurons attenuates the neurotoxicity induced by aggregated amyloid beta protein(42) and up-regulates cytoskeletal protein expression. *J Nutr Biochem.* 21345-21350.

Wen Y, Li W, Poteet EC, Xie L, Tan C, Yan LJ, Ju X, Liu R, Qian H, Marvin MA, Goldberg MS, She H, Mao Z, Simpkins JW, Yang SH. (2011). Alternative

mitochondrial electron transfer as a novel strategy for neuroprotection. *J Biol Chem.* 286:16504-16515.

West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec.* 231:482-497.

Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. (2011). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol Suppl* 1:S1-58.

Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. (2008). Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life.* 60:575-590.

Xiong N, Long X, Xiong J, Jia M, Chen C, Huang J, Ghoorah D, Kong X, Lin Z, Wang T. (2012). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. *Crit Rev Toxicol.* 42:613-632.

Xu H, Chen R, Cai X, He D. (2011). Differential effects of activating D1 and D2 receptors on electrophysiology of neostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease induced by paraquat and maneb. *Neurosci Res.* 71:411-420.

Yamato M, Shiba T, Naganuma T, Ichikawa K, Utsumi H, Yamada K. (2011). Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging characterization of mitochondria functional changes in the 6-hydroxydopamine rat model. *Neurochem Int.* 59:804-811.

Yurko-Mauro K, McCarthy D, Rom D, Nelson EB, Ryan AS, Blackwell A, Salem N Jr, Stedman M. (2010). Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition in age-related cognitive decline. *Alzheimers Dement.* 6:456-464.

Zeng XS, Geng WS, Jia JJ. (2018). Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. *ASN Neuro.* 10:1-15.

Zhang XF, Thompson M, Xu YH. (2016). Multifactorial theory applied to the neurotoxicity of paraquat and paraquat-induced mechanisms of developing Parkinson's disease. *Lab Invest.* 96:496-507.

Review Article

Antiapoptotic Effects of EGb 761

**Norma Serrano-García,¹ José Pedraza-Chaverri,² José Juan Mares-Sámano,³
Marisol Orozco-Ibarra,¹ Arturo Cruz-Salgado,⁴ Anabel Jiménez-Angüiano,⁵
Julio Sotelo,⁶ and Cristina Trejo-Solís⁶**

¹ Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, INNN-UNAM, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, 14269 México, DF, Mexico

² Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, DF, Mexico

³ Laboratorio Analítico de Compuestos del Tabaco, Instituto Nacional de Salud Pública, 014000 México, DF, Mexico

⁴ Departamento de Salud Bucal, Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades, 11800 México, DF, Mexico

⁵ Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09340 México, DF, Mexico

⁶ Departamento de Neuroinmunología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, 14269 México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Cristina Trejo-Solís; trejosolis@yahoo.com.mx

Received 19 February 2013; Revised 19 June 2013; Accepted 27 June 2013

Academic Editor: Alfredo Vannacci

Copyright © 2013 Norma Serrano-García et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Ginkgo biloba extracts have long been used in Chinese traditional medicine for hundreds of years. The most significant extract obtained from *Ginkgo biloba* leaves has been EGb 761, a widely used phytopharmaceutical product in Europe. EGb 761 is a well-defined mixture of active compounds, which contains two main active substances: flavonoid glycosides (24–26%) and terpene lactones (6–8%). These compounds have shown antiapoptotic effects through the protection of mitochondrial membrane integrity, inhibition of mitochondrial cytochrome c release, enhancement of antiapoptotic protein transcription, and reduction of caspase transcription and DNA fragmentation. Other effects include the reduction of oxidative stress (which has been related to the occurrence of vascular, degenerative, and proliferative diseases), coupled to strong induction of phase II-detoxifying and cellular defense enzymes by Nrf2/ARE activation, in addition to the modulation of transcription factors, such as CREB, HIF-1 α , NF- κ B, AP-1, and p53, involved in the apoptosis process. This work reviews experimental results about the antiapoptotic effects induced by the standardized extract of *Ginkgo biloba* leaves (EGb 761).

1. Introduction

Programmed cell death is a key cellular process in the development and maintenance of tissue homeostasis. Its function is to eliminate superfluous, damaged, infected, or transformed cells. This type of cell death, also known as apoptosis, was first described by Vogt in 1842, who discovered that some cells were morphologically different. In 1972, Kerr et al. [1] coined the word apoptosis from the Greek for “dropping off” of petals or leaves from plants or trees; in this way, they described the intrinsic mechanism of programmed cell suicide observed in normal hepatocyte replacement. These

authors were the first to distinguish between the morphology of cell death caused by apoptosis and that produced by necrosis.

The processes of apoptosis and necrosis differ in that, in the latter, cell death is due to physical, thermal, or ischemic stimuli that produce swelling of the cell and mitochondria and rupture of the membrane and organelles, as well as damage to the cytoskeleton and nucleus, which eventually leads to cell death [2]. In contrast, apoptosis is characterized by persistence of membrane integrity until the final phases of the death process when the membrane starts to shrink as the cell volume diminishes. In the meantime, lysosomal

content remains intact, cell fragmentation continues, and apoptotic bodies are formed; these are small membrane-associated vesicles that are phagocytized by neighboring cells.

The distinctive feature of apoptosis is DNA fragmentation. The morphologic and biochemical processes of apoptosis are mainly mediated by death effectors, such as proteases, which lead to nuclear and cellular fragmentation. Before these death effector pathways are activated, the life/death balance of the cell is modulated by a complex interaction between the different death effectors. When this balance tilts towards apoptosis, the cell death effectors start to act [2].

The present review discusses the regulatory effects of the proteins that participate in apoptosis. Firstly, the apoptotic pathways and the proteins that were involved in each will be described. Subsequently, the relevant characteristics of the *Ginkgo biloba* leaf extract (EGb 761) will be explained. Lastly, studies on the antiapoptotic function of EGb 761 will be analyzed.

2. Pathways Leading to Apoptosis Activation

The molecular mechanisms of apoptosis (cascade of events starting at the cell surface up to the final changes in the nucleus) have not been totally clarified; however, several key proteins are implicated in the regulation of programmed cell death [3, 4]. Two main pathways have been described that lead to apoptosis: the extrinsic or death receptor pathway and the intrinsic or mitochondrial pathway [5–7]. Recently, evidence has been found that in certain types of cells the two pathways converge [6]. The mechanisms of apoptotic death, both intracellular and extracellular, combine to activate a group of proteases named caspases, specific for aspartates and cysteines. These are present as inactive proteins in live cells and are activated by proteolysis [8]. Initiator caspases are able to activate effector caspases or to amplify the signal, augmenting their own activation [9], leading to cell death [8, 10].

2.1. Extrinsic Pathway. The extrinsic pathway of programmed cell death requires the activation of membrane receptors [5]. These cell death receptors belong to the genic superfamily of receptors of the tumor necrosis factor (TNFR) and are characterized by a cysteine-rich extracellular domain and a homologous cytoplasmic sequence named death domain (DD).

2.1.1. Fas Receptor. The Fas receptor (also known as cytotoxicity-dependent protein, CD-95, or Apo-1) is a surface membrane protein of the death receptor superfamily, named tumor necrosis factor/nerve growth factor (TNF/NGF) [11–15]. It is abundantly expressed in several cells [12] including neurons [16, 17] and plays an important role in apoptosis [18]. Fas is a type I membrane protein with two N-glycosylation sites in the extracellular domain, a cysteine-rich region where the ligand binds and an intracellular death domain close to the carboxyl terminal [12, 15, 19].

2.1.2. FasL (Fas Receptor Ligand). FasL belongs to the genic family of the tumor necrosis factor (TNF); it is a type II homotrimeric cell-surface glycoprotein with molecular

weight of approximately 40 kDa, a cytoplasm-oriented N-terminal and an extracellularly oriented C-terminal [20]. After Fas receptor activation by its ligand, the protein forms microaggregates with the death domains of the Fas receptor. This involves recruitment of a cytoplasmic adaptor cell, which also contains a Fas-associated death domain (FADD).

2.1.3. FADD. The FADD protein presents a single serine phosphorylation site (Ser 194 for human and Ser 191 for mouse), which is essential for other cell functions: cell cycle regulation, survival, and proliferation in some cell types [21, 22]. The amino terminal of FADD is named death effector domain (DED) and recruits procaspase-8. The dimerization of this procaspase brings about its autoactivation, which leads to the mature form of the protein and the consequent onset of the apoptotic cascade. The transducer FADD protein is expressed in cytoplasm and in the nucleus [23]. After binding to the Fas receptor, the cytoplasmic protein is rapidly recruited to the cytoplasmic membrane where, together with the receptor and procaspase-8, it forms the death-inducing signaling complex (DISC) [24, 25]. Later, procaspase-8 autolytically splits producing caspase-8 (active form), which, in turn, cleaves and activates a cascade of effector caspases (caspase-3). This provokes fragmentation of numerous substrates until cell death ensues [18]. Cell death induced by Fas in the nervous system [26] shares the same basic mechanisms as described for peripheral cells [4].

Once caspase-8 has been activated, it has two possibilities: to activate the previously described caspase cascade or to act on a member of the Bcl-2 protein family named Bid. The proteins of the Bcl-2 family are grouped into three subfamilies: the antiapoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-XI, Mcl-1, and others); the multidomain-type proapoptotic protein family (Bax and Bak); and the BH3-type proapoptotic proteins (Bid, Bim, Bad, and others). The truncated form of Bid may translocate to the mitochondria where it activates the mitochondrial pathway by a mechanism yet to be clarified. At this point, the extrinsic and intrinsic pathways converge [27].

2.2. Intrinsic Pathway (Mitochondrial Pathway). A pathway, independent of the death receptors, is the mitochondrial apoptosis (intrinsic pathway) [4, 28, 29]. This pathway is mediated by stimuli such as chemotherapeutic agents, UV radiation, stress molecules (reactive oxygen and nitrogen species), oncogenes, hypoxia, and survival factor deprivation, which induce the activity of the p53 protein [26–28]. This pathway can also be activated by death receptors to amplify the apoptosis-inducing signal [30].

Proteins of the Bcl-2 family are involved in control of apoptosis and participate as activators or inhibitors of cell death [27]. Bcl-2 is an oncoprotein of 26 kDa, mainly localized in the internal mitochondrial membrane. A neuroprotective role, opposite to apoptotic cell death, has also been attributed to it [31], probably by preventing the release of cytochrome c (induced by Bax) and the subsequent activation of effector caspases [4, 27, 32]. Once cytochrome c (*cyt c*) has been released from mitochondria, an apoptosome is formed by the assembly of the apoptotic protease activation factor

(Apaf-1) with procaspase-9. The Apaf-1 factor is a cytoplasmic monomer of 130 kDa that contains a caspase recruiting domain [33]. Procaspase-9 recruitment by Apaf-1 through the so-called caspase recruitment domain (CARD) requires ATP. Later, procaspase-9 automatically cleaves producing active caspase-9, which, in turn, activates other caspases (caspase-3, -6, and -7) and provokes fragmentation of other substrates and cell death. The release of *cyt c* from mitochondria to the cytoplasm is an important regulating step in caspase activation; it activates Apaf-1 and interrupts the electron transference chain reducing energy production, thus increasing reactive oxygen species (ROS) [34].

3. *Ginkgo biloba* and EGb 761

Some herbal products have attracted interest in the so-called alternative treatments; among them, *Ginkgo biloba* is one of the most extensively studied. The tree has been present for some 250 million years; it is therefore considered a living fossil. The word *ginkgo* derives from the Chinese *Yin-kuo* for golden apricot; *biloba* refers to the bilobular morphology of the leaves [35]. In China, its leaves were considered medicinal as far back as 2800 B.C; infusions were prepared for the treatment of asthma and bronchitis [36]. During the past decade, evidence has been gathered suggesting that concentrates and purified extracts of *Ginkgo biloba* leaves promote protection from neuronal and vascular damage [36].

Various extracts from *Ginkgo biloba* leaves have been prepared; one of them is called EGb 761. This extract is a well-defined and standardized mixture and has been used for treatment of brain disorders (including dementia), neurosensory syndromes, peripheral blood flow disorders, and cerebral insufficiency [37]. The latter is defined as the set of hemodynamic disturbances in the arterial system, manifesting as impaired circulatory flow, causing a number of different clinical manifestations depending on the brain regions affected. Symptoms include localized pain in a brain artery, dizziness and balance disorder, optical disorders that can range from simple blurred vision to oculomotor paralysis transient bilateral, recurrent headaches, syncope, fainting, and waking disorders. This disease stands out as the most common cause of disability in adult people in Germany having a very high incidence (250 cases per 100,000 population per year) [38]. Therefore, in 1965, the German Dr. Willmar Schwabe characterized the pharmacological activity of *Ginkgo biloba* and registered it for therapeutic use as EGb 761. In 1978, the product was commercialized under the name Tebonin 761 as a 40 mg oral formulation, and in 1982, Schwabe himself commercialized Tebonin forte, an 80 mg oral formulation [39].

The EGb 761 consists of a mixture of active compounds obtained by multiple extractions. Its effects on vestibular disorders, sexual dysfunction induced by antidepressants, traumatic brain injury, and hypertension have been explored [35]. It has been found to show protective effects against hypoxia, to inhibit platelet-aggregation factor (PAF), to increase blood rheology, and reduce capillary permeability. The therapeutic effect of EGb 761 is attributed to the whole of

its constituents [35]. However, select constituents have been identified as mediating a variety of more specific effects.

3.1. Chemical Composition of EGb 761. The *Ginkgo biloba* tree is composed of amino acids, sugars, polysaccharides, organic acids, inositols, and sterols among other constituents. The active principles are compounds with different chemical structure: flavonoids, present in approximately 26%, terpenoids, 6-7%, and organic acids in minor quantities (Figure 1) [35].

Flavonoids, also known as phenylbenzopyrones or phenylchromones, are a group of substances of low molecular weight broadly distributed in the plant kingdom. The flavonoids present in EGb 761 are flavones, flavonols, tannins, biflavones (amentoflavones, bilobentol, 5-metoxibilobetol, ginkgetin, isoquingetin and ciadopitysin), quercetin glucosides, and kaempferol [36]. These compounds act as antioxidants/free radical scavengers, enzyme inhibitors, and cation chelating agents [38]. In general, flavonoids show low bioavailability because they are poorly absorbed by the intestine in their glycosylated form and are rapidly eliminated. They are absorbed only when presented as aglycones [40]. Nonabsorbed flavonoids that reach the colon are subject to bacterial enzyme degradation; then, the metabolites may be absorbed. Once absorbed, flavonoids are metabolized in the liver into their conjugated derivatives [41]. EGb 761 also contains terpenoids, which are nonsaponifiable lipids of the cyclic ester type (lactones). Two types of terpenoids are present in the extract: ginkgolides and bilobalides [42]. The ginkgolides are classified into 5 types: A, B, C, J, and M. Types A, B, and C are present in 3.1% of the total extract of the *Ginkgo biloba* leaf. Bilobalide is a sesquiterpene trilactone present in 2.9% of the total extract [41].

The polyvalent action of EGb 761 is responsible for the efficacy in the treatment of clinical disorders of multifactorial origin [42]. The multiple effects of EGb 761 on different therapeutic targets are due to the synergistic activity of its constituents, their additive effect, and even their antagonistic interactions [41]. The ginkgolides are PAF antagonists and able to reduce platelet activation and aggregation, and therefore having the potential to improve blood circulation. Bilobalide can reduce cerebral edema and damage from cerebral ischemia. The antioxidant effect of the flavonoid fraction may be achieved by direct attenuation of ROS, chelation of prooxidant transitional metal ions, expression of antioxidant proteins like superoxide dismutase (SOD), or the increase in antioxidant metabolites such as glutathione. Therefore, the flavonoids react preferentially with hydroxyl radicals (OH^{\bullet}) and directly scavenge them [41].

4. Antiapoptotic Effects of EGb 761

EGb 761 has shown antiapoptotic effects in diverse tissues associated with various multifactorial and synergistic actions. Among these are reduction in the number of apoptotic cells, maintaining of the mitochondrial integrity, inhibition of *cyt c* release from the mitochondria, increase in antiapoptotic protein Bcl-2 transcription rate, and decrease in caspase transcription rate and DNA fragmentation.

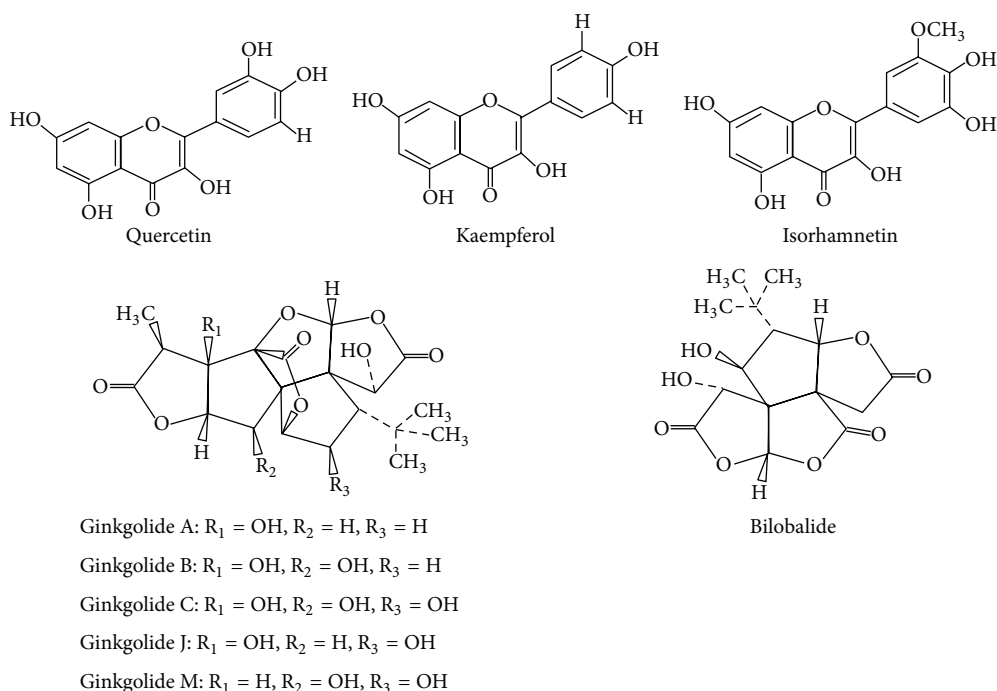


FIGURE 1: Chemical structures that represent some EGb 761 constituents (taken from [35]).

4.1. Reduction in the Number of Apoptotic Cells. The protective and recuperative effects of EGb 761 on different cell types have been demonstrated in animal models. Ergun et al. [43] showed death inhibition by EGb 761 at a dose of 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in human lymphocytes exposed to gossypol, a toxin that causes cell death via apoptosis. Similar results have been observed in thymus cells pretreated with EGb 761 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and then exposed to ferrous sulfate in hydrogen peroxide (H_2O_2) [44]. In addition, in lymphocytes isolated from spleen of aged mice treated with 100 mg/Kg EGb 761 for 2 weeks, less susceptibility to ROS-induced apoptosis was found [45]. In the peripheral nervous system, posttreatment with EGb 761 (100 mg/kg) decreased the number of apoptotic cells in injured rat spinal cord [46]. In central nervous system, treatment with EGb 761 (40 mg/kg) reduced neuronal death in the *substantia nigra pars compacta* from an experimental model of Parkinson's disease [47].

4.2. Mitochondrial Preservation. Mitochondria play a key role in apoptosis; changes in its structure and function develop when free radicals accumulate [48]. Reduction of the mitochondrial membrane potential triggers the intrinsic pathway of apoptosis. In a model of ageing in rats, treatment with 100 mg/kg EGb 761 prevented morphological changes and diminished oxidative stress in liver and brain mitochondria [49]. Flavonoids, which are components of EGb 761, prevent lipid peroxidation as they interact with molecules of the lipid bilayer, contributing to the stability and functionality of the mitochondrial membrane [50]. Pretreatment with EGb 761 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of PC12 cells preserves the mitochondrial membrane potential, allowing increased ATP production and

preventing the damage caused by oxidative stress [51]. In the nervous system of adult animals, the administration of EGb 761 increases mitochondrial ATP content [52, 53].

4.3. Regulation of *cyt c*, *Bax*, *Bcl-2*, and *Apaf-1* Expression. As described previously, the release of *cyt c* into the cytoplasm triggers apoptosis via the caspase-9 pathway. However, other alternatives have been recently described to explain apoptosis generated by mitochondria. For example, it has been proposed that *cyt c* is released instantly prior to the transitory opening of the permeability pore and to the loss of membrane potential. Moreover, Bax may promote this *cyt c* release without involving the pore. In a healthy cell, the external mitochondrial membrane expresses Bcl-2 on the surface, which binds to Apaf-1, which is kept inactivated. Any alteration at the internal equilibrium of the cell, for example the accumulation of ROS, causes mitochondrial *cyt c* release. In turn, Bcl-2 liberates Apaf-1 that then binds to *cyt c* [31, 34]. EGb 761 administration decreases the expression or activation of the proteins that participate in the apoptotic signaling cascade of the intrinsic pathway. For example, cell death is induced by release of mitochondrial *cyt c* in testicles and heart of rats when doxorubicin is administered. Pretreatment with EGb 761 prevents the release of *cyt c* and activation of p53 and Apaf-1, thus acting against doxorubicin [54, 55]. The effects of EGb 761 on Bax and Bcl-2 have been studied using various experimental models that generate neuronal toxicity. Pretreatment with EGb 761 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) increased Bcl-2 mRNA expression in cerebellum cells incubated with OH^\bullet [56]. A neuroprotective effect obtained by an increase in Bcl-2 expression has also been reported in PC12 cells damaged

by staurosporine [57]. EGb 761 administrations diminish Bax expression in the hippocampus of rats suffering from accelerated senescence [58]. Jiang et al. [59] observed a protective effect of EGb 761 in apoptotic spinal cord neurons exposed to oxidative stress; the antiapoptotic effect was caused by regulation of Bcl-2 and Bax expression. The protective effect of EGb 761 against paraquat-induced cell death in PC12 cells is partially due to an increase in Bcl-2 expression [60]. Studies on a focal ischemia model have shown that EGb 761 reduces the amount of Bax in cerebral cortex, increasing the amount of Bcl-2 [61]. Also, administration of EGb 761 during 5 days inhibits Bax activity in diverse brain regions when global ischemia is applied to mice with accelerated senescence [62]. As a whole, these studies show that EGb 761 increases the expression of Bcl-2 and inhibits the expression of Bax when there is a cellular damage.

4.4. Caspase Activity. EGb 761 treatment inhibits the activity of different caspases involved in both the intrinsic and the extrinsic pathway. Posttreatment with EGb 761 inhibited caspase-9 activity in six brain regions of mouse following global ischemia in senescence-accelerated mice [62]. In agreement, 1 mg/mL EGb 761 prevented the increase in the activity of caspases-3 and -9 in bone-marrow mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions [63]. Also, in cultures of rat cortical neurons incubated with 200 nM staurosporine to induce apoptosis, EGb 761 inhibited caspase-3 activity [64]. The inhibitory action of EGb 761 on caspase-3 activity has been reported in different apoptosis models [51, 60, 65, 66]. These studies evidence the inhibiting effect of EGb 761 on caspases of both the intrinsic and the extrinsic pathways.

4.5. DNA Fragmentation. In the process of apoptosis, one phase involves the degradation of proteins and nucleic acids. DNA is fragmented by endonucleases [1]. In endothelial lung cells incubated with 100 $\mu\text{g/mL}$ EGb 761 and exposed to cigarette smoke, the DNA fragmentation was diminished [66]. Similar effects were found in cells exposed to paraquat; DNA fragmentation was reduced by pretreatment with EGb 761 at doses of 10, 20, and 40 $\mu\text{g/mL}$ [60]. Furthermore, in cerebellum granular cells, EGb 761 has shown a neuroprotective effect in the DNA fragmentation caused by OH^\bullet [56].

5. Antiapoptotic Mechanisms from EGb 761

Defects in the physiological pathways of apoptosis, leading to defective cell survival, are thought to be involved in several major diseases for which therapy is lacking [67]. Oxidative stress has been widely implicated in neuronal death associated with chronic neurodegenerative diseases like Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases or amyotrophic lateral sclerosis [68]. Oxidative stress is caused by an enhanced production of ROS and reactive nitrogen species (RNS), including superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), OH^\bullet , peroxy radical (ROO^\bullet), alkoxy radical (RO^\bullet), and peroxynitrite anion (ONOO^-), as well as nonradical species such as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), ozone (O_3), and H_2O_2 [69, 70]. The main

source of cellular ROS is the mitochondria electron transport chain, located in mitochondria, through which continuous aerobic respiration generates $\text{O}_2^{\bullet-}$ [70]. The moderately reactive $\text{O}_2^{\bullet-}$ is the substrate for SOD enzymes, yielding H_2O_2 , which in turn is the precursor of the highly toxic HO^\bullet , which was generated in the presence of reduced iron (Fe^{2+}) or copper (Cu^{2+}) through Fenton reaction. In addition of mitochondrial electron transport chain, low levels of ROS are produced by membrane-localized NADPH oxidase enzymes, peroxisomes, and the cytochrome P450 system [71, 72]. At low levels, ROS participate in cellular signaling; however, at high levels, ROS can cause irreversible oxidative damage to lipids, proteins, and DNA, which induce apoptosis in a variety of cell types [73]. Other mechanisms have been proposed for ROS-induction apoptosis. As reported by Wang et al. [74], when there is an increase of H_2O_2 , it can cause apoptosis by upregulating Fas-FasL system (extrinsic pathway of apoptosis). H_2O_2 could also disrupt the mitochondrial membrane potential thereby leading to the release of proapoptotic components present in the mitochondria. In addition, it activates several transcriptional factors such as $\text{NF-}\kappa\text{B}$, AP-1, and p53 and causes them to translocate into the nucleus. They could drive the expression of proapoptotic genes and also the inhibitors of survival-related genes [75, 76]. Complex antioxidant defense mechanisms have evolved to protect cells from oxidative injury, including enzymatic and nonenzymatic systems. Antioxidant enzymes include catalase, SOD, and glutathione peroxidase (GPx) [77, 78].

5.1. Antioxidant Properties of EGb 761. The flavonoid fraction (quercetin, kaempferol, and isorhamnetin glycosides) and terpenoid fraction (ginkgolides and bilobalides) constituents of EGb 761 inhibit apoptosis by its effect as antioxidants [79–82]. These latter compounds may act directly “scavenging” free radicals such as superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$), OH^\bullet , peroxy radical, and related ROS like H_2O_2 and oxoferryl species. Jiang et al. [59] reported that EGb 761 protects against H_2O_2 -induced death through inhibition of intracellular ROS production and modulation of apoptotic regulating genes (increased Bcl-2 and decreased Bax), suggesting that oxidative stress directly induces apoptosis and that EGb 761, a powerful antioxidant agent, can effectively protect the cell from apoptosis induced by oxidative stress. H_2O_2 reduces Bcl-2 gene expression and tends to increase Bax expression. Bcl-2, as an antioxidant, prevents ROS accumulation and other subsequent events such as mitochondrial membrane depolarization, Bax relocalization, *cyt c* release, caspase activation, and nuclear fragmentation [83]. The antioxidant action of EGb 761 is due mainly to the flavonoid fraction effective against superoxide anion, $\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^\bullet , and peroxy radicals [82, 84]. Flavonoids also prevent lipid peroxidation in membranes, particularly owing to their ability to interact with and penetrate the lipid bilayers [50]. The terpenoid fraction has been found to have antioxidant effects in a model of neurodegeneration [85]. The protective effects of terpenes appear to involve inhibition of free radical formation [86], increasing intracellular levels of enzymatic antioxidants, such as SOD and catalase [87].

5.2. Influence of EGb 761 on Gene Expression. Functional and genomic studies reveal that EGb 761 upregulates and downregulates various signaling pathways as well as the transcription of some genes. These events may increase stress resistance and stabilize the cellular redox state in living organisms [40, 88, 89]. Bilobalide upregulates two mitochondrial DNA-encoded genes: subunit III of cytochrome c oxidase (complex IV) and subunit ND1 of NADH dehydrogenase (complex I) of the respiratory chain, indicating a fundamental mechanism that may underline EGb 761 induced neuroprotection [90, 91]. Enhancement of the respiratory control ratio, improving ATP synthesis, and preserving the mitochondrial outer membrane integrity prevent *cyt c* release, thereby blocking the formation of the apoptosome and the apoptotic caspase cascade [89]. Tendi et al. [91] suggest that EGb 761 and bilobalide might indirectly increase ND1 transcription by modulating the expression and/or the binding of transcription factors in the promoters of genes involved in mitochondrial transcription. In addition, both flavonoid and terpenoid constituents of EGb 761 decrease the expression of iNOS, which might oppose the deleterious effects of excessive production of NO[•] [92], which inhibit the complex I of respiratory chain by S-nitrosation, tyrosine nitration, and damage to FeS centers [93] and could increase Bax expression and decrease Bcl-2 expression subsequently leading to neural death [94]. Mak et al. [58] have suggested that EGb 761 protects the hippocampus from neural death by reducing the NO[•] levels through changes in Bax to Bcl-2 expression ratio. EGb 761 also increases the transcription of antiapoptotic Bcl-2-like protein inhibiting the proapoptotic factor Bax [59] and attenuates the transcription of proapoptotic genes, such as Fas, Bax and Bcl-xs, and caspase-7, -8, and -12 [57, 95]. Thus, the regulation of gene expression of proteins of the Bcl-2 family during brain injury could be relevant to explain the beneficial effects of EGb 761 extract in treating AD, as well as its possible benefits for treating other neurodegenerative and ischemic disorders of the nervous system whose pathogenesis involves oxidative stress and apoptosis.

6. Molecular Targets of EGb 761

The ability of EGb 761 to induce expression of genes affects apoptosis through NRF2 and also modulates transcription factors such as CREB, HIF-1 α , NF- κ B, AP-1, and p53.

6.1. Nrf2. Nuclear transcription factor E₂-related factor-2 (Nrf2) plays an important role in detoxification from carcinogenic agents and in the modulation of the antioxidant cell defense system. In normal conditions, Nrf2 is localized in the cell cytoplasm, forming a complex with the inhibitory protein Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) [96]. However, oxidative stress leads to dissociation of Nrf2 from Keap1, thereby rescuing Nrf2 from proteasomal degradation and inducing its translocation into the nucleus where, together with other transcription factors, it binds to ARE to regulate the expression of target genes [97–100]. For example, NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 (NQO1), SOD, GPx, heme oxygenase-1 (HO-1), catalase, thioredoxin (Tx1), γ -glutamyl-cysteinyl-synthase (γ -GCS),

glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC), and glutathione-S-transferase subunit-P1 (GST-P1). Besides, Nrf2 also shows antiinflammatory effects [96, 97].

EGb 761 upregulates the expression of genes (and their respective protein products) that encodes antioxidant enzymes such as mitochondrial SOD, GPx, GCLC, and HO-1 [101–105]. HO-1, a heat shock protein of 32 kDa, degrades prooxidant free heme to iron, carbon monoxide (CO), and biliverdin which is reduced to bilirubin (BR); both are direct antioxidants [106]. Also, the induction of HO-1 increase levels of the antiapoptotic phosphorylates Akt and Bcl-xl [107]. Hsu et al. [66] have shown that EGb 761 confers protection from oxidative stress-related apoptosis induced by cigarette smoke extracts in human lung endothelial cells. This effect depends on transcriptional upregulation of HO-1 by EGb 761 via activation of MAPKs such as JNK, ERK, and p38 as well as nuclear translocation of Nrf2. Polyphenols including epigallocatechin-3-gallate, quercetin, and resveratrol, upregulate HO-1 via MAPKs/Nrf2 pathway [108–110]. Additionally, EGb 761 increases mRNA and protein levels of GST-P1 and NQO1 in vitro through the Nrf2-Keap1-ARE signaling pathway [111]. Liu et al. suggest that EGb 761 may have dual effects on Keap1; first, EGb 761 interacts with keap1 (or Nrf2) to dissociate the Nrf2-Keap1 complex, facilitating the release and nuclear translocation of Nrf2; second, EGb 761 reduced expression or enhanced degradation of Keap1 enables Nrf2 nuclear translocation.

Phase 2 gene inducers react much more avidly with Keap1 than with Nrf2; both contain multiple cysteine residues, which react with phase 2 inducers [98]. Wakabayashi et al. [112] have suggested that the cysteines C273 and C288 in the intervening region of keap1 may sequester one molecule of Nrf2 between two DGR domains in the cytosol and ensure its rapid turnover by targeting it for proteasomal degradation. Upon exposure to inducers, the reactive C273 and C288 residues form an intermolecular disulfide bond, covalently linking two monomers of Keap1 and changing its conformation accordingly. The DGR domains are then separated to release Nrf2, which translocates to the nucleus, activating the expression of phase 2 genes.

6.2. CREB. cAMP responsive element binding protein (CREB) is a transcription factor with multiple functions [113] believed to play a key role in cell survival. Reportedly, CREB mediates the expression of several neuroprotective proteins, including Bcl-2 and BDNF [114]. CREB is phosphorylated by several different proteins, including Akt, (PKA protein kinase A), (PKC protein kinase C), (CSNK casein kinase), and (CaMKs calmodulin kinases) [115]. Phosphorylation by these kinases can either increase or decrease the activity of CREB. Smith et al. [57] has reported, by microarray assay, an upregulation of Bcl-2 in the neuronal cells treated with EGb 761, suggesting that it would be mediated via CREB activation. EGb 761 increases CREB phosphorylation via the activation of Akt, releasing BDNF and consequently protecting the neurons injured by ischemia [116]. Similarly, EGb 761 restored impaired phosphorylation of CREB and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in β -amyloid-expressing neuroblastoma cells enhancing hippocampal neurogenesis

and phosphorylation of CREB in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease (AD) [117, 118]. These studies suggest that flavonoids, the major active constituents of EGb 761, may upregulate the CREB-BDNF pathway.

Quercetin and kaempferol, flavonols extracted from leaves of ginkgo, improve impaired neuroplasticity in transgenic cortical neurons and hippocampus of transgenic mice upregulating the CREB-BDNF signaling pathway and might represent a potential treatment for AD [119]. Bilobalide and quercetin increased significantly cell proliferation in hippocampal neurons in a dose-dependent manner and enhanced phosphorylation of CREB, elevating the contents of pCREB and BDNF in brain of mice [120]. Furthermore, inhibitors of upstream signaling pathways of CREB, including protein kinase C, ERK, ribosomal S6 kinase (RSK) 90, and nitric oxide pathway differentially blocked the effects of the individual components of EGb 761, ginkgolide C, quercetin, and bilobalide. These results suggest diverse effects of the EGb 761 individual components and provide direct insights about the mechanisms underlying the effect of EGb 761 in the enhancement of the cognitive performance of AD patients [118].

6.3. HIF-1. The hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) transcription factor is a heterodimer composed by the oxygen-regulated HIF- α subunit and the constitutively expressed HIF- β subunits. Three isoforms of the α -subunits (HIF1 α , HIF2 α , and HIF3 α) and two isoforms of the β -subunits (HIF-1 β and HIF-2 β) are known to be involved in the *in vivo* response to hypoxia [121–123]. Under aerobic conditions, HIF-1 α is hydroxylated by specific PHDs (prolyl hydroxylases) in its oxygen-dependent degradation domain (ODD); it binds subsequently and is degraded by the von Hippel-Lindau protein (pVHL) leading to HIF-1 α ubiquitination and degradation by the 26S proteasome [121, 124]. Under hypoxic conditions, PHDs lose their activity, which prevents hydroxylation and subsequent pVHL binding. This results in the stability of HIF-1 α , nuclear translocation, and heterodimerization with HIF-1 β and binds at specific DNA sequences known as hypoxia-response elements (HREs) of target genes [125] involved in crucial physiological functions including angiogenesis (VEGF and transforming growth factor- β 3: TGF- β 3), cell survival (insulin-like growth factor 2: IGF2), transforming growth factor α : TGF α), and glucose metabolism (hexokinase 1: HK1; glucose transporter 1: GLUT1; and enolase 1: ENO1) [125, 126]. The proteins encoded by these genes mediate adaptive physiological responses such as angiogenesis and glycolysis that either serve to increase O₂ delivery or allow metabolic adaptation to reduced O₂ availability [125].

When HIF-1 is activated by hypoxia, it could play an antiapoptotic role by its ability to prompt anaerobic glycolytic metabolism, or expression of antiapoptotic proteins, such as Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, BNIP-3, VEGF, enolase, and erythropoietin, or downregulation of proapoptotic proteins such as Bid, Bax, Bak, TRAIL-R1, PAF, and caspases-3, -9, and -8 [127–129].

Under hypoxic conditions, EGb 761 has shown neuroprotective effects in different experiments *in vivo* and *in vitro* [130–135]. The nonflavone fraction is responsible for

the antihypoxic activity of EGb 761 [134, 135]. Zhu et al. [136] reported that ginkgolides, the main constituent of the nonflavone fraction of EGb 761, have a significant protective role against chemical and physical hypoxia-induced injury in neurons and PC12 cells; ginkgolides could significantly increase the expression of HIF-1 α mRNA and protein, increasing the expression of erythropoietin protein and the cell viability and simultaneously decreasing the release of LDH in hypoxic neurons. Furthermore, they demonstrated that ginkgolides could induce a significant increase in the activation of the p42/p44 (ERK) MAPK pathway, which play a key role in the upregulation of the HIF-1 α expression and enhance HIF-1 DNA binding activity, which might also be associated with a neuroprotective role of ginkgolides under hypoxic condition promoting the expression of the target genes of HIF-1 [137].

6.4. NF- κ B. The nuclear factor-kappa B (NF- κ B) transcription factor has emerged as a major regulator of programmed cell death via apoptosis and necrosis, activated by oxidative stress and inhibited by a variety of antioxidants [138]; NF- κ B resides inactive in the cytoplasm; the most abundant form is a heterodimer p50–p65, in which the p65 subunits contain the transcriptional activation domain [139]. In unstimulated cells, NF- κ B is retained in the cytoplasm through the binding of a family of inhibitors I κ B (I κ B α , I κ B β , and I κ B γ) [140]. Activation of NF- κ B requires sequential phosphorylation of I κ B by I κ B kinase (IKK α or IKK β), ubiquitination, and degradation by the proteasome, followed by the translocation of p50–p65 to the nucleus and binding to the specific κ B DNA consensus sequence in the enhancer region of a variety of κ B-responsive proapoptotic-genes, such as the death receptor Fas (CD95), TRAIL receptors DR4, DR5, and DR6, the death-inducing ligands FasL, TNF α and TRAIL, tumor suppressor p53, the proapoptotic protein Bax and Bcl-x_s as well as caspase-11, iNOS, and COX-2 [141–147]. NF- κ B signaling is also modulated by posttranslational modifications including reversible acetylation of the p65 subunits [148]. For example, transcriptional activity of p65 requires acetylation of Lys 310, which can be deacetylated by SIRT1, a class III histone deacetyltransferase [149]. It has been shown that EGb 761 reduces NO[•] and PGE₂ production in a model of inflammation [150], an effect possibly related with the inhibition of NF- κ B activation. EGb 761 also activates SIRT1 in N2a cells, which in turn suppresses the β -amyloid peptide mediated NF- κ B activation by promoting the deacetylation of Lys 310 of subunits p65, inducing protection from the neurotoxicity of β -amyloid [151]. Furthermore, EGb 761 inhibits ERK1/2, an upstream signaling pathway of NF- κ B. The authors suggested that as the flavonoids present in EGb 761 are well-known antioxidants, they could scavenge H₂O₂ and consequently attenuate NF- κ B activity, since H₂O₂ is a well-known activator of NF- κ B [151]. On the other hand, antioxidants inhibit the activity of NF- κ B [138]. For instance, quercetin decreases the phosphorylation of I κ B β , which decreased the activation of NF- κ B [152]. However, it has been reported that bilobalide blocks apoptosis of dopaminergic neurons through the suppression of the expression of p65 protein decreasing its nuclear translocation in rat *substantia nigra* [153] and that

TABLE 1: Specific effects and mechanisms associated with EGb 761 administration in vivo in several models and the equivalent dosage for human.

Dosage of EGb 761	Experimental treatment	Tissue studied	Equivalent dose for human*	Effect	References
Traumatic spinal cord injury					
100 mg/Kg i.g. SD rats	Daily, for 1, 7, 14, and 21 days after surgery	Spinal cord	112 mg	The percentage of iNOS-positive cells and apoptotic index of nerve cells in the EGb group was significantly lower than that in the control group, which suggested that EGb 761 suppressed iNOS expression and then prevented nerve cell death	[46]
Aging					
100 mg/Kg in SD rats	Daily, for 4 and 12 months	Cochlea	112 mg	EGb 761 treatment significantly prevented aging-related caspase-3/7-induced activity. This result correlates with significant improvement of auditory steady state	[53]
2 mg/Kg in SAMP8 mice	Daily, for 3 and 9 months	Hippocampus and motor cortex	1.12 mg	The Bax/Bcl-2 expression ratio was significantly decreased in the 9-month-old hippocampus and in the 3-month-old motor cortex as compared with the control group	[58]
100 mg/kg in NMRI mice	Daily, for 14 days	Spleen	56 mg	The number of ROS-induced apoptotic cells was significantly reduced in the EGb 761 group	[45]
Ischemia					
45 mg/kg, i.v. in SD rats	Just before reperfusion	Hippocampus	50 mg	EGb 761 treatment improved behavior score and enhanced the phosphorylations of Akt and CREB and the expression of BDNF	[116]
100 mg/Kg oral in SAMP8 mice	Daily, 3 days prior to surgery and further 4 days after	Frontal, parietal and temporal lobes, corpus striatum, cerebellum, and brainstem	56 mg	EGb 761 treatment significantly decreased Bax/Bcl-2 ratios as well as caspase-9 levels in all brain regions compared with control animals in both young and aged mice	[62]
100 mg/Kg in SD rats	One hour before the onset of MCAO	Cerebral cortex	112 mg	EGb 761 administration significantly decreased the number of TUNEL-positive cells and the ratio of Bcl-2 and Bax expression	[61]
100 mg/Kg in C57BLK/6 mice, HO-1 ^{-/-} knockout.	After 1.5 and 4 h of permanent distal MCAO	Cerebral cortex	56 mg	Treatment with EGb 761 decreased infarct volume and improved neurologic deficit scores. This protective effect was lost in HO-1 knockout	[105]
100 mg/Kg p.o. in C57BLK/6 mice, HO-1 ^{-/-} knockout	Daily, for 7 days before induction of MCAO	Brain.	56 mg	EGb 761 improved neurobehavioral function and decreased the infarct size. This effect was abolished in HO-1 knockout	[104]
Cardiovascular diseases					
5 mg/Kg i.p. in SD rats	Three doses: One dose every 2 days for 6 days	Heart	5.6 mg	EGb 761 alleviated doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through stabilizing a cascade of mitochondrial-signalling effectors from p53, Bcl-2 proteins, cytochrome c, and mitochondrial potential to caspase-3 implicating the additional counteracting action of EGb 761 against doxorubicin apoptotic cardiotoxicity at multiple cellular levels	[55]
50 and 100 mg/Kg in Wistar rats	Daily, for 10 and 15 days	Aortic blood	56 and 112 mg	EGb 761 significantly increased the levels of polyunsaturated fatty acids in erythrocyte membranes, especially the eicosapentaenoic acid, and decreased the saturation index	[179]

TABLE 1: Continued.

Dosage of EGb 761	Experimental treatment	Tissue studied	Equivalent dose for human*	Effect	References
Alzheimer's disease					
100 mg/Kg p.o. APP ^{swe} /PS1 ^{dE9} mice	Daily, for 30 days	Brain.	56 mg	EGb 761 treatment had no effect on the size of existing senile plaques, but it had a straightening effect on curved neurites, indicating that neuronal plasticity is fast and still active in adult animals	[180]
100 mg/Kg in C57BL/6J and double transgenic TgAPP/PS1 mice	In diet for 30 days	Hippocampus.	56 mg	EGb 761 reduced β -amyloid oligomers and restored CREB phosphorylation	[117]
100 mg/kg in SAMP8 mice	Daily, for 12 weeks	Hippocampus and platelets	56 mg	In platelets, EGb 761 protected against mitochondrial dysfunction, evaluated as cytochrome c oxidase activity, mitochondrial ATP and GSH content. In hippocampi, the protective effect of EGb 761 was observed only in old mice	[52]
Parkinson's disease					
40 mg/Kg i.p. in C57BL/6J mice	Daily, for 18 days	Striatum and midbrain	22.4 mg	EGb 761 administration upregulates the genes for tyrosine hydroxylase, vesicular monoamine transporter 2, dopamine transporter, dopamine D2 receptor, and transcription factors Pitx3 and Nurr1	[181]
40 mg/Kg i.p. in C57BL/6J mice	Daily, for 18 days	Striatum and <i>substantia nigra pars compacta</i>	22.4 mg	EGb 761 significantly attenuated MPTP-induced loss of striatal dopamine levels and tyrosine hydroxylase, blockade of lipid peroxidation, and downregulation of Mn-superoxide dismutase activity. Also, EGb761 improved MPTP-induced impairment of locomotion	[47]
Diabetes					
25, 50, and 100 mg/kg i.p. in Wistar rats	Daily, for 14 days	Blood and liver	112, 28, and 56 mg	EGb 761 attenuated the increase of lipoperoxidation and urinary nitrite levels in comparison with control	[182]

*The calculations of equivalent dose for human were according to Hernandez-Lopez [183]. The standard weight taken was of 70 kg. SD: Sprague-Dawley, MCAO: middle cerebral artery occlusion.

administration of ginkgolide B significantly suppresses gene expression of TLR-4 and NF- κ B, lessens concentrations of TNF α , IL-1 β , and IL-6, and reduces the number of apoptotic neuronal cells in hemorrhagic rat brain [154]. TLR4 stimulates the phosphorylation and degradation of I κ B, resulting in nuclear translocation of NF- κ B, which initiates transcription of genes associated with apoptosis and inflammation [155, 156]. Production of proinflammatory cytokines like IL-1 β , TNF α , and chemokines and the expression of iNOS involve NF- κ B activation, which may contribute to neuronal degeneration [156]. In addition, Wang et al. [157] have reported that ginkgolides (A + B) inhibit the nuclear translocation of p65 and downregulates the expression of NF- κ B target genes such as c-myc through the inhibition of the phosphorylation of NIK-IKK α -mediated NF- κ B activation signaling pathway (NIK/IKK/I κ B α /NF- κ B).

6.5. AP-1. The activator protein-1 (AP-1) is a series of related dimeric protein complexes that is composed of members of Jun and Fos families, which responds to low levels of oxidants resulting in AP-1/DNA binding and gene expression that mediate diverse signaling events implicated in apoptosis and inflammation [158–160]. AP-1 activation is due to the induction of JNK activity by oxidants resulting in the phosphorylation of serine 63 and serine 73 in the c-jun transactivation domain [161]. JNK exhibits redox-sensitive cysteine residues and could bind to glutathione S-transferase. In the absence of oxidative stress, JNK is associated with glutathione S-transferase, resulting in the inhibition of JNK activity [162]. Under oxidative stress conditions characterized by H₂O₂ overproduction, glutathione S-transferase is dissociated from JNK, resulting in its activation [163]. Numerous studies show that the JNK-AP-1 pathway can

TABLE 2: Modulation of molecular signals in apoptosis by EGb 761 and its constituents.

Compounds	Target/mechanisms	References
EGb 761	Reduction of the apoptotic cell death	[44–46]
	Reduction of Fas mRNA	[57, 95]
	Stabilization of mitochondrial transmembrane potential	[49–51]
	Enhancement of energy metabolism	[61]
	Increase of the antiapoptotic Bcl-2 protein	[57–59, 62, 95]
	Increase of mRNA of proapoptotic genes such as Bax and Bcl-xs and caspases-7, -8, and -12	[57, 62, 95]
	Inhibition of <i>cyt c</i> release and activation of Apaf-1	[54, 55]
	Reduction of caspase-9 and -3 activities	[51, 60, 62, 63, 65, 66]
	Prevention of nuclear DNA fragmentation	[56, 60, 66, 83]
	Inhibition of the production of cytokines, including TNF α , IL-2, IL-4, IFN- γ , and PGE2	[167]
	Free radical scavenging activity	[50, 79–84]
	Increase of Mn-SOD, GPx, GCLC, GST-P1, and NQO1 mRNA and protein	[101–105, 111]
	Induction of Nrf2 nuclear translocation by the increase of the degradation of Keap1	[111, 112]
Induction of CREB phosphorylation via activation of Akt, releasing BDNF	[107, 116]	
Activation of SIRT1	[151]	
Downregulation of JNK/AP-1 signaling pathway	[164, 165]	
Suppression of the activation of p53	[55]	
Flavone fraction		
Quercetin	Increase of cell proliferation and inhibition of apoptosis	[79–82]
	Free radical scavenging activity	[82, 84]
	Inhibition of TNF α transcription	[167]
	Upregulation of HO-1 via the MAPKs/Nrf-2 pathway	[110]
	Induction of nuclear translocation of Nrf 2	[110]
	Up-regulation of the CREB-BDNF pathway	[120]
	Decrease in I κ B β phosphorylation	[152]
	Inhibition of phosphorylation and activation of JNK and suppression of AP-1-DNA binding	[169]
Inhibition of ERK activation	[85]	
Kaempferol	Inhibition of apoptosis	[79–82, 184–188]
	Increase of Bcl-2 protein and decrease of Bax protein.	[184–188]
	Inhibition of <i>cyt c</i> release	[187, 188]
	Inhibition of caspase-3 activity and internucleosomal DNA fragmentation	[184, 187, 188]
	Free radical scavenging activity	[82, 84, 185, 186]
	Inhibition of the ascorbate-dependent NADH oxidase	[185]
	Induction of GCLC expression and increase of glutathione level	[187]
	Up-regulation of HO-1 via the JNK/Nrf-2 pathway	[187]
Suppression of p53 activation	[188]	
Inhibition of NF- κ B p65 protein	[189]	
Isorhamnetin	Prevention of cell death and suppression of apoptosis	[190]
	Up-regulation of Bcl-2-related genes	[190]
	Down-regulation of the BH3 only and Bax-like-related genes	[190]
	Inhibition of <i>cyt c</i> release from the mitochondria into the cytosol	[190]
	Inactivation of caspases-3 and -9 and cleavage of PARP	[190]
	Attenuation of DNA fragmentation	[190]
	ROS-scavenging effect	[82, 84, 190]
	Inactivation of the ERK pathway	[190]
Suppression of p53 activation	[190]	

TABLE 2: Continued.

Compounds	Target/mechanisms	References
Terpenoid fraction		
Ginkgolides	Increase of cell proliferation and inhibition of apoptosis	[90, 91]
	Free radical scavenging activity	[85–87]
	Decrease of the release of LDH, TNF α , IL-1 β , and IL-6	[90, 91, 154]
	Increase of the activation of the p42/p44 (ERK) MAPK pathway	[137]
	Increase of mRNA and protein levels of HIF-1 α	[137]
	Inhibition of the NIK/IKK α /I κ B/NF- κ B signaling pathway	[157]
	Decreases of c-fos and c-jun mRNA expression	[85]
Bilobalides	Inhibition of apoptosis	[177]
	Up-regulation of the subunit III of cytochrome C-oxidase and subunit NDI of NADH dehydrogenase	[90, 91]
	Decrease of c-myc, p53, and Bax proteins	[177]
	Inhibition of caspase-3 activity	[177]
	Suppression of p65 NF- κ B protein	[153]
	Up-regulation of the CREB-BDNF pathway	[120]

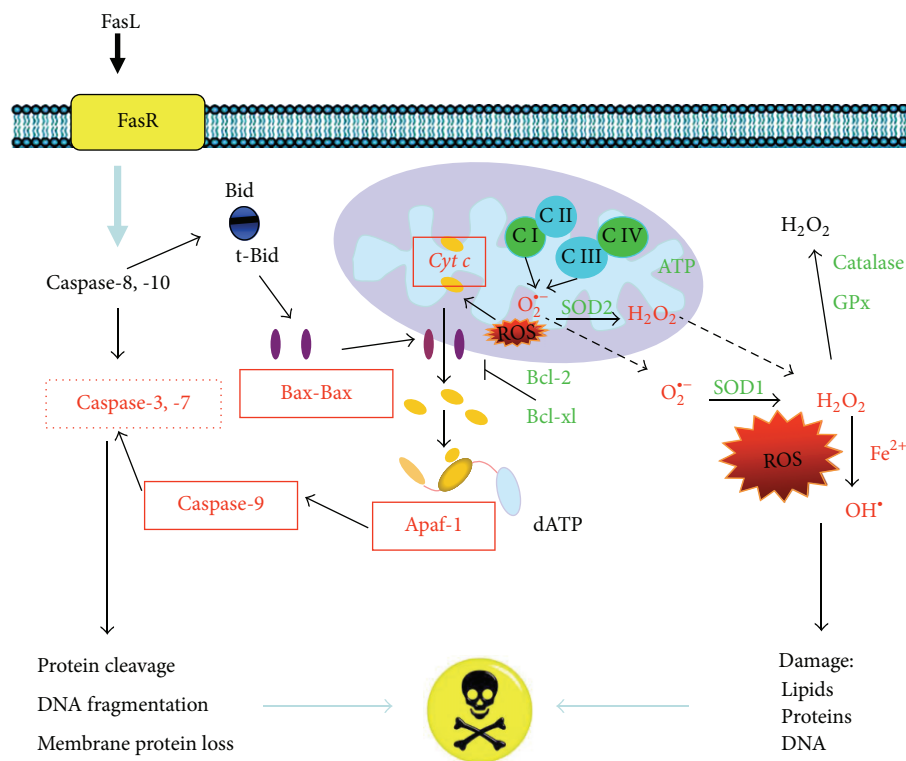


FIGURE 2: Inhibition of apoptosis by EGb 761. This figure details some of the mechanisms by which apoptosis may be inhibited by EGb 761, as described in the text. Apoptosis pathways include those initiated by death-receptor ligand or mitochondrial stress (i.e., ROS). These pathways may be downregulated at several levels by EGb 761: blocking the cascade of activation of caspases (-3, -7, and -9), inhibition of Bax and Apaf-1 proapoptotic protein expression, inhibition of *cyt c* release from the mitochondrial inner membrane to cytosol, and increments of Bcl-2 expression. EGb 761 also inhibits apoptosis acting as antioxidant and increasing intracellular levels of some enzymatic antioxidants (SOD, Cat, and GPx).

stimulate expression of proapoptotic genes such as TNF and FasL [164, 165]. JNK also decreases the expression of prosurvival genes such as Bcl-2 and Bcl-xl [165]. It has been reported that EGb 761 prevents the activation of JNK in the presence of β -amyloid; the EGb 761 ability to decrease H₂O₂ could prevent the dissociation of glutathione S-transferase

from JNK resulting in its activation, and this mechanism could also be implicated in the antiapoptotic effect of EGb 761 against oxidative stress induced by β -amyloid [151]. EGb 761 (50–100 μ g/mL) inhibits H₂O₂-induced cell apoptosis in SH-SY5Y cells via inactivation of AKT, JNK, and caspase-3 [166]. Similarly, EGb 761 protects against β -amyloid-induced

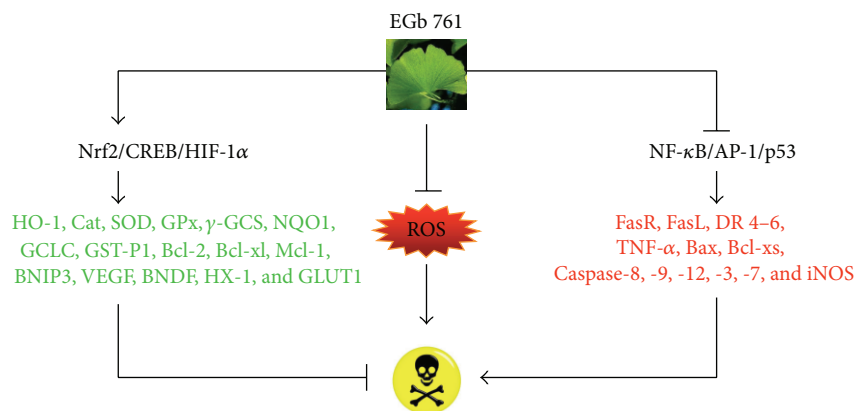


FIGURE 3: Antiapoptotic mechanisms from EGb 761. EGb 761 inhibits apoptosis through its antioxidant effect and by induction of gene expression, activating NRF2, CREB, HIF1 α , and also modulating transcription factors such as NF- κ B, AP-1, and p53.

cell apoptosis and abrogates β -amyloid-induced cytotoxic events. Accumulation of ROS and mitochondrial dysfunction and activation of JNK, ERK1/2, and Akt signaling pathways suggest that quercetin and ginkgolide B may be involved in the inhibitory effects of EGb 761 on JNK and ERK1/2 and Akt signaling pathways [85]. EGb 761 also inhibits production of several cytokines, including TNF α , IL-2, IL-4, and IFN- γ , through the down-regulation of JNK/AP-1 signaling pathway [167]. Quercetin, one of the major phenolic constituents of EGb 761, is unique in its ability to inhibit TNF- α transcription by inhibiting the phosphorylation and activation of JNK/SAPK and, therefore, suppressing AP-1-DNA binding [168]. Furthermore, quercetin inhibits iNOS transcription suppressing the phosphorylation of JNK/SAPK as well as its downstream substrates, c-jun and ATF-2, dramatically decreasing the binding of the transcription factor AP-1 to DNA [169]. Shi et al. [85] reported that pretreatment of the SH-SY5Y cells with ginkgolide B totally inhibited PAF-generated increases in c-fos and c-jun mRNA expression.

6.6. P53. The tumor suppressor p53 protein has been proposed as a key mediator of stress response (i.e., oxidative stress) to play an essential role in cell death [170, 171]. P53 induces cell death by a multitude of molecular pathways involving activation of target genes (i.e., Bax, Fas, and DR5) and direct signaling at the mitochondria, leading to *cyt c* release and caspase activation [172–175]. In vivo and in vitro studies have demonstrated that EGb 761 inhibits the mitochondrion-dependent cell apoptosis, mediated by p53, whereas EGb 761 ameliorates the p53 mRNA expression, disturbs the Bcl-2 family protein balance, disrupts mitochondrial membrane potential, inhibits the release of *cyt c* to cytosol, and activates caspases [55]. EGb 761 reduced significantly the effects of oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in PC12 cells and inhibits cell apoptosis suppressing p53 and caspase-3 activation and decreasing the ratio Bax and Bcl-2. It has been suggested that p53 is a direct transcriptional activator of the Bax gene [176]. Similarly, it was reported that bilobalide, the main constituent of the nonflavone fraction of EGb 761, protects neurons against oxidative stress; bilobalide may block apoptosis in the early

stage and attenuate the elevation of c-myc, p53, and Bax and the activation of caspase-3 [177].

7. Conclusions

Apoptosis or programmed cell death may be activated by two signaling pathways: the extrinsic (mediated by death receptors) and the intrinsic (triggered by mitochondria) [32]. Caspases, a family of intracellular endopeptidases, are responsible for this type of cell death [178]. EGb 761 inhibits apoptosis through its antioxidant effects and free-radical trapping (Figure 2) and by the activation of Nrf2/ARE, CREB, and HIF-1 and by decreasing the activities of NF- κ B, AP-1, and p53 transcription factors, which modulate antioxidant activity and anti- and proapoptotic genes expression (Figure 3).

Further studies are needed to corroborate the antiapoptotic activity and mechanisms of action of this phytochemical, since it could constitute an alternative for the treatment of vascular and degenerative diseases among others in which cell death by apoptosis plays a major role (for details see Tables 1 and 2).

Conflict of Interests

The authors do not have any conflict of interests with the content of the paper. In addition, they do not have direct financial relation with the commercial identity mentioned in the review.

Acknowledgment

This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the doctoral degree in Experimental Biology for NSG at the Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico.

References

- [1] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie, "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in

- tissue kinetics," *British Journal of Cancer*, vol. 26, no. 4, pp. 239–257, 1972.
- [2] M. Ebadi and R. F. Pfeiffer, *Parkinson's disease, Cap. 43*, CRC, Washington, DC, USA, 2005.
 - [3] R. A. Kinloch, J. M. Treherne, L. M. Furness, and I. Hajimohamadreza, "The pharmacology of apoptosis," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 20, no. 1, pp. 35–42, 1999.
 - [4] P. S. Sastry and K. S. Rao, "Apoptosis and the nervous system," *Journal of Neurochemistry*, vol. 74, no. 1, pp. 1–20, 2000.
 - [5] A. Ashkenazi and V. M. Dixit, "Death receptors: signaling and modulation," *Science*, vol. 281, no. 5381, pp. 1305–1308, 1998.
 - [6] S. Gupta, "Molecular steps of cell suicide: an insight into immune senescence," *Journal of Clinical Immunology*, vol. 20, no. 4, pp. 229–239, 2000.
 - [7] D. Nijhawan, N. Honarpour, and X. Wang, "Apoptosis in neural development and disease," *Annual Review of Neuroscience*, vol. 23, pp. 73–87, 2000.
 - [8] N. A. Thornberry and Y. Lazebnik, "Caspases: enemies within," *Science*, vol. 281, no. 5381, pp. 1312–1316, 1998.
 - [9] Z.-B. Wang, Y.-Q. Liu, and Y.-F. Cui, "Pathways to caspase activation," *Cell Biology International*, vol. 29, no. 7, pp. 489–496, 2005.
 - [10] G. M. Cohen, "Caspases: the executioners of apoptosis," *Biochemical Journal*, vol. 326, no. 1, pp. 1–16, 1997.
 - [11] N. Itoh, S. Yonehara, A. Ishii et al., "The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen fas can mediate apoptosis," *Cell*, vol. 66, no. 2, pp. 233–243, 1991.
 - [12] R. Watanabe-Fukunaga, C. I. Brannan, N. Itoh et al., "The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen," *Journal of Immunology*, vol. 148, no. 4, pp. 1274–1279, 1992.
 - [13] S. Nagata and P. Golstein, "The Fas death factor," *Science*, vol. 267, no. 5203, pp. 1449–1456, 1995.
 - [14] S. Nagata, "Fas ligand-induced apoptosis," *Annual Review of Genetics*, vol. 33, pp. 29–55, 1999.
 - [15] J. R. Orlinick, A. K. Vaishnav, and K. B. Elkon, "Structure and function of Fas/Fas ligand," *International Reviews of Immunology*, vol. 18, no. 4, pp. 293–308, 1999.
 - [16] I. Bechmann, G. Mor, J. Nilsen et al., "FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain," *Glia*, vol. 27, no. 1, pp. 62–74, 1999.
 - [17] C. Choi, J. Y. Park, J. Lee et al., "Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF- α , or IFN- γ ," *Journal of Immunology*, vol. 162, no. 4, pp. 1889–1895, 1999.
 - [18] D. J. MacEwan, "TNF ligands and receptors—a matter of life and death," *British Journal of Pharmacology*, vol. 135, no. 4, pp. 855–875, 2002.
 - [19] C. Lambert, A. M. Landau, and J. Desbarats, "Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system," *Apoptosis*, vol. 8, no. 6, pp. 551–562, 2003.
 - [20] T. Suda, T. Okazaki, Y. Naito et al., "Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage," *Journal of Immunology*, vol. 154, no. 8, pp. 3806–3813, 1995.
 - [21] C. Scaffidi, J. Volkland, I. Blomberg, I. Hoffmann, P. H. Kramer, and M. E. Peter, "Phosphorylation of FADD/MORT1 at serine 194 and association with a 70- kDa cell cycle-regulated protein kinase," *Journal of Immunology*, vol. 164, no. 3, pp. 1236–1242, 2000.
 - [22] J. Zhang, D. Zhang, and Z. Hua, "FADD and its phosphorylation," *IUBMB Life*, vol. 56, no. 7, pp. 395–401, 2004.
 - [23] M. Gómez-Angelats and J. A. Cidowski, "Molecular evidence for the nuclear localization of FADD," *Cell Death and Differentiation*, vol. 10, no. 7, pp. 791–797, 2003.
 - [24] F. C. Kischkel, S. Hellbardt, I. Behrmann et al., "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor," *EMBO Journal*, vol. 14, no. 22, pp. 5579–5588, 1995.
 - [25] A. Algeciras-Schimmich, L. Shen, B. C. Barnhart, A. E. Murmann, J. K. Burkhardt, and M. E. Peter, "Molecular ordering of the initial signaling events of CD95," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 22, no. 1, pp. 207–220, 2002.
 - [26] U. Felderhoff-Mueser, D. L. Taylor, K. Greenwood et al., "Fas/CD95/APO-1 can function as a death receptor for neuronal cells in vitro and in vivo and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain," *Brain Pathology*, vol. 10, no. 1, pp. 17–29, 2000.
 - [27] J. M. Adams and S. Cory, "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival," *Science*, vol. 281, no. 5381, pp. 1322–1326, 1998.
 - [28] K. C. Zimmermann, C. Bonzon, and D. R. Green, "The machinery of programmed cell death," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 92, no. 1, pp. 57–70, 2001.
 - [29] P. C. Ashe and M. D. Berry, "Apoptotic signaling cascades," *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 27, no. 2, pp. 199–214, 2003.
 - [30] S. D. Mundle and A. Raza, "Defining the dynamics of self-assembled Fas-receptor activation," *Trends in Immunology*, vol. 23, no. 4, pp. 187–194, 2002.
 - [31] D. Hockenbery, G. Nunez, C. Milliman, R. D. Schreiber, and S. J. Korsmeyer, "Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death," *Nature*, vol. 348, no. 6299, pp. 334–336, 1990.
 - [32] J. Yuan and B. A. Yankner, "Apoptosis in the nervous system," *Nature*, vol. 407, no. 6805, pp. 802–809, 2000.
 - [33] H. Zou, W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg, and X. Wang, "Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3," *Cell*, vol. 90, no. 3, pp. 405–413, 1997.
 - [34] J. C. Reed, "Cytochrome c: can't live with it—can't live without it," *Cell*, vol. 91, no. 5, pp. 559–562, 1997.
 - [35] F. V. DeFeudis, *Ginkgo Biloba Extract (EGb761): From Chemistry To the Clinic*, Ullstein Medical, Wiesbaden, Germany, 1998.
 - [36] K. M. MacLennan, C. L. Darlington, and P. F. Smith, "The CNS effects of *Ginkgo biloba* extracts and ginkgolide B," *Progress in Neurobiology*, vol. 67, no. 3, pp. 235–257, 2002.
 - [37] J. Kleijnen and P. Knipschild, "*Ginkgo biloba* for cerebral insufficiency," *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 34, no. 4, pp. 352–358, 1992.
 - [38] B. Hochmann, J. Coelho, J. Segura, M. Galli, C. Ketzoian, and M. Pebet, "The incidence of cerebrovascular accidents in the town of Rivera, Uruguay," *Revista de Neurologia*, vol. 43, no. 2, pp. 78–83, 2006.
 - [39] F. V. DeFeudis, "A brief history of EGb 761 and its therapeutic uses," *Pharmacopsychiatry*, vol. 36, supplement 1, pp. S2–S7, 2003.
 - [40] L. M. L. Goh and P. J. Barlow, "Flavonoid recovery and stability from *Ginkgo biloba* subjected to a simulated digestion process," *Food Chemistry*, vol. 86, no. 2, pp. 195–202, 2004.
 - [41] F. V. DeFeudis and K. Drieu, "*Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications," *Current Drug Targets*, vol. 1, no. 1, pp. 25–58, 2000.

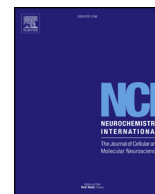
- [42] J. V. Smith and Y. Luo, "Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 64, no. 4, pp. 465–472, 2004.
- [43] U. Ergun, E. Yurtcu, and M. A. Ergun, "Protective effect of *Ginkgo biloba* against gossypol-induced apoptosis in human lymphocytes," *Cell Biology International*, vol. 29, no. 8, pp. 717–720, 2005.
- [44] Y.-M. Tian, H.-J. Tian, G.-Y. Zhang, and Y.-R. Dai, "Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on hydroxyl radical-induced thymocyte apoptosis and on age-related thymic atrophy and peripheral immune dysfunctions in mice," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 124, no. 8-9, pp. 977–983, 2003.
- [45] K. Schindowski, S. Leutner, S. Kressmann, A. Eckert, and W. E. Müller, "Age-related increase of oxidative stress-induced apoptosis in mice prevention by *Ginkgo biloba* extract (EGb761)," *Journal of neural transmission*, vol. 108, no. 8-9, pp. 969–978, 2001.
- [46] Q. Ao, X.-H. Sun, A.-J. Wang et al., "Protective effects of extract of *Ginkgo biloba* (EGb 761) on nerve cells after spinal cord injury in rats," *Spinal Cord*, vol. 44, no. 11, pp. 662–667, 2006.
- [47] P. Rojas, N. Serrano-García, J. J. Mares-Sámano, O. N. Medina-Campos, J. Pedraza-Chaverri, and S. O. Ögren, "EGb761 protects against nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice: role of oxidative stress," *European Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 1, pp. 41–50, 2008.
- [48] S. Desagher and J.-C. Martinou, "Mitochondria as the central control point of apoptosis," *Trends in Cell Biology*, vol. 10, no. 9, pp. 369–377, 2000.
- [49] J. Sastre, A. Millán, J. García de la Asunción et al., "A *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 24, no. 2, pp. 298–304, 1998.
- [50] A. Saija, M. Scalese, M. Lanza, D. Marzullo, F. Bonina, and F. Castelli, "Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 19, no. 4, pp. 481–486, 1995.
- [51] C. Shi, Z. Yao, J. Xu, and D. T. Yew, "Effects of *Ginkgo* extract (EGb761) on oxidative damage under different conditions of serum supply," *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 41, no. 1, pp. 61–69, 2009.
- [52] C. Shi, S. Xiao, J. Liu et al., "*Ginkgo biloba* extract EGb761 protects against aging-associated mitochondrial dysfunction in platelets and hippocampi of SAMP8 mice," *Platelets*, vol. 21, no. 5, pp. 373–379, 2010.
- [53] J. Nevado, R. Sanz, C. Sánchez-Rodríguez et al., "*Ginkgo biloba* extract (EGb761) protects against aging-related caspase-mediated apoptosis in rat cochlea," *Acta Oto-Laryngologica*, vol. 130, no. 10, pp. 1101–1112, 2010.
- [54] Y.-C. Yeh, T.-J. Liu, L.-C. Wang et al., "A standardized extract of *Ginkgo biloba* suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and p53-mediated mitochondrial apoptosis in rat testes," *British Journal of Pharmacology*, vol. 156, no. 1, pp. 48–61, 2009.
- [55] T.-J. Liu, Y.-C. Yeh, C.-T. Ting et al., "*Ginkgo biloba* extract 761 reduces doxorubicin-induced apoptotic damage in rat hearts and neonatal cardiomyocytes," *Cardiovascular Research*, vol. 80, no. 2, pp. 227–235, 2008.
- [56] W. Xin, T. Wei, C. Chen, Y. Ni, B. Zhao, and J. Hou, "Mechanisms of apoptosis in rat cerebellar granule cells induced by hydroxyl radicals and the effects of EGb761 and its constituents," *Toxicology*, vol. 148, no. 2-3, pp. 103–110, 2000.
- [57] J. V. Smith, A. J. Burdick, P. Golik, I. Khan, D. Wallace, and Y. Luo, "Anti-apoptotic properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in differentiated PC12 cells," *Cellular and Molecular Biology*, vol. 48, no. 6, pp. 699–707, 2002.
- [58] Y. T. Mak, W. Y. Chan, W. P. Lam, and D. T. Yew, "Immunohistological evidences of *Ginkgo biloba* extract altering Bax to Bcl-2 expression ratio in the hippocampus and motor cortex of senescence accelerated mice," *Microscopy Research and Technique*, vol. 69, no. 8, pp. 601–605, 2006.
- [59] X. Jiang, B. Nie, S. Fu et al., "EGb761 protects hydrogen peroxide-induced death of spinal cord neurons through inhibition of intracellular ROS production and modulation of apoptotic regulating genes," *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 38, no. 2, pp. 103–113, 2009.
- [60] X. Kang, J. Chen, Z. Xu, H. Li, and B. Wang, "Protective effects of *Ginkgo biloba* extract on paraquat-induced apoptosis of PC12 cells," *Toxicology in Vitro*, vol. 21, no. 6, pp. 1003–1009, 2007.
- [61] P.-O. Koh, "*Ginkgo biloba* extract (EGb 761) prevents increase of Bad-Bcl-XL interaction following cerebral ischemia," *American Journal of Chinese Medicine*, vol. 37, no. 5, pp. 867–876, 2009.
- [62] G. Lu, Y. Wu, Y. T. Mak et al., "Molecular evidence of the neuroprotective effect of *Ginkgo biloba* (EGb761) using bax/bcl-2 ratio after brain ischemia in senescence-accelerated mice, strain prone-8," *Brain Research*, vol. 1090, no. 1, pp. 23–28, 2006.
- [63] S. Li, D. Tang, Z. Xue et al., "Biphasic effect of EGb761 on simulated ischemia-induced rat BMSC survival in vitro and in vivo," *Life Sciences*, vol. 88, no. 19-20, pp. 853–863, 2011.
- [64] L. Massieu, J. Morán, and Y. Christen, "Effect of *Ginkgo biloba* (EGb 761) on staurosporine-induced neuronal death and caspase activity in cortical cultured neurons," *Brain Research*, vol. 1002, no. 1-2, pp. 76–85, 2004.
- [65] D. C. Ren, G.-H. Du, and J. T. Zhang, "Protective effect of *Ginkgo biloba* extract on endothelial cell against damage induced by oxidative stress," *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, vol. 40, no. 6, pp. 809–814, 2002.
- [66] C.-L. Hsu, Y.-L. Wu, G.-J. Tang, T.-S. Lee, and Y. R. Kou, "*Ginkgo biloba* extract confers protection from cigarette smoke extract-induced apoptosis in human lung endothelial cells: role of heme oxygenase-1," *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 22, no. 4, pp. 286–296, 2009.
- [67] J. C. Reed, "Apoptosis-based therapies," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 1, no. 2, pp. 111–121, 2002.
- [68] M. B. Graeber and L. B. Moran, "Mechanisms of cell death in neurodegenerative diseases: fashion, fiction, and facts," *Brain Pathology*, vol. 12, no. 3, pp. 385–390, 2002.
- [69] N. Shibata and M. Kobayashi, "The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases," *Brain and Nerve*, vol. 60, no. 2, pp. 157–170, 2008.
- [70] Y. Chen, E. McMillan-Ward, J. Kong, S. J. Israels, and S. B. Gibson, "Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells," *Cell Death and Differentiation*, vol. 15, no. 1, pp. 171–182, 2008.
- [71] S. J. Chanock, J. El Benna, R. M. Smith, and B. M. Babior, "The respiratory burst oxidase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 40, pp. 24519–24522, 1994.
- [72] J. F. Turrens, "Mitochondrial formation of reactive oxygen species," *Journal of Physiology*, vol. 552, part 2, pp. 335–344, 2003.
- [73] C. W. Olanow, "A radical hypothesis for neurodegeneration," *Trends in Neurosciences*, vol. 16, no. 11, pp. 439–444, 1993.

- [74] L. Wang, N. Azad, L. Kongkaneramt et al., "The Fas death signaling pathway connecting reactive oxygen species generation and FLICE inhibitory protein down-regulation," *Journal of Immunology*, vol. 180, no. 5, pp. 3072–3080, 2008.
- [75] Y. Qian, T. Guan, M. Huang et al., "Neuroprotection by the soy isoflavone, genistein, via inhibition of mitochondria-dependent apoptosis pathways and reactive oxygen induced-NF- κ B activation in a cerebral ischemia mouse model," *Neurochemistry International*, vol. 60, no. 8, pp. 759–767, 2012.
- [76] K. T. Turpaev and D. Y. Litvinov, "Redox-dependent regulation of the expression of nitric oxide-inducible genes," *Molecular Biology*, vol. 38, no. 1, pp. 47–57, 2004.
- [77] J. B. Schulz, J. Lindenau, J. Seyfried, and J. Dichgans, "Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration," *European Journal of Biochemistry*, vol. 267, no. 16, pp. 4904–4911, 2000.
- [78] J. Lindenau, H. Noack, H. Possel, K. Asayama, and G. Wolf, "Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS," *Glia*, vol. 29, no. 1, pp. 25–34, 2000.
- [79] L. Marcocci, J. J. Maguire, M. T. Droy-Lefaix, and L. Packer, "The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGB 761," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 201, no. 2, pp. 748–755, 1994.
- [80] J. Pincemail, M. Dupuis, C. Nasr et al., "Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of *Ginkgo biloba* extract," *Experientia*, vol. 45, no. 8, pp. 708–712, 1989.
- [81] I. Maitra, L. Marcocci, M. T. Droy-Lefaix, and L. Packer, "Peroxyl radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* extract EGB 761," *Biochemical Pharmacology*, vol. 49, no. 11, pp. 1649–1655, 1995.
- [82] C. Ferradini, M. T. Droy Lefaix, and Y. Christen, *Cap 1, Advances in Ginkgo Biloba Extract Research*, Elsevier, Paris, France, 1993.
- [83] D. J. Kane, T. A. Sarafian, R. Anton et al., "Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species," *Science*, vol. 262, no. 5137, pp. 1274–1277, 1993.
- [84] L. Marcocci, L. Packer, M.-T. Droy-Lefaix, A. Sekaki, and M. Gardes-Albert, "Antioxidant action of *Ginkgo biloba* extract EGB 761," *Methods in Enzymology*, vol. 234, pp. 462–475, 1994.
- [85] C. Shi, L. Zhao, B. Zhu et al., "Protective effects of *Ginkgo biloba* extract (EGB761) and its constituents quercetin and ginkgolide B against β -amyloid peptide-induced toxicity in SH-SY5Y cells," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 181, no. 1, pp. 115–123, 2009.
- [86] S. Pietri, E. Maurelli, K. Drieu, and M. Culcasi, "Cardioprotective and anti-oxidant effects of the terpenoid constituents of *Ginkgo biloba* extract (EGB 761)," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 29, no. 2, pp. 733–742, 1997.
- [87] W. Song, H.-J. Guan, X.-Z. Zhu, Z.-L. Chen, M.-L. Yin, and X.-F. Cheng, "Protective effect of bilobalide against nitric oxide-induced neurotoxicity in PC12 cells," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 21, no. 5, pp. 415–420, 2000.
- [88] K. Gohil, R. K. Moy, S. Farzin, J. J. Maguire, and L. Packer, "MRNA expression profile of a human cancer cell line in response to *Ginkgo biloba* extract: induction of antioxidant response and the golgi system," *Free Radical Research*, vol. 33, no. 6, pp. 831–849, 2000.
- [89] F. V. DeFeudis, "Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGB 761) on gene expression: possible relevance to neurological disorders and age-associated cognitive impairment," *Drug Development Research*, vol. 57, no. 4, pp. 214–235, 2002.
- [90] K. Chandrasekaran, Z. Mehrabian, B. Spinnewyn, K. Drieu, and G. Fiskum, "Neuroprotective effects of bilobalide, a component of the *Ginkgo biloba* extract (EGB 761), in gerbil global brain ischemia," *Brain Research*, vol. 922, no. 2, pp. 282–292, 2001.
- [91] E. A. Tendi, F. Bosetti, S. F. Dasgupta, A. M. Giuffrida Stella, K. Drieu, and S. I. Rapoport, "*Ginkgo biloba* extracts EGB 761 and bilobalide increase NADH dehydrogenase mRNA level and mitochondrial respiratory control ratio in PC12 cells," *Neurochemical Research*, vol. 27, no. 4, pp. 319–323, 2002.
- [92] H. S. Sharma, K. Drieu, P. Alm, and J. Westman, "Role of nitric oxide in blood-brain barrier permeability, brain edema and cell damage following hyperthermic brain injury. An experimental study using EGB-761 and Ginkgolide B pretreatment in the rat," *Acta Neurochirurgica Supplement*, vol. 76, pp. 81–86, 2000.
- [93] G. C. Brown and V. Borutaite, "Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1658, no. 1–2, pp. 44–49, 2004.
- [94] H. Matsuzaki, M. Tamatani, N. Mitsuda et al., "Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons," *Journal of Neurochemistry*, vol. 73, no. 5, pp. 2037–2046, 1999.
- [95] C. M. H. Watanabe, S. Wolfram, P. Ader et al., "The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine *Ginkgo biloba*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 12, pp. 6577–6580, 2001.
- [96] P. Talalay, "Chemoprotection against cancer by induction of Phase 2 enzymes," *BioFactors*, vol. 12, no. 1–4, pp. 5–11, 2000.
- [97] Y. Zhang and G. B. Gordon, "A strategy for cancer prevention: stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 3, no. 7, pp. 885–893, 2004.
- [98] A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw, R. N. Cole et al., "Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 18, pp. 11908–11913, 2002.
- [99] L. M. Zipper and R. T. P. Mulcahy, "The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 39, pp. 36544–36552, 2002.
- [100] T. Satoh, S.-I. Okamoto, J. Cui et al., "Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic phase II inducers," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 3, pp. 768–773, 2006.
- [101] K. Li, P. Yao, S.-L. Zhou, and F.-F. Song, "Protective effects of extract of *Ginkgo biloba* against ethanol-induced oxidative injury in rat testes," *Journal of Hygiene Research*, vol. 34, no. 5, pp. 559–562, 2005.
- [102] O. Coskun, F. Armutcu, M. Kanter, and G. M. Kuzey, "Protection of endotoxin-induced oxidative renal tissue damage of rats by vitamin E or/and EGB 761 treatment," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 25, no. 1, pp. 8–12, 2005.
- [103] X.-P. Liu, C. E. P. Goldring, H.-Y. Wang et al., "Extract of *Ginkgo biloba* induces glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC)," *Phytotherapy Research*, vol. 22, no. 3, pp. 367–371, 2008.
- [104] S. Saleem, H. Zhuang, S. Biswal, Y. Christen, and S. Doré, "*Ginkgo biloba* extract neuroprotective action is dependent on heme oxygenase 1 in ischemic reperfusion brain injury," *Stroke*, vol. 39, no. 12, pp. 3389–3396, 2008.
- [105] Z. A. Shah, S. E. Nada, and S. Doré, "Heme oxygenase 1, beneficial role in permanent ischemic stroke and in *Ginkgo biloba* (EGB 761) neuroprotection," *Neuroscience*, vol. 180, pp. 248–255, 2011.

- [106] R. Stocker, A. F. McDonagh, A. N. Glazer, and B. N. Ames, "Anti-oxidant activities of bile pigments: biliverdin and bilirubin," *Methods in Enzymology*, vol. 186, pp. 301–309, 1990.
- [107] A. I. Goodman, P. N. Chander, R. Rezzani et al., "Heme oxygenase-2 deficiency contributes to diabetes-mediated increase in superoxide anion and renal dysfunction," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 17, no. 4, pp. 1073–1081, 2006.
- [108] C. K. Andreadi, L. M. Howells, P. A. Atherfold, and M. M. Manson, "Involvement of Nrf2, p38, B-Raf, and nuclear factor- κ B, but not phosphatidylinositol 3-kinase, in induction of hemoxygenase-1 by dietary polyphenols," *Molecular Pharmacology*, vol. 69, no. 3, pp. 1033–1040, 2006.
- [109] S. Das, C. G. Fraga, and D. K. Das, "Cardioprotective effect of resveratrol via HO-1 expression involves p38 map kinase and PI-3-kinase signaling, but does not involve NF κ B," *Free Radical Research*, vol. 40, no. 10, pp. 1066–1075, 2006.
- [110] P. Yao, A. Nussler, L. Liu et al., "Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways," *Journal of Hepatology*, vol. 47, no. 2, pp. 253–261, 2007.
- [111] X.-P. Liu, C. E. P. Goldring, I. M. Copple et al., "Extract of *Ginkgo biloba* induces phase 2 genes through Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway," *Life Sciences*, vol. 80, no. 17, pp. 1586–1591, 2007.
- [112] N. Wakabayashi, A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw et al., "Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 7, pp. 2040–2045, 2004.
- [113] B. Mayr and M. Montminy, "Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor creb," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 2, no. 8, pp. 599–609, 2001.
- [114] X. Tao, S. Finkbeiner, D. B. Arnold, A. J. Shaywitz, and M. E. Greenberg, "Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism," *Neuron*, vol. 20, no. 4, pp. 709–726, 1998.
- [115] K. Du and M. Montminy, "CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 49, pp. 32377–32379, 1998.
- [116] Z. Zhang, D. Peng, H. Zhu, and X. Wang, "Experimental evidence of *Ginkgo biloba* extract EGB as a neuroprotective agent in ischemia stroke rats," *Brain Research Bulletin*, vol. 87, no. 2-3, pp. 193–198, 2012.
- [117] F. Tchantchou, Y. Xu, Y. Wu, Y. Christen, and Y. Luo, "EGb 761 enhances adult hippocampal neurogenesis and phosphorylation of CREB in transgenic mouse model of Alzheimer's disease," *FASEB Journal*, vol. 21, no. 10, pp. 2400–2408, 2007.
- [118] Y. Xu, C. Cui, C. Pang, Y. Christen, and Y. Luo, "Restoration of impaired phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) by EGb 761 and its constituents in A β -expressing neuroblastoma cells," *European Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 10, pp. 2931–2939, 2007.
- [119] Y. Hou, M. A. Aboukhatwa, D.-L. Lei, K. Manaye, I. Khan, and Y. Luo, "Anti-depressant natural flavonols modulate BDNF and beta amyloid in neurons and hippocampus of double TgAD mice," *Neuropharmacology*, vol. 58, no. 6, pp. 911–920, 2010.
- [120] F. Tchantchou, P. N. Lacor, Z. Cao et al., "Stimulation of neurogenesis and synaptogenesis by bilobalide and quercetin via common final pathway in hippocampal neurons," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 18, no. 4, pp. 787–798, 2009.
- [121] G. L. Wang and G. L. Semenza, "Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 3, pp. 1230–1237, 1995.
- [122] G. L. Wang, B.-H. Jiang, E. A. Rue, and G. L. Semenza, "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 12, pp. 5510–5514, 1995.
- [123] B.-H. Jiang, G. L. Semenza, C. Bauer, and H. H. Marti, "Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension," *American Journal of Physiology*, vol. 271, part 1, no. 4, pp. C1172–C1180, 1996.
- [124] S. Lahiri, A. Roy, S. M. Baby, T. Hoshi, G. L. Semenza, and N. R. Prabhakar, "Oxygen sensing in the body," *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 91, no. 3, pp. 249–286, 2006.
- [125] U. R. Jewell, I. Kvietikova, A. Scheid, C. Bauer, R. H. Wenger, and M. Gassmann, "Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous," *The FASEB Journal*, vol. 15, no. 7, pp. 1312–1314, 2001.
- [126] G. L. Semenza, "Targeting HIF-1 for cancer therapy," *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no. 10, pp. 721–732, 2003.
- [127] K. Zaman, H. Ryu, D. Hall et al., "Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin," *Journal of Neuroscience*, vol. 19, no. 22, pp. 9821–9830, 1999.
- [128] N. Akakura, M. Kobayashi, I. Horiuchi et al., "Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1 α renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation," *Cancer Research*, vol. 61, no. 17, pp. 6548–6554, 2001.
- [129] L. Flamant, A. Notte, N. Ninane, M. Raes, and C. Michiels, "Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia," *Molecular Cancer*, vol. 9, article no. 191, 2010.
- [130] P. F. Smith, K. MacLennan, and C. L. Darlington, "The neuroprotective properties of the *Ginkgo biloba* leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 50, no. 3, pp. 131–139, 1996.
- [131] L. Zhu, J. Wu, H. Liao, J. Gao, X.-N. Zhao, and Z.-X. Zhang, "Antagonistic effects of extract from leaves of *Ginkgo biloba* on glutamate neurotoxicity," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 18, no. 4, pp. 344–347, 1997.
- [132] L. Zhu, J. Gao, Y. Wang, X. N. Zhao, and Z. X. Zhang, "Neuron degeneration induced by verapamil and attenuated by EGb761," *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, vol. 8, no. 4, pp. 301–314, 1997.
- [133] S. Bastianetto and R. Quirion, "Natural extracts as possible protective agents of brain aging," *Neurobiology of Aging*, vol. 23, no. 5, pp. 891–897, 2002.
- [134] B. Ahlemeyer and J. Kriegstein, "Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* extract," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 60, no. 9, pp. 1779–1792, 2003.
- [135] B. Ahlemeyer and J. Kriegstein, "Pharmacological studies supporting the therapeutic use of *Ginkgo biloba* extract for Alzheimer's disease," *Pharmacopsychiatry*, vol. 36, supplement 1, pp. S8–S14, 2003.
- [136] L. Zhu, X.-M. Wu, L. Yang, F. Du, and Z. M. Qian, "Up-regulation of HIF-1 α expression induced by ginkgolides in hypoxic neurons," *Brain Research*, vol. 1166, no. 1, pp. 1–8, 2007.

- [137] Z. Li, K. Ya, W. Xiao-Mei, Y. Lei, L. Yang, and Z. M. Qian, "Ginkgolides protect PC12 cells against hypoxia-induced injury by p42/p44 MAPK pathway-dependent upregulation of HIF-1 α expression and HIF-1 DNA-binding activity," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 103, no. 2, pp. 564–575, 2008.
- [138] G. Gloire and J. Piette, "Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF- κ B activation," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 11, no. 9, pp. 2209–2222, 2009.
- [139] H. L. Pahl, "Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors," *Oncogene*, vol. 18, no. 49, pp. 6853–6866, 1999.
- [140] K. G. Waddick and F. M. Uckun, "Innovative treatment programs against cancer: II. Nuclear factor- κ B (NF- κ B) as a molecular target," *Biochemical Pharmacology*, vol. 57, no. 1, pp. 9–17, 1999.
- [141] M. A. Collart, P. Baeuerle, and P. Vassalli, "Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four κ B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF- κ B," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 10, no. 4, pp. 1498–1506, 1990.
- [142] H. Wu and G. Lozano, "NF- κ B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 31, pp. 20067–20074, 1994.
- [143] S. Kasibhatla, T. Brunner, L. Genestier, F. Echeverri, A. Mahboubi, and D. R. Green, "DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- κ B and AP-1," *Molecular Cell*, vol. 1, no. 4, pp. 543–551, 1998.
- [144] T. M. Baetu, H. Kwon, S. Sharma, N. Grandvaux, and J. Hiscott, "Disruption of NF- κ B signaling reveals a novel role for NF- κ B in the regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand expression," *Journal of Immunology*, vol. 167, no. 6, pp. 3164–3173, 2001.
- [145] S.-J. Kim, S.-G. Hwang, D. Y. Shin, S.-S. Kang, and J.-S. Chun, "p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating p53 via NF- κ B-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 36, pp. 33501–33508, 2002.
- [146] J. Kucharczak, M. J. Simmons, Y. Fan, and C. G elinas, "To be, or not to be: NF- κ B is the answer—role of Rel/NF- κ B in the regulation of apoptosis," *Oncogene*, vol. 22, no. 56, pp. 8961–8982, 2003.
- [147] Y. Tao, D. Yan, Q. Yang, R. Zeng, and Y. Wang, "Low K⁺ promotes NF- κ B/DNA binding in neuronal apoptosis induced by K⁺ loss," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 26, no. 3, pp. 1038–1050, 2006.
- [148] L.-F. Chen, Y. Mu, and W. C. Greene, "Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF- κ B," *EMBO Journal*, vol. 21, no. 23, pp. 6539–6548, 2002.
- [149] F. Yeung, J. E. Hoberg, C. S. Ramsey et al., "Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase," *EMBO Journal*, vol. 23, no. 12, pp. 2369–2380, 2004.
- [150] Y.-M. Park, J.-H. Won, K.-J. Yun et al., "Preventive effect of *Ginkgo biloba* extract (GBB) on the lipopolysaccharide-induced expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via suppression of nuclear factor- κ B in RAW 264.7 cells," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 29, no. 5, pp. 985–990, 2006.
- [151] F. Longpr e, P. Garneau, Y. Christen, and C. Ramassamy, "Protection by EGB 761 against β -amyloid-induced neurotoxicity: involvement of NF- κ B, SIRT1, and MAPKs pathways and inhibition of amyloid fibril formation," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 41, no. 12, pp. 1781–1794, 2006.
- [152] M. P. Nair, S. Mahajan, J. L. Reynolds et al., "The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- κ B system," *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 13, no. 3, pp. 319–328, 2006.
- [153] L.-Y. Li, X.-L. Zhao, X.-F. Fei, Z.-L. Gu, Z.-H. Qin, and Z.-Q. Liang, "Bilobalide inhibits 6-OHDA-induced activation of NF- κ B and loss of dopaminergic neurons in rat substantia nigra," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 29, no. 5, pp. 539–547, 2008.
- [154] Y.-Y. Hu, M. Huang, X.-Q. Dong, Q.-P. Xu, W.-H. Yu, and Z.-Y. Zhang, "Ginkgolide B reduces neuronal cell apoptosis in the hemorrhagic rat brain: possible involvement of Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 137, no. 3, pp. 1462–1468, 2011.
- [155] K. V. Anderson, "Toll signaling pathways in the innate immune response," *Current Opinion in Immunology*, vol. 12, no. 1, pp. 13–19, 2000.
- [156] T. Ueno, Y. Sawa, S. Kitagawa-Sakakida et al., "Nuclear factor- κ B decoy attenuates neuronal damage after global brain ischemia: a future strategy for brain protection during circulatory arrest," *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 122, no. 4, pp. 720–727, 2001.
- [157] X. Wang, Z. H. Qin, H. Shi et al., "Protective effect of Ginkgolides (A+B) is associated with inhibition of NIK/IKK/IkappaB/NF-kappaB signaling pathway in a rat model of permanent focal cerebral ischemia," *Research*, vol. 1234, pp. 8–15, 2008.
- [158] R. Wisdom, "Ap-1: one switch for many signals," *Experimental Cell Research*, vol. 253, no. 1, pp. 180–185, 1999.
- [159] E. Shaulian and M. Karin, "AP-1 as a regulator of cell life and death," *Nature Cell Biology*, vol. 4, no. 5, pp. E131–E136, 2002.
- [160] M. Karin and E. Shaulian, "AP-1: linking hydrogen peroxide and oxidative stress to the control of cell proliferation and death," *IUBMB Life*, vol. 52, no. 1-2, pp. 17–24, 2001.
- [161] H. Kamata, S.-I. Honda, S. Maeda, L. Chang, H. Hirata, and M. Karin, "Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases," *Cell*, vol. 120, no. 5, pp. 649–661, 2005.
- [162] T. Wang, P. Arifoglu, Z. Ronai, and K. D. Tew, "Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 24, pp. 20999–21003, 2001.
- [163] V. Adler, Z. Yin, S. Y. Fuchs et al., "Regulation of JNK signaling by GSTp," *EMBO Journal*, vol. 18, no. 5, pp. 1321–1334, 1999.
- [164] N. Matsumoto, R. Imamura, and T. Suda, "Caspase-8- and JNK-dependent AP-1 activation is required for Fas ligand-induced IL-8 production," *FEBS Journal*, vol. 274, no. 9, pp. 2376–2384, 2007.
- [165] C. Trejo, D. Jimenez, S. Rodriguez et al., "Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and jnk activation," *BMC Cancer*, vol. 12, article 156, 2012.
- [166] C. Shi, L. Zhao, B. Zhu et al., "Dosage effects of EGB761 on hydrogen peroxide-induced cell death in SH-SY5Y cells," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 180, no. 3, pp. 389–397, 2009.
- [167] S.-M. Cheng, S.-P. Yang, L.-J. Ho et al., "Down-regulation of c-jun N-terminal kinase-activator protein-1 signaling pathway

- by *Ginkgo biloba* extract in human peripheral blood T cells," *Biochemical Pharmacology*, vol. 66, no. 4, pp. 679–689, 2003.
- [168] T. L. Wadsworth, T. L. McDonald, and D. R. Koop, "Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced signaling pathways involved in the release of tumor necrosis factor- α ," *Biochemical Pharmacology*, vol. 62, no. 7, pp. 963–974, 2001.
- [169] T. L. Wadsworth and D. R. Koop, "Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 137, no. 1, pp. 43–58, 2001.
- [170] B. Vogelstein, D. Lane, and A. J. Levine, "Surfing the p53 network," *Nature*, vol. 408, no. 6810, pp. 307–310, 2000.
- [171] D. A. Liebermann, B. Hoffman, and D. Vesely, "p53 induced growth arrest versus apoptosis and its modulation by survival cytokines," *Cell Cycle*, vol. 6, no. 2, pp. 166–170, 2007.
- [172] T. Miyashita and J. C. Reed, "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene," *Cell*, vol. 80, no. 2, pp. 293–299, 1995.
- [173] R. S. Morrison, Y. Kinoshita, M. D. Johnson, W. Guo, and G. A. Garden, "p53-dependent cell death signaling in neurons," *Neurochemical Research*, vol. 28, no. 1, pp. 15–27, 2003.
- [174] S. Matsuyama and J. C. Reed, "Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation," *Cell Death and Differentiation*, vol. 7, no. 12, pp. 1155–1165, 2000.
- [175] P. Bonini, S. Cicconi, A. Cardinale et al., "Oxidative stress induces p53-mediated apoptosis in Glia: p53 transcription-independent way to die," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 75, no. 1, pp. 83–95, 2004.
- [176] J. Wang, Y. Cheng, J. Yin, Q. Lu, X. Xu, and X. Yin, "Protective effects of *Ginkgo biloba* extract on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells," *Neural Regeneration Research*, vol. 6, no. 33, pp. 2565–2572, 2011.
- [177] L.-J. Zhou and X.-Z. Zhu, "Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 293, no. 3, pp. 982–988, 2000.
- [178] M. Chen and J. Wang, "Initiator caspases in apoptosis signaling pathways," *Apoptosis*, vol. 7, no. 4, pp. 313–319, 2002.
- [179] K. Drieu, R. Vranckx, C. Benassayad et al., "Effect of the extract of *Ginkgo biloba* (EGb 761) on the circulating and cellular profiles of polyunsaturated fatty acids: correlation with the antioxidant properties of the extract," *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 63, no. 5, pp. 293–300, 2000.
- [180] M. Garcia-Alloza, L. A. Borrelli, B. T. Hyman, and B. J. Bacskaï, "Antioxidants have a rapid and long-lasting effect on neuritic abnormalities in APP:PS1 mice," *Neurobiology of Aging*, vol. 31, no. 12, pp. 2058–2068, 2010.
- [181] P. Rojas, E. Ruiz-Sánchez, C. Rojas, and S. O. Ögren, "*Ginkgo biloba* extract (EGb 761) modulates the expression of dopamine-related genes in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice," *Neuroscience*, vol. 223, pp. 246–257, 2012.
- [182] R. Taliyan and P. L. Sharma, "Protective effect and potential mechanism of *Ginkgo biloba* extract EGb 761 on STZ-induced neuropathic pain in rats," *Phytotherapy Research*, vol. 26, no. 12, pp. 1823–1829, 2012.
- [183] C. Hernández-López, "Nuevo marco regulatorio de los ensayos clínicos de primera administración en humanos," *Investigación Clínica y Bioética Digital*, no. 50, pp. 1–10, 2007.
- [184] Y. Zhang and D. Liu, "Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function," *European Journal of Pharmacology*, vol. 670, no. 1, pp. 325–332, 2011.
- [185] A. K. Samhan-Arias, F. J. Martín-Romero, and C. Gutiérrez-Merino, "Kaempferol blocks oxidative stress in cerebellar granule cells and reveals a key role for reactive oxygen species production at the plasma membrane in the commitment to apoptosis," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 37, no. 1, pp. 48–61, 2004.
- [186] K. Murota, S. Shimizu, S. Miyamoto et al., "Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal Caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids," *Journal of Nutrition*, vol. 132, no. 7, pp. 1956–1961, 2002.
- [187] S. S. Gao, B.-M. Choi, X. Y. Chen et al., "Kaempferol suppresses cisplatin-induced apoptosis via inductions of heme oxygenase-1 and glutamate-cysteine ligase catalytic subunit in HEI-OCI cells," *Pharmaceutical Research*, vol. 27, no. 2, pp. 235–245, 2010.
- [188] J. Xiao, G.-B. Sun, B. Sun et al., "Kaempferol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vivo and in vitro," *Toxicology*, vol. 292, no. 1, pp. 53–62, 2012.
- [189] Y. K. Byung, S. Kim, K.-H. Lee et al., "Transcriptional profiling in human HaCaT keratinocytes in response to kaempferol and identification of potential transcription factors for regulating differential gene expression," *Experimental and Molecular Medicine*, vol. 40, no. 2, pp. 208–219, 2008.
- [190] B. Sun, G.-B. Sun, J. Xiao et al., "Isorhamnetin inhibits H₂O₂-induced activation of the intrinsic apoptotic pathway in H9c2 cardiomyocytes through scavenging reactive oxygen species and ERK inactivation," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 113, no. 2, pp. 473–485, 2012.



Docosahexaenoic acid protection in a rotenone induced Parkinson's model: Prevention of tubulin and synaptophysin loss, but no association with mitochondrial function



Norma Serrano-García^{a,b,*}, Francisca Fernández-Valverde^c, Erika Rubi Luis-García^d, Leticia Granados-Rojas^e, Tarsila Elizabeth Juárez-Zepeda^e, Sandra Adela Orozco-Suárez^f, José Pedraza-Chaverri^g, Marisol Orozco-Ibarra^a, Anabel Jiménez-Anguiano^h

^a Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, Av. Insurgentes Sur No. 3877 Col. La Fama, Deleg. Tlalpan, CP 14269, Ciudad de México, Mexico

^b Doctorado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Deleg. Iztapalapa, CP 09340, Ciudad de México, Mexico

^c Laboratorio de Patología Experimental, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, Av. Insurgentes Sur No. 3877 Col. La Fama, Deleg. Tlalpan, CP 14269, Ciudad de México, Mexico

^d Laboratorio de Biología Celular, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlalpan 4502, Col. Belisario Domínguez Sección XVI Deleg. Tlalpan, CP 14080, Ciudad de México, Mexico

^e Laboratorio de Neurociencias, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, Deleg. Coyoacán, CP 04530, Ciudad de México, Mexico

^f Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Centro Médico Nacional "Siglo XXI" Hospital de Especialidades Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, Deleg. Cuauhtémoc, CP 06720, Ciudad de México, Mexico

^g Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad No. 3000, Deleg. Coyoacán, CP 04510, Ciudad de México, Mexico

^h Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Deleg. Iztapalapa, CP 09340, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Dopaminergic neurons
Mitochondrial complex I activity
Omega-3 fatty acids
Parkinson's disease
Polyunsaturated fatty acids
Tyrosine hydroxylase

ABSTRACT

Rotenone, a classic mitochondrial complex I inhibitor, leads to dopaminergic neuronal death resulting in a Parkinson's-like-disease. Docosahexaenoic acid (DHA) has shown neuroprotective effects in other experimental models of Parkinson's disease, but its effect on the rotenone-induced parkinsonism is still unknown. We tested whether DHA *in vivo* exerts a neuroprotective effect on rotenone-induced parkinsonism and explored the mechanisms involved, including mitochondrial function and ultrastructure as well as the expression of tubulin and synaptophysin. We pretreated eighty male Wistar rats with DHA (35 mg/kg/day) for seven days and then administered rotenone for eight days. We then measured rearing behavior, number of dopaminergic neurons, tyrosine hydroxylase content, tubulin and synaptophysin expression, mitochondrial complex I, respiratory control ratio, mitochondrial transmembrane potential, ATP production activity and mitochondrial ultrastructure. We found that *in vivo* DHA supply exerted a neuroprotective effect, evidenced by decreased dopaminergic neuron cell death. Although we detected rotenone induced mitochondrial ultrastructure alterations, these were not associated with mitochondrial dysfunction. Rotenone had no effect on mitochondrial complex I, respiratory control ratio, mitochondrial transmembrane potential or ATP production activity. DHA also prevented a rotenone-induced decrease in tubulin and synaptophysin expression. Our results support the neuroprotective effect of DHA on rotenone-induced parkinsonism, and a possible effect on early stage Parkinson's

Abbreviations: PD, Parkinson's disease; DHA, Docosahexaenoic acid; SNpc, substantia nigra pars compacta; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; FCCP, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone; DCPIP, 6-dichlorophenolindophenol; NADP⁺, oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; VDAC-1, voltage dependent anion carrier; TH, tyrosine hydroxylase

* Corresponding author. Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, Av. Insurgentes Sur No. 3877 Col. La Fama, Deleg. Tlalpan, CP 14269, Ciudad de México, Mexico.

E-mail addresses: nasmy_sr@yahoo.com.mx, orozco_ibarra@ciencias.unam.mx (N. Serrano-García), fferval@yahoo.com.mx (F. Fernández-Valverde), erikarubi_84@yahoo.com.mx (E.R. Luis-García), lgranados_2000@yahoo.com.mx (L. Granados-Rojas), tarsilaejz@gmail.com (T.E. Juárez-Zepeda), sorozco5@hotmail.com (S.A. Orozco-Suárez), pedraza@unam.mx (J. Pedraza-Chaverri), marisol.orozco.ibarra@gmail.com (M. Orozco-Ibarra), aja@xanum.uam.mx (A. Jiménez-Anguiano).

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.10.015>

Received 8 August 2018; Received in revised form 15 October 2018; Accepted 17 October 2018

Available online 19 October 2018

0197-0186/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

disease. This protective effect is not associated with mitochondrial function improvement, but rather with preventing loss of tubulin and synaptophysin, proteins relevant to synaptic transmission.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative movement disorder primarily characterized by progressive loss of dopaminergic neurons whose cell bodies are located in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and whose axons project into the striatum. This neuron loss leads to dopamine production deficiencies in the striatum and substantia nigra, which in turn produce the clinical manifestations of the disease (Utter and Basso, 2008). These manifestations (tremors, bradykinesia, rigidity, and postural instability) are not evident until approximately 50% of the dopaminergic neurons in SNpc and 80% of striatal dopamine are lost (Samii et al., 2004). Thus, altering the natural progression of the disease may be more successful at the earlier stages of the disease (Stocchi et al., 2015). However, despite the use of several experimental molecular mechanism models, PD pathogenesis is still not fully understood.

Experimental models allow the study of PD cellular events by triggering the loss of dopaminergic neurons. The models produced by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) are among the most explored PD experimental models. Because they act shortly after being administered, they mostly allow the study of late-stage PD progression (Blesa et al., 2012). Rotenone, a natural cytotoxic compound extracted from plants in the Leguminosae family and one of the most toxic rotenoids, is another neurotoxin that has been widely used to mimic PD cellular characteristics (Cannon et al., 2009; Greenamyre et al., 2010; Lin et al., 2012; Liu et al., 2015; Zhang et al., 2017a). Being highly lipophilic, rotenone easily crosses the blood brain barrier as well as all organelle cell membranes (Jackson-Lewis et al., 2012; Blesa et al., 2012). In addition to inducing dopaminergic neuron death, rotenone also causes movement reduction, flexed posture and muscle stiffness (Fleming et al., 2004; Cannon et al., 2009; Chao et al., 2018). Additionally, because rotenone-induced dopaminergic cell death occurs more slowly than in other experimental models, and only after repeated administration, using rotenone allows for the study of changes that occur in the early stages of PD (Greenamyre et al., 2010; Johnson et al., 2015; Bai et al., 2016; Zhang et al., 2017b).

Mitochondrial function impairment, together with other key molecular events, such as oxidative stress and apoptosis, may contribute to the onset of neuronal death and thus, to the symptoms of neurodegenerative diseases (Kumar et al., 2005; Kim and Takahashi, 2006; Dexter and Jenner, 2013; Takalo et al., 2013). Indeed, mitochondrial complex I activity decreases between 20 and 30% in the SNpc and frontal cortex in patients with idiopathic PD (Schapira, 2007; Navarro et al., 2009; Chaturvedi and Beal, 2013). However, it remains controversial whether mitochondrial dysfunction is a cause or consequence of neurodegeneration. In addition to functioning as a mitochondrial complex I inhibitor, rotenone can induce microtubule destabilization *in vitro*, which increases free tubulin and reduces polymerized tubulin in cell lines (Hongo et al., 2012; Maldonado et al., 2010; Choi et al., 2011). Tubulin functions as the major building block in microtubules (cytoskeletal filaments), which have an essential role in several intracellular processes such as neuronal growth, morphology, trafficking and polarity. Cytoskeleton dysfunction has only recently begun to be studied as an important mechanism involved in neurodegeneration.

Postmortem PD studies show decreased long-chain polyunsaturated fatty acids, particularly docosahexaenoic (DHA) and arachidonic acids (Fabelo et al., 2011), and DHA administration in MPTP and 6-OHDA induced rodent models appears to elicit neuroprotection. Evidence of this neuroprotection includes recovery of the nigrostriatal synapses

(Cansev et al., 2008), increased expression of glial cell derived neurotrophic factor (Tanriver et al., 2010), reduced number of apoptotic dopaminergic cells (Ozsoy et al., 2011), and increased dopaminergic neurons in the SNpc (Ozkan et al., 2016). DHA also reduced levodopa-induced dyskinesias in MPTP-lesioned primates (Samadi et al., 2006). This neuroprotective effect is associated with DHA's ability to enhance membrane fluidity, antioxidant effect and improve synaptic transmission (Hashimoto et al., 2017). Following DHA treatment expression levels of synaptic proteins like synaptophysin and presynaptic density protein-95 are increased (Hashimoto et al., 2017). Synaptophysin is a transmembrane glycoprotein found in small presynaptic vesicles of the nerve cells and is frequently considered a synaptic density marker (Takamori et al., 2006).

In this paper we address a knowledge gap regarding the potential neuroprotective effect exerted by DHA administration prior to rotenone-induced parkinsonism, as well as explore the role of mitochondria and the expression of tubulin and synaptophysin in such effect. Specifically, we expect DHA administration to decrease damage in dopaminergic neurons, as well as to decrease changes in tubulin and synaptophysin and thus preserve mitochondrial function.

2. Experimental procedures

2.1. Reagents used

We obtained bovine serum albumin (BSA), carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), 6-dichlorophenolindophenol (DCPIP), antimycin A, safranin O, hexokinase, ethylene glycol tetraacetic acid, adenosine diphosphate (ADP), rotenone, oligomycin A, succinic acid, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, sodium dodecyl sulphate, flavin adenine dinucleotide (FAD) nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), potassium cyanide, and oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺) and monoclonal α -tubulin antibodies (clone DM1A) from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Primary antibodies against the NDUFS3 subunit of mitochondrial complex I and voltage dependent anion carrier (VDAC-1) were obtained from Abcam (Cambridge, United Kingdom). Primary antibodies against tyrosine hydroxylase (TH) came from Merck-Millipore (Darmstadt, Germany). Primary antibodies against synaptophysin and secondary antibodies were ordered from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA). The Novex ECL detection kit was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). All other reagents were of analytical grade and commercially available.

2.2. Experimental animals

We obtained one hundred and twenty male Wistar rats weighing 240–260 g from the vivarium located at the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez. Rats were kept under standard conditions (12/12 h light/dark, 21 \pm 2 °C cycle and 40% relative humidity) with *ad libitum* access to food and water. All experiments were performed according to the Official Mexican Standard on Technical Specifications for the Production, Care and Use of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999). Local Committees regarding Biosafety and Care and Use of Laboratory Animals approved the protocol (#07/12).

2.3. Experimental groups

We randomly grouped rats into four categories: 1) control, 2) rotenone, 3) DHA + rotenone, and 4) DHA. Following Fleming et al. (2004) and Lin et al. (2012), we injected rotenone subcutaneously (3 mg/kg/day) for eight or fourteen days, given that decreased movement and TH protein levels as well as increased apoptosis have been reported at this dose within these timeframes. DHA (35 mg/kg/24 h) was administered intragastrically for seven days, prior to the rotenone treatment. DHA dose was chosen considering that 0.5 ml/kg cod liver oil is neuroprotective (Orozco-Ibarra et al., 2018) and the minimum content of DHA in cod liver oil is about 7% (European Pharmacopoeia, 2007; Denny Joseph and Muralidhara, 2015).

2.4. Behavioral assessment

We evaluated the number of times each rat reared itself during a 5-min period spent inside an acrylic cylinder measuring 30 cm in length and 19.5 cm in circumference. Rearing behavior serves as a proxy for dopamine in the striatum, given that this neurotransmitter is involved in motor activity (Fleming et al., 2004; Cannon et al., 2009). The cylinder test is considered to be objective, easy to use and score, sensitive to chronic dopamine deficits that other tests fail to detect and has high inter-rater reliability (Brooks and Dunnett, 2009). All experiments were done during the light phase of the circadian cycle (between 7:00 and 8:00 a.m.), recorded by a single observer and results were expressed as number of rears in 5 min.

2.5. Histochemical analysis and immunohistochemistry

Following treatment, we anesthetized ten rats per group with sodium pentobarbital (80 mg/kg, intraperitoneal) and then they were transcardially perfused with saline solution followed by paraformaldehyde (4%). Brain tissue fixed in 4% paraformaldehyde was then embedded in paraffin. We serially sectioned five brains per group to obtain 5 µm striatal and SNpc coronal sections, then analyzed morphology using hematoxylin-eosin staining and immunostaining of alpha-tubulin and synaptophysin in the striatum. For quantification, we examined five areas of the brain region and analyzed four sections of tissue from each animal at 40X magnification (each image of 1392 X 1040 pixels per frame). Results were expressed as the number of breakdown nucleus by area. We used the remaining five brains per group to determine TH immunostaining in striatum and the number of dopaminergic neurons in SNpc.

2.6. Number of dopaminergic neurons in SNpc

We made serial coronal sections (40 µm) of the whole SNpc, and then selected six to eight sections for immunostaining and stereological counting by systematically choosing one out of every four sections. Free-floating sections were incubated with primary anti-TH antibody (1:500) overnight at 4 °C. We then counted the number of TH-positive cells in SNpc using an optical fractionator (West et al., 1991). Given a counting frame measuring 87 × 130 µm, we defined guard zones at 1 µm from the upper and lower borders of frame. Then we estimated the total number of TH-positive cells using the Stereo investigator program (version 11) in a semi-automatic stereological system integrated by an Olympus BX51 microscope (at 60X) connected to a digital video camera (MBF Bioscience, Willinston, VT, USA) and stereological software (MBF Bioscience). The error coefficient was < 0.1 (Gundersen, m = 1).

2.7. TH densitometric analysis in striatum

We carried out TH immunostaining of striatal fibers in 5 µm coronal sections, using a monoclonal anti-TH antibody (dilution 1:500), and captured images with an Eclipse E200 microscope (Nikon Inc., Melville,

NY, USA) and Q-capture Pro 7 software. Following Rojas et al. (2008), we used ImageJ (Rasband, 1997–2016, version 1.45) to determine TH immunoreactivity striatal density. We digitized each image to eight-bits delineating the striatum and used grey scale values ranging between 0 and 255. Eight tissue sections from each animal were examined with 1X magnification. Results were expressed as integrated optical density (IOD).

2.8. Alpha-tubulin and synaptophysin in the striatum

Sections were blocked by incubation in 5% BSA and 1% triton X-100 in PBS for 2 h at room temperature, and then incubated overnight at 4 °C with mouse-monoclonal antibodies against alpha-tubulin (1:500) and synaptophysin (1:500). After incubation with primary antibodies, the sections were incubated at room temperature for 40 min with biotinylated anti-mouse IgG, and subsequently with streptavidin-HRP for 40 min. We visualized the HRP label using 3,3'-diaminobenzidine solution. In order to minimize any potential variance in staining procedure, we processed all tissue sections from all rats (both control and experimental) at the same time. As with the TH densitometric analysis (above), we used the process described by Rojas et al. (2008) to determine the striatal density of alpha-tubulin and synaptophysin immunoreactivity. We examined five areas of the striatum and analyzed six to eight sections of tissue from each experimental rat at 40X magnification. Each image was digitized to eight-bits with an image size of 11.8 × 8.8 cm per frame, providing grey scale values between 0 and 255. Results were expressed as IOD.

2.9. Mitochondria isolation

We isolated mitochondria from the midbrain (the region where the SNpc is located) and striatum following Luis-García et al. (2017) and Orozco-Ibarra et al. (2018). We homogenized tissue in a cold isolation buffer and then isolated mitochondria using differential centrifugation followed by a Percoll® gradient to purify the mitochondrial fraction. Using freshly isolated mitochondria, we then analyzed respiratory parameters, membrane potential and capability to produce ATP. For these assays we only treated one rat from each group in a single working day.

2.10. Determination of complex I activity

We measured the grade of rotenone-induced mitochondrial complex I inhibition following the protocol described by Luis-García et al. (2017) and Orozco-Ibarra et al. (2018). First, we prepared a reaction mixture with 3 mg/mL BSA, 60 µM decyl ubiquinone, 60 µM NADH, 2 mM potassium cyanide, 2 µM antimycin A and 160 µM DCPIP. Then, we started the reaction by adding a mitochondrial fraction (~20 µg protein) and measured the decrease in absorbance at 600 nm for 3 min. In a parallel reaction, we determined rotenone insensitive activity by adding 250 µM rotenone to the reaction mixture. The mitochondrial complex I activity results are expressed as nmol DCPIP/min/mg protein.

2.11. Analysis of complex I protein by Western blot

We used SDS-PAGE to separate midbrain and striatum mitochondrial proteins and then transferred them to polyvinylidene difluoride membranes (BioRad, Hercules, CA, USA). Membranes were incubated with 5% milk in PBS with 0.01% tween for 2 h. Then, we incubated the membranes in primary antibodies against the NDUFS3 subunit of mitochondrial complex I (1:5000; ab14711) overnight. The next day, we washed and probed the membranes with horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG at a dilution of 1:15,000. Chemiluminescence was analyzed by ImageJ (Rasband, 1997–2016, version 1.45).

2.12. Respiratory parameters

Following Luis-García et al. (2017) and Orozco-Ibarra et al. (2018) we used a Clark-type electrode to measure mitochondrial respiration (oxygen consumption). First, we fed the electron transport chain through mitochondrial complex I using 10 mM/5 mM glutamate/malate as substrate and then through complex II using 14 mM succinate. Then we calculated respiratory control ratio (RCR) by dividing state 3 by state 4 respiratory values. State 3 was measured following the addition of 200 μ M ADP and state 4 was induced by 1 μ M oligomycin. We only considered experiments where the RCR values were greater to 3 in the control group for statistical analysis, because values ≤ 1 indicates uncoupled mitochondria, and those greater than 3 indicate coupled mitochondria.

2.13. Determination of ATP synthesis capability

We used an enzyme-linked assay based on the detection of increased NADPH production from NADP⁺ to measure ATP synthesis (*sensu* Luis-García et al., 2017; Orozco-Ibarra et al., 2018). We added 10 μ g of mitochondrial protein to a reaction mixture containing 163 μ g/ml hexokinase, 2 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 20 mM glucose, 1.4 mM NADP⁺ and mitochondrial substrate (10 mM/5 mM glutamate/malate or 14 mM succinate). All determinations were done in duplicate to determine the basal ATP synthesis capability and we used the molar extinction coefficient of NADPH ($6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) to calculate activity. Increased absorbance due to NADP⁺ reduction of was measured at 340 nm. Results are expressed as percentage relative to control.

2.14. Mitochondrial transmembrane potential

We measured changes in the fluorescence of safranin O to estimate mitochondrial membrane potential following Luis-García et al. (2017) and Orozco-Ibarra et al. (2018) by mixing 25 μ g of mitochondrial protein in standard reaction medium with a reaction mixture containing 10 μ M safranin O and mitochondrial substrate (10 mM/5 mM glutamate/malate or 14 mM succinate). We then recorded fluorescence on a multimodal microplate reader at excitation and emission wavelengths of 485 and 590 nm, respectively. Transmembrane potential was dissipated using 200 μ M FCCP and we recorded the changes in fluorescence. Results are expressed as percentage of change in fluorescence arbitrary units/mg protein vs. control.

2.15. Electron microscopy

SNpc and striatum were fixed in 2.5% glutaraldehyde for 1 h, post-fixed in 1% osmium tetroxide for 1 h and the tissue was subsequently dehydrated and finally embedded in Epon before blocks were polymerized for 16–18 h at 60 °C. Using a Sorval MT 6000 ultramicrotome (Microtome Service Company, Liverpool, NY, USA), we cut 1-mm semithin sections from each block and stained them with toluidine blue to allow unambiguous identification of the area of interest prior to ultrathin sectioning of SNpc and striatum. We cut eleven to thirteen ultrathin sections (60–80 nm) from each block with a diamond knife and contrasted them using uranyl acetate and lead citrate. We used a transmission electron microscope (JEM-1400 Plus, JEOL, Boston, MA, USA) to examine sections.

2.16. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and analyzed using one-way ANOVA followed by *post-hoc* Duncan test using Statistical Package for the Social Sciences version 19. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

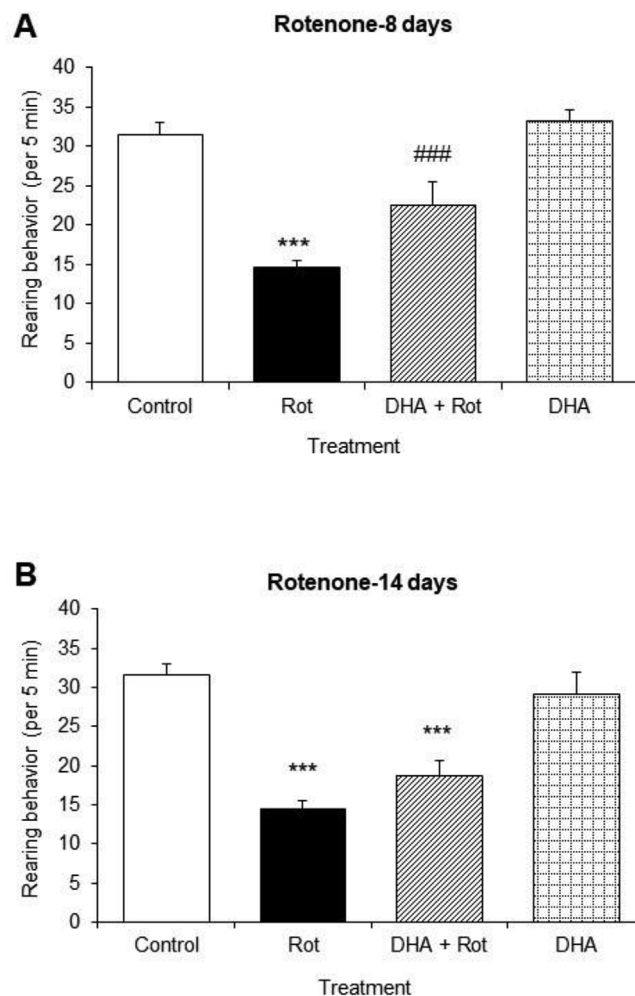


Fig. 1. Effect of rotenone (Rot) and docosahexaenoic acid (DHA) administration on rearing behavior. Number of times a rat reared in a 5-min interval, mean values \pm SEM, $n = 10$ per group following (A) eight and (B) fourteen days of rotenone administration. We compared effects across treatments using a one-way ANOVA followed by a post hoc Duncan's test. In eight-day rotenone scenario DHA decreased Rot effects. *** $p < 0.001$ vs control and ### $p < 0.001$ vs Rot.

3. Results

3.1. DHA neuroprotective effect

We evaluated rearing behavior to test for motor impairment caused by rotenone, and found that the toxic compound decreased rearing behavior by about 50% in both the eight and fourteen-day treatments [43% y 56%; $F_{(3,22)} = 22.29$, $p = 0.000$; $F_{(3,38)} = 20.0$, $p = 0.000$, respectively; Fig. 1]. Eight days of oral DHA administration prior to rotenone treatment prevented rearing behavior decrease by about 54% compared to the group treated with rotenone alone (Fig. 1A), however DHA did not exert a preventive effect in the case of rats that received fourteen days of rotenone (Fig. 1B). DHA alone had no effect on rearing behavior in either the eight or fourteen-day treatments (Fig. 1). Given these findings, the rest of the evaluations were only performed following eight days of rotenone administration.

We analyzed the effect of rotenone and DHA on cellular morphology and the number of dopaminergic neurons in SNpc. We used a stereological analysis to estimate the number of dopaminergic neurons in SNpc, and representative images of TH-positive neurons in the SNpc and TH-positive fibers in striatum are shown in Fig. 2A. We found that dopaminergic neurons decreased (21%) in the SNpc of rats treated with

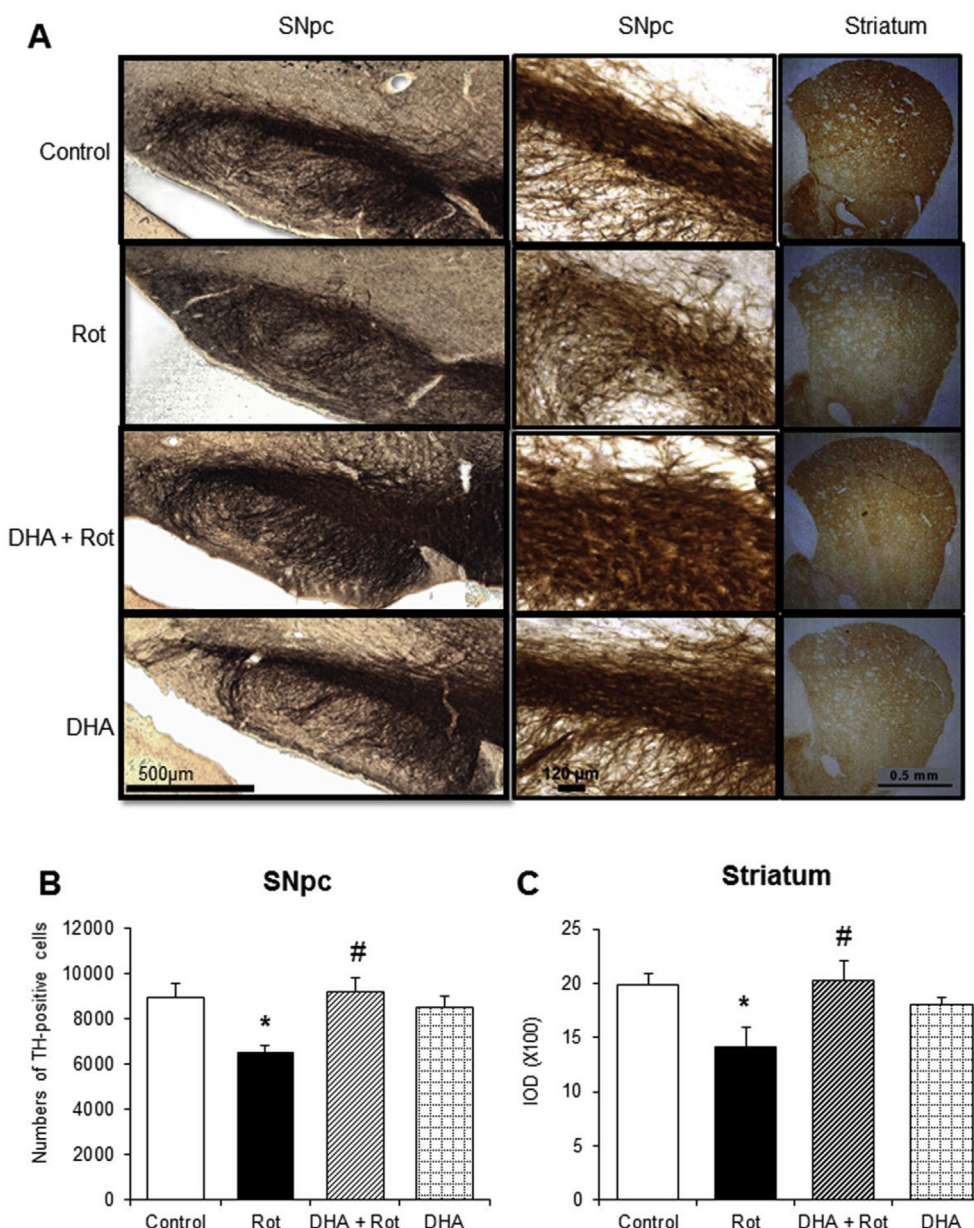


Fig. 2. Effect of rotenone (Rot) and docosahexaenoic acid (DHA) administration on tyrosine hydroxylase (TH) expression. The number of TH positive cells in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and striatum in rats that received rotenone for eight days. (A) Representative images and quantification in (B) SNpc and (C) striatum (mean values \pm SEM, n = 4 to 5 per group). Comparisons using one-way ANOVA followed by a post hoc Duncan's test showed DHA + Rot increased both number and density of TH-positive cells in both tissues vs. rotenone (#p < 0.05), and that rotenone decreased cell number vs. control (*p < 0.05) in SNpc.

rotenone compared to the controls [Fig. 2B; $F_{(3,15)} = 4.54$, $p = 0.019$], and that DHA administration prevented this effect by about 30% in comparison to the rotenone group. A densitometric analysis showed that the density of striatal TH-positive fibers was reduced by about 20% in rotenone-treated rats, but this effect was not statistically significant. However, the density of TH-positive striatum fibers significantly increased by about 34% in the group treated with DHA and rotenone compared with the group that received rotenone alone [Fig. 2C; $F_{(3,14)} = 3.37$, $p = 0.049$].

Histological analysis of the hematoxylin-eosin staining revealed distorted neuronal morphology in the SNpc and striatum of rotenone-treated rats compared with controls (Fig. 3C vs. 3A and Fig. 3D vs. 3B, respectively). DHA treatment partially prevented the morphological damage promoted by rotenone in both brain regions (Fig. 3E and F), and DHA alone did not modify the morphology in either the SNpc (Fig. 3G) or the striatum (Fig. 3H). We found significant nucleus

breakdown indicating cell injury in both SNpc (Fig. 3I; $F_{(3,12)} = 15.10$, $p = 0.000$) and striatum [Fig. 3J; $F_{(3,12)} = 19.14$, $p = 0.000$], the latter being the most affected region.

3.2. Mitochondrial function

An ultrastructural study confirmed the presence of intact mitochondria and therefore the efficiency of the isolation method (Fig. 4A and B). We expected rotenone administration to inhibit mitochondrial complex I activity, however we did not find decreased activity following eight days of rotenone administration in either brain region [Fig. 4C and D; midbrain: $F_{(3,28)} = 0.227$, $p = 0.84$; striatum: $F_{(3,28)} = 0.135$, $p = 0.93$]. Western blot analyses of protein levels also found no effect of rotenone on mitochondrial complex I activity in the midbrain or striatum [Fig. 4E, F and G; midbrain: $F_{(3,12)} = 3.29$, $p = 0.058$; striatum: $F_{(3,12)} = 1.46$, $p = 0.273$], but DHA

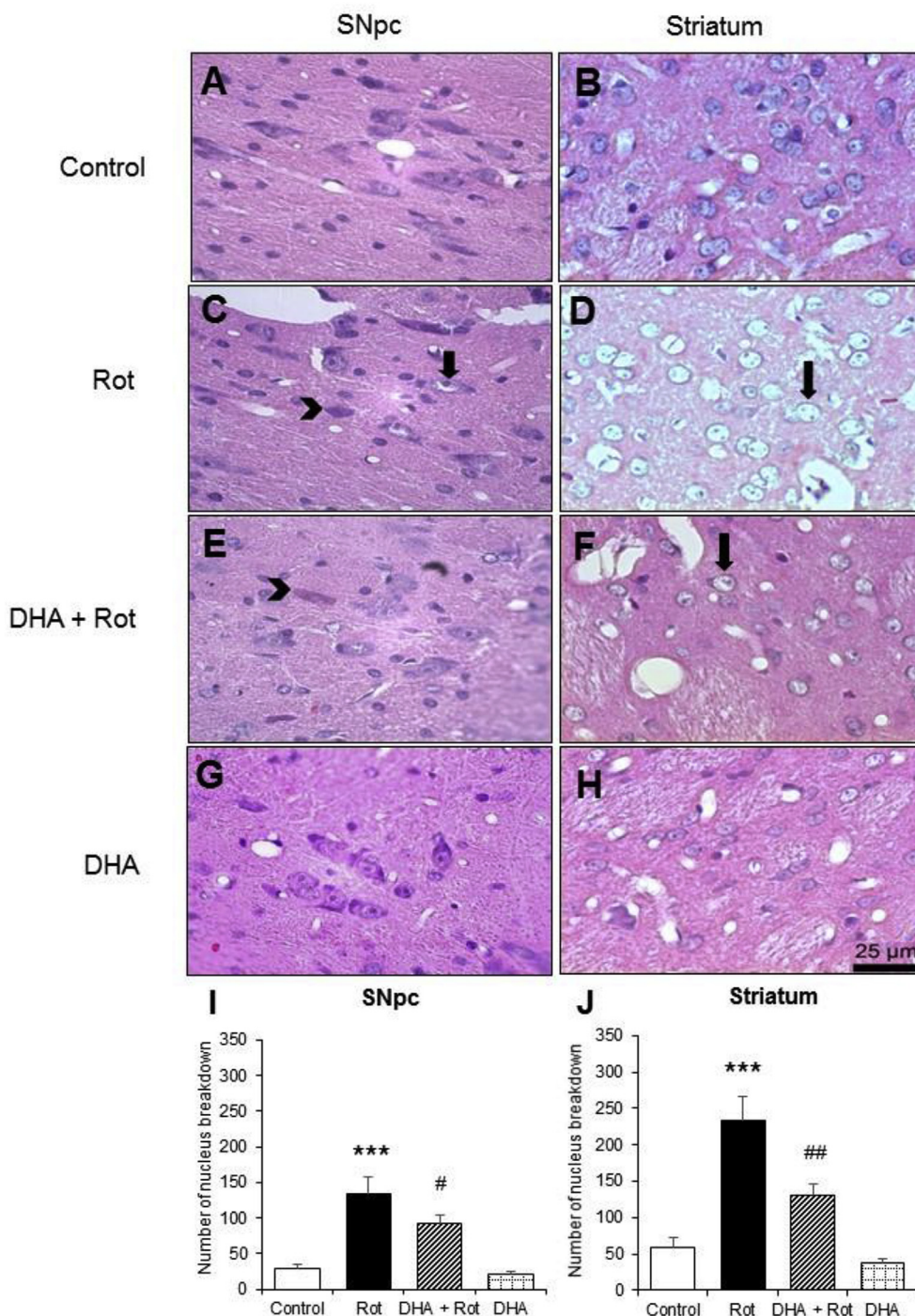


Fig. 3. Hematoxylin-eosin staining. Coronal sections of substantia nigra pars compacta (SNpc) and striatum at 100X magnification in animals that received rotenone (Rot) for eight days. (A, B) Control, (C, D) rotenone, (E, F) docosahexaenoic acid (DHA) + rotenone, (G, H) DHA. Arrows indicate cell nucleus breakdown; arrowheads indicate degenerated cells. Quantification in (I) SNpc and (J) striatum is shown as mean values \pm SEM (n = 4 per group). We found significant nucleus breakdown post rotenone vs. control (**p < 0.001) and a protective effect (vs. rotenone) with DHA in addition to rotenone (#p < 0.05 and ##p < 0.01).

administration increased mitochondrial complex I protein levels in the midbrain when compared to the rotenone group (Fig. 4F).

Rotenone did not decrease RCR in either brain region in the tests that fed the electron transport chain with glutamate/malate [Fig. 5A; midbrain: $F_{(3,8)} = 1.55$, $p = 0.275$; striatum: $F_{(3,8)} = 1.70$, $p = 0.243$] or succinate [Fig. 5B; midbrain: $F_{(3,8)} = 0.306$, $p = 0.821$; striatum: $F_{(3,8)} = 0.998$, $p = 0.442$]. Likewise, rotenone did not decrease mitochondrial ATP synthesis in midbrain or striatum [Fig. 5C and D; midbrain, glutamate/malate: $F_{(3,16)} = 0.806$, $p = 0.509$; striatum,

glutamate/malate: $F_{(3,16)} = 0.197$, $p = 0.897$; midbrain, succinate: $F_{(3,16)} = 1.096$, $p = 0.379$; striatum, succinate: $F_{(3,16)} = 0.184$, $p = 0.906$] nor mitochondrial transmembrane potential [Fig. 5E and F; midbrain, glutamate/malate: $F_{(3,8)} = 0.163$, $p = 0.918$; striatum, glutamate/malate: $F_{(3,8)} = 0.528$, $p = 0.669$; midbrain, succinate: $F_{(3,8)} = 0.197$, $p = 0.896$; striatum, succinate: $F_{(3,16)} = 0.312$, $p = 0.817$].

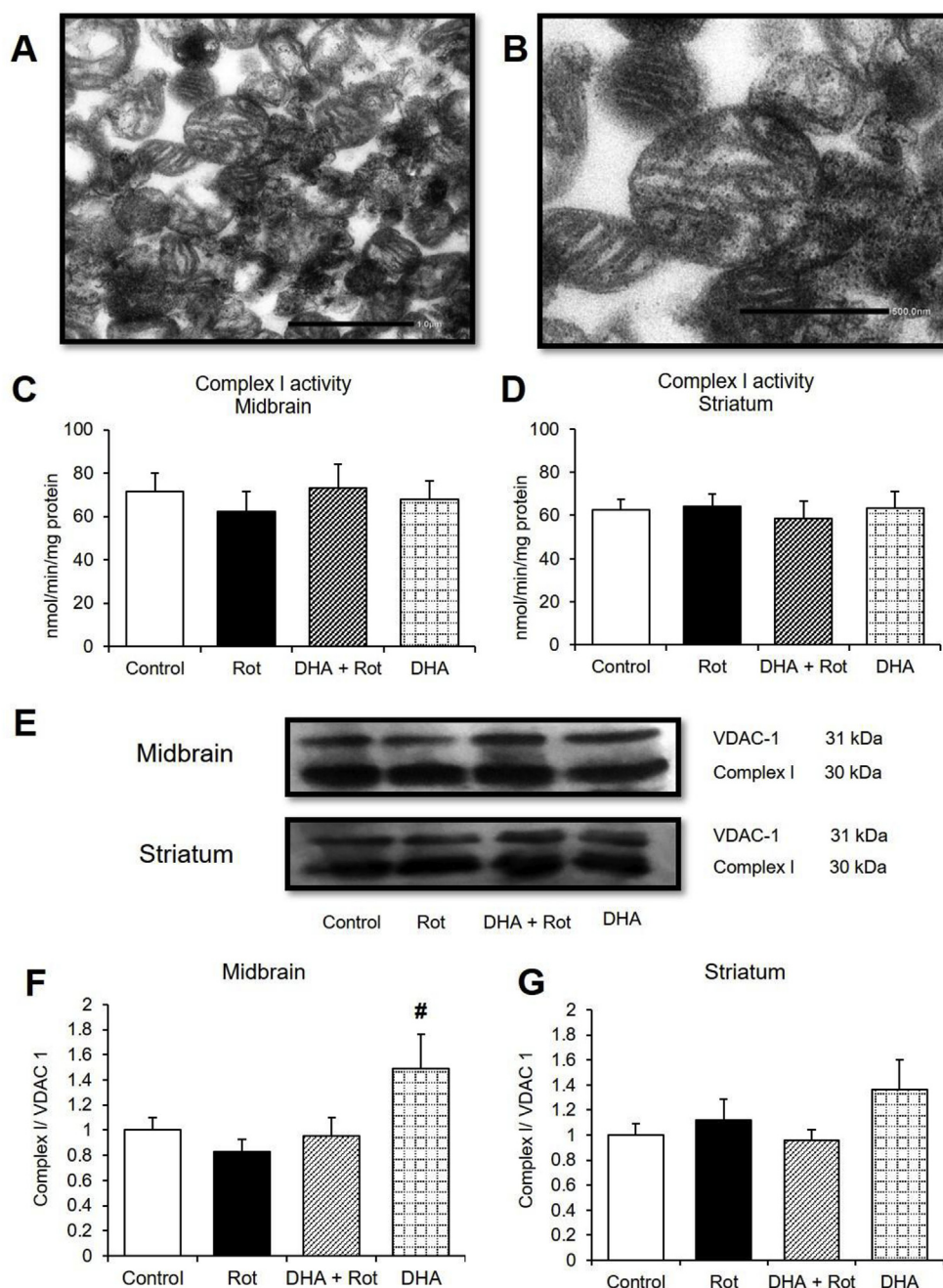


Fig. 4. Mitochondria isolation and complex I determination. Rats without treatment were killed to obtain striatum and isolate the mitochondrial fraction as described in Materials and Methods section. Representative images (A-B) are shown. Effect of rotenone (Rot) and docosahexaenoic acid (DHA) on activity of mitochondrial complex I in (C) midbrain and (D) striatum. (E) Representative Western blot of complex I and voltage-dependent anion-selective channel 1 (VDAC-1). We compared data obtained through densitometric analysis of complex I/VDAC1 expression levels in (F) midbrain and (G) striatum using one-way ANOVAs followed by a post hoc Duncan's test. Mean values \pm SEM, $n = 8$ per group for activity and $n = 4$ per group for Western blot, $\#p < 0.05$ vs. rotenone.

3.3. Mitochondrial ultrastructure

We found normal cell structures (showing perikaryon dense granular material, some lysosomal vesicles and few phagocytic vacuoles) in the SNpc from the control group (Fig. 6A). Similarly, the control group striatum showed synapses and axo-dendritic synapses with adequate mitochondrial preservation (Fig. 6B and C). In the rotenone treated rats, SNpc (Fig. 6D) and striatum (Fig. 6E and F) showed an increase in the number of electron dense lysosomal vesicles, as well as autophagic vesicles displaying varying degrees of degradation and partially destroyed swollen mitochondria. Rotenone-treated SNpc also displayed numerous vacuoles, diminished electron density in the cytoplasm and the presence of phagocytic reactive microglia, while rotenone-treated striatum showed myelin damage dilatation of membranes and nerve terminals. DHA treatment resulted in the reduction of mitochondrial swelling and microglial activation promoted by rotenone in SNpc (Fig. 6G) and

striatum (Fig. 6H and I). Treatment with DHA alone (Fig. 6J to L) did not modify the morphology in dopaminergic neurons from SNpc (Fig. 6J) or in nerve terminals in striatum (Fig. 6K and L). However, we did find an increase in the electrodensity of lysosomal vesicles in the perikaryon and nerve terminals.

3.4. Tubulin and synaptophysin expression

Next, we tested whether rotenone or DHA administration has any effect on the microtubules that constitute the cell cytoskeleton, and found that rotenone decreases the immunohistochemical markings of alpha-tubulin by about 37% [Fig. 7A and B; $F_{(3,16)} = 15.27$, $p = 0.000$] and that pretreatment with DHA prevented this rotenone-generated decrease by about 39%. The group that only received DHA showed no effects on alpha-tubulin.

Finally, we tested whether rotenone or DHA administration had any

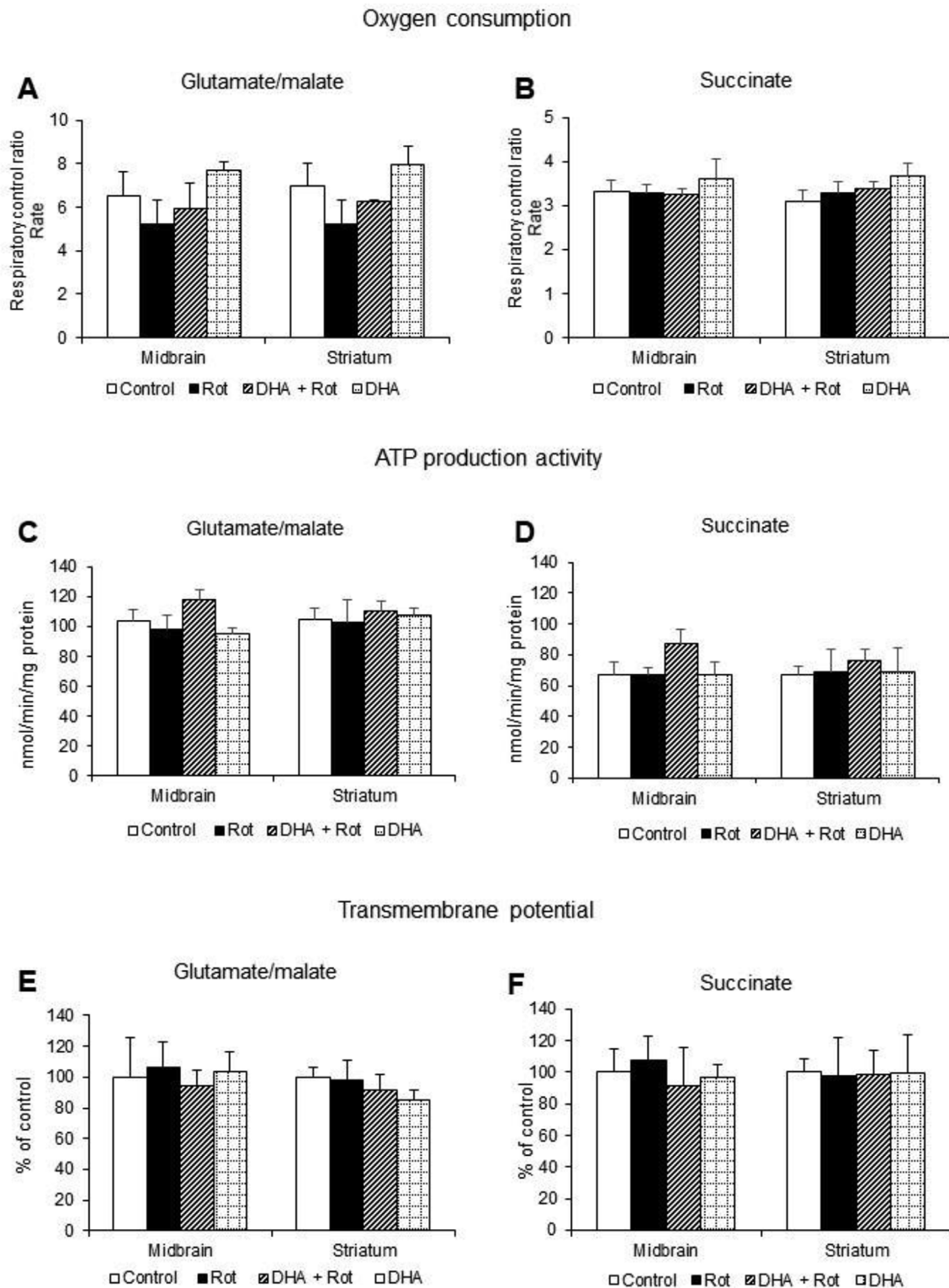


Fig. 5. Effect of rotenone (Rot) and docosahexaenoic acid (DHA) on mitochondrial function parameters. We used glutamate/malate as a respiratory substrate for complex I and succinate for complex II. We found no difference across treatments in (A, B) oxygen consumption, (C, D) ATP production, and (E, F) transmembrane potential across treatments, using one-way ANOVAs followed by a post hoc Duncan's test. Mean values \pm SEM, $n = 3-5$ per group.

effect on synaptic transmission in the striatum (Fig. 7), and the immunohistochemistry results revealed that rotenone decreased synaptophysin by 31% in comparison to the control group. Administering DHA in addition to rotenone prevented 39% of this reduction and administering DHA alone increased synaptophysin by 12% in comparison to the control group (Fig. 7C and D; $F_{(3,16)} = 23.20$, $p = 0.000$).

4. Discussion

Our goal was to test whether DHA exerts a neuroprotective effect on rotenone-induced parkinsonism and to evaluate some of the possible processes involved, including changes in mitochondrial function and ultrastructure as well as in the expression of tubulin and synaptophysin.

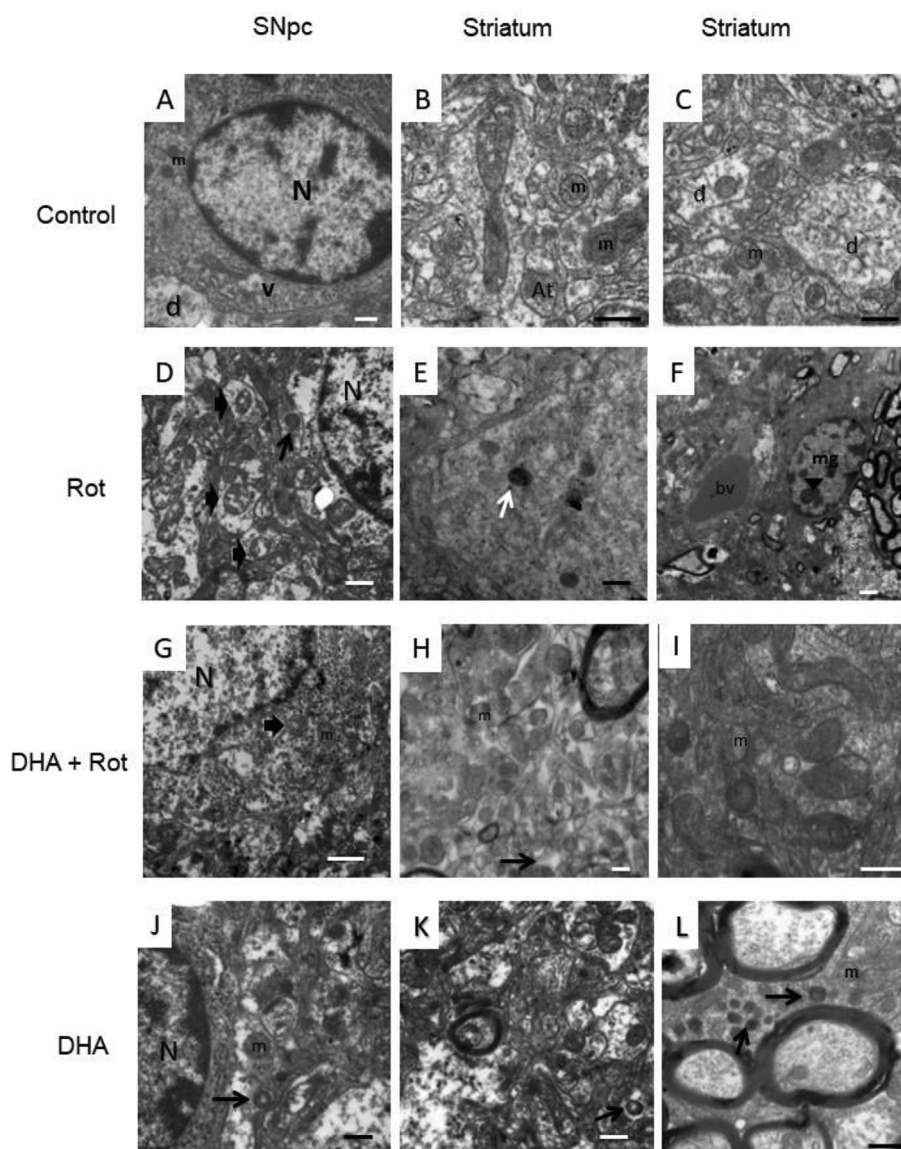


Fig. 6. SNpc and striatum electron micrographs. Representative images of (A to C) Control group, (D to F) rotenone (Rot)-treated group, (G to I) docosahexaenoic acid (DHA) plus rotenone group, (J to L) DHA group. SNpc: substantia nigra pars compacta. v: vacuoles, At: axo-dendritic synapse, m: mitochondria, d: dendrite, mg: phagocytic reactive microglia, bv: blood vessel, N: nucleus. Thin black arrow: lysosomal vesicle. Thin white arrow: autophagy vacuoles. Thick black arrow: partially destroyed swollen mitochondria. Calibration bar 500 nm.

Our results confirm that rotenone induced an experimental model to study idiopathic parkinsonism and clearly establish a neuroprotective effect exerted by DHA on rotenone-induced parkinsonism, as seen through the preservation of dopaminergic neurons in SNpc and TH fibers in striatum following DHA treatment prior to rotenone. Although, the neuroprotective effect of DHA was directly associated with the prevention of decreased tubulin and synaptophysin expression (both being proteins closely related to synaptic transmission), we did not find altered mitochondrial function despite some mitochondrial swelling.

This is the first study to report the neuroprotective effect of DHA administered alone and for a short period in a PD experimental model, although similar effects exist for rodent experimental PD models induced using MPTP or 6-OHDA. In these experiments DHA was either administered for longer periods or in combination with other compounds (Ozkan et al., 2016; Hacıoglu et al., 2012; Ozsoy et al., 2011; Tanriover et al., 2010; Cansev et al., 2008). The neuroprotective effect we found may be due to rapid DHA transportation to the brain (Bazan et al., 2011).

The significant cell death found in rotenone-treated rats is evidence

for the role of rotenone as a potential tool for exploring the early stages of PD (Johnson et al., 2015; Greenamyre et al., 2010). Histological analysis showed that the striatum, the region of the brain that receives the SNpc dopaminergic neuron projections, was the region with the most rotenone damage. This may be due to the proximity of the striatum to the lateral ventricles, which makes it the primary toxin uptake site, and is in line with previous findings regarding the retrograde rotenone action in injury to dopaminergic neurons in SNpc (Melo et al., 2013).

Because mitochondria play an essential role in regulating key steps involved in cell death, it is important to explore their participation at the onset of neurodegeneration. Thus, it was surprising to find that the DHA neuroprotective effect was not related to changes in mitochondrial function. We expected to find mitochondrial dysfunction in rotenone-treated rats given that rotenone is recognized as a classic inhibitor of mitochondrial complex I (Lindahl and Öberg, 1960; Palmer et al., 1968; Singer and Ramsay, 1994; Xiong et al., 2012). However, the widely documented rotenone inhibition of mitochondrial complex I has all occurred in isolated mitochondria or permeabilized cells which were

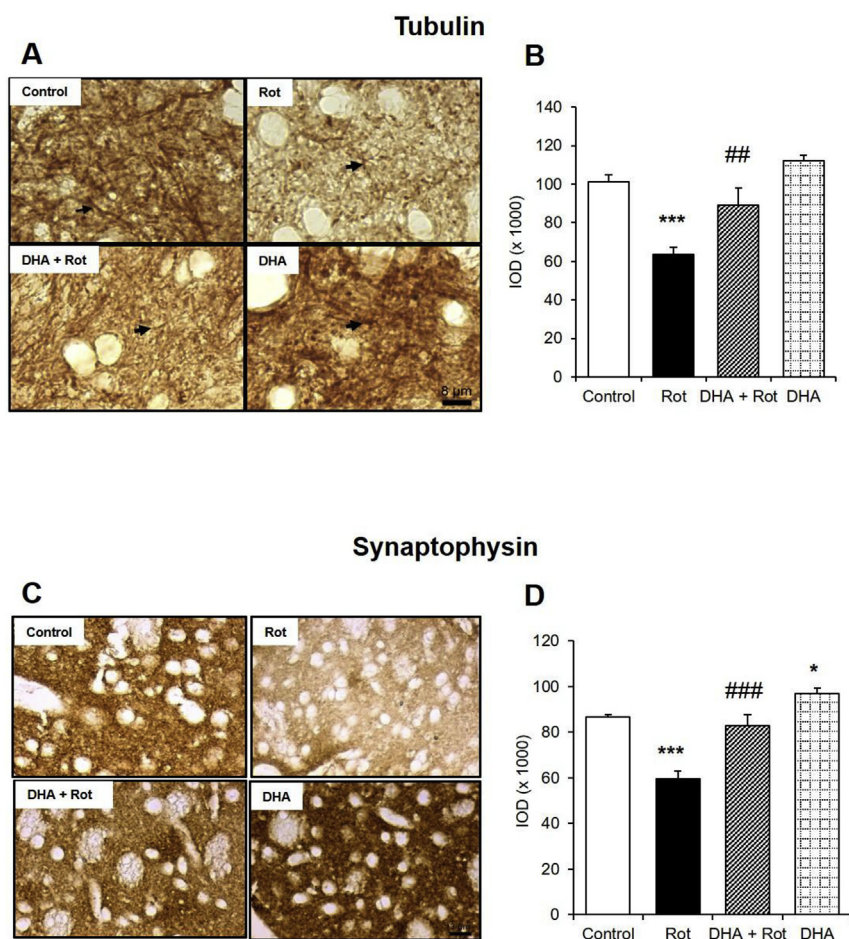


Fig. 7. Effect of rotenone (Rot) and docosahexaenoic acid (DHA) on tubulin and synaptophysin expression. Representative images of (A) tubulin and (C) synaptophysin in striatum. Quantification in striatum of (B) tubulin and (D) synaptophysin. Arrows indicate microtubules. We used one-way ANOVA followed by post hoc Duncan's tests to compare tubulin or synaptophysin positive fibers (mean values \pm SEM, $n = 4$ per group). We found synaptophysin was higher following DHA alone treatment than the control ($*p < 0.05$), both tubulin and synaptophysin decreased post rotenone vs. control ($***p < 0.001$), and they both increased (vs. rotenone) with DHA in addition to rotenone ($##p < 0.01$ and $###p < 0.001$).

directly incubated with the compound. To our knowledge, our study is the first to report mitochondrial complex I activity in the striatum and midbrain from animals treated *in vivo* with rotenone at the dosages and times we used. Many *in vivo* studies which report mitochondrial activity following rotenone administration, either administered the compound daily for long periods or used higher doses (Betarbet et al., 2000; Abdin and Hamouda, 2008; Denny Joseph and Muralidhara, 2015; Wen et al., 2011). In other experiments, where brain mitochondrial function was measured after short-term rotenone administration, no decreased RCR was found, despite significant reductions in state 3 (Panov et al., 2005). Despite evidence of diminished mitochondrial complex I activity in patients who died after several years of PD evolution (Jenner, 1993; Flones et al., 2018; Schapira, 2007), decreased activity may not play a pathogenic role in the PD neurodegeneration process (Flones et al., 2018).

We found slight mitochondrial alterations while searching for a link between ultrastructural changes and biochemical characteristics in the SNpc and striatum. However, these alterations were not important enough to impair mitochondrial function. This is in line with *in vitro* previous evidence of changes in mitochondrial morphology in an Alzheimer's disease model (with beta-amyloid treatment on primary cortex neurons) that did not impair ATP production or transmembrane potential (Hung et al., 2018). This is a growing body of evidence for decreased mitochondrial function being a consequence, rather than a cause, of neurodegeneration. A possible limitation of our mitochondrial function analysis is that we used the ventral midbrain, but the dopaminergic neurons damaged by rotenone are only located in SNpc. Additionally, the isolated mitochondria came from different cell lineages present in the brain, and there is no existing information on whether rotenone has a differential effect on different cell types present in the

nervous system.

We found that rotenone decreases tubulin expression in the striatum, this finding is in line with evidence of microtubule dysfunction as an early neurodegeneration event which even occurs before mitochondrial damage in 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced parkinsonism (Cartelli et al., 2010). Because dopamine transport to the striatum from SNpc requires correct microtubular function, it is feasible that rotenone-induced microtubule destabilization affects dopamine transport. A link between mitochondrial function and cytoskeleton homeostasis may exist, however mitochondrial dysfunction has been detected both before (Esteves et al., 2010) and after (Maldonado et al., 2010) microtubule network destabilization. Likewise, mitochondrial complex I inhibition has been shown to potentiate, rather than cause, rotenone-induced dopaminergic neuron cell death, with microtubule depolymerization suggested as an alternative mechanism in rotenone-induced neuronal death (Choi et al., 2011). DHA administration in our experiment clearly prevented decreased tubulin expression, indicating its capacity for preventing microtubule destabilization, similarly to previous *in vitro* experiments (Wang et al., 2010).

Rotenone induced decreased synaptophysin expression, and this decrease was also prevented by DHA administration. Our results follow studies showing similar synaptophysin decrease after rotenone intracranial infusion (Norazit et al., 2010) or MPTP administration (Cao et al., 2016), which would suggest that this decrease is a hallmark of PD. However, evidence overall is still equivocal. Postmortem studies show no significant difference in synaptophysin expression between PD patients and controls (Girault et al., 1989), but neuroimaging studies show that early striatal synaptic dysfunctions precede neurodegeneration, given that neurodegeneration in early PD is more severe in dopamine nerve terminals and axons than it is in the SNpc (Bellucci et al.,

2017). In PD experimental models, synaptophysin loss is consistently prevented by several neuroprotective agents (Cao et al., 2016; Shin et al., 2016). Because DHA can both enhance synaptophysin expression (Hashimoto et al., 2017; Bate et al., 2010), and halt its decrease, this makes DHA a potential candidate to modify the course of PD in the early stages.

5. Conclusions

Our work provides evidence of early microtubule destabilization in PD, as well as synaptic density loss, but we did not find evidence of mitochondrial dysfunction in the neurodegeneration process. We found a clear neuroprotective effect of DHA against rotenone-induced parkinsonism. This effect was associated with the prevention of decreased tubulin and synaptophysin expression, both proteins closely related to synaptic transmission. Similarly, DHA had a neuroprotective effect on mitochondrial ultrastructure, even though observed changes in mitochondrial ultrastructural study did not generate mitochondrial dysfunction.

Further experiments should be carried out, especially in order to fully describe the mechanism by which DHA modulates tubulin and synaptophysin levels and to know the specific cell lineage where tubulin and synaptophysin decrease. Understanding of the mechanisms involved in the neuroprotective effects of DHA, particularly in the early stages of PD, will be the key for the development of recommendations regarding DHA related therapy in PD.

Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México [grant number 168356 to MOI].

Declarations of interest

None.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Juana Villeda-Hernández for allowing us the use of electron microscope whose acquisition was financed by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [grant number 226201].

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.10.015>.

References

- Abdin, A.A., Hamouda, H.E., 2008. Mechanism of the neuroprotective role of coenzyme Q10 with or without L-dopa in rotenone-induced Parkinsonism. *Neuropharmacology* 55, 1340–1346. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.08.033>.
- Bai, Q., He, J., Tang, Y., Wang, S., Qiu, J., Wang, Y., Yu, C., 2016. Rotenone-induced energy stress decompensated in ventral mesocerebrum is associated with Parkinsonism progression in rats. *Exp. Ther. Med.* 12, 1060–1066. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3352>.
- Bate, C., Tayebi, M., Salmons, M., Diomedea, L., Williams, A., 2010. Polyunsaturated fatty acids protect against prion-mediated synapse damage in vitro. *Neurotox. Res.* 17, 203–214. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9093-2>.
- Bazan, N.G., Molina, M.F., Gordon, W.C., 2011. Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Nutr.* 31, 321–351. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104635>.
- Bellucci, A., Antonini, A., Pizzi, M., Spano, P., 2017. The end is the beginning: Parkinson's disease in the light of brain imaging. *Front. Aging Neurosci.* 9, 330. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00330>.
- Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., Greenamyre, J.T., 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 3, 1301–1306. <https://doi.org/10.1038/81834>.
- Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., 2012. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 845618. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/845618>.

- Brooks, S.P., Dunnett, S.B., 2009. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 519–529. <https://doi.org/10.1038/nrn2652>.
- Cannon, J.R., Tapias, V., Na, H.M., Honick, A.S., Drolet, R.E., Greenamyre, J.T., 2009. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 34, 279–290. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.01.016>.
- Cansev, M., Ulus, I.H., Wang, L., Maher, T.J., Wurtman, R.J., 2008. Restorative effects of uridine plus docosahexaenoic acid in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci. Res.* 62, 206–209. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.07.005>.
- Cao, L., Li, D., Feng, P., Li, L., Xue, G.F., Li, G., Hölscher, C., 2016. A novel dual GLP-1 and GIP incretin receptor agonist is neuroprotective in a mouse model of Parkinson's disease by reducing chronic inflammation in the brain. *Neuroreport* 27, 384–391. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000548>.
- Cartelli, D., Ronchi, C., Maggioni, M.G., Rodighiero, S., Giavini, E., Cappelletti, G., 2010. Microtubule dysfunction precedes transport impairment and mitochondria damage in MPP+ -induced neurodegeneration. *J. Neurochem.* 115, 247–258. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06924.x>.
- Chao, H., Liu, Y., Fu, X., Xu, X., Bao, Z., Lin, C., Li, Z., Liu, Y., Wang, X., You, Y., Liu, N., Ji, J., 2018. Lowered iPLA2γ activity causes increased mitochondrial lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in a rotenone-induced model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 300, 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.031>.
- Chaturvedi, R.K., Beal, M.F., 2013. Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radic. Biol. Med.* 63, 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018>.
- Choi, W.S., Palmiter, R.D., Xia, Z., 2011. Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. *J. Cell Biol.* 192, 873–882. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009132>.
- Denny Joseph, K.M., Muralidhara, 2015. Combined oral supplementation of fish oil and quercetin enhances neuroprotection in a chronic rotenone rat model: relevance to Parkinson's disease. *Neurochem. Res.* 40, 894–905. <https://doi.org/10.1007/s1106>.
- Dexter, D.T., Jenner, P., 2013. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018>.
- Esteves, A.R., Arduino, D.M., Swerdlow, R.H., Oliveira, C.R., Cardoso, S.M., 2010. Microtubule depolymerization potentiates alpha-synuclein oligomerization. *Front. Aging Neurosci.* 1, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00054>.
- European Pharmacopoeia Commission, European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, 2007. *European Pharmacopoeia*, vol. 2 Council of Europe.
- Fabelo, N., Martín, V., Santpere, G., Marín, R., Torrent, L., Ferrer, I., Díaz, M., 2011. Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease. *Mol. Med.* 17, 1107–1118. <http://www.molmed.org> doi: 10.2119/molmed.2011.00119.
- Fleming, S.M., Zhu, C., Fernagut, P.O., Mehta, A., DiCarlo, C.D., Seaman, R.L., Chesselet, M.F., 2004. Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. *Exp. Neurol.* 187, 418–429. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.01.023>.
- Flønes, I.H., Fernandez-Vizcarra, E., Lykouris, M., Brakedal, B., Skjeie, G.O., Miletic, H., Lilleng, P.K., Alves, G., Tysnes, O.B., Haugarvoll, K., Dølle, C., Zeviani, M., Tzoulis, C., 2018. Neuronal complex I deficiency occurs throughout the Parkinson's disease brain, but is not associated with neurodegeneration or mitochondrial DNA damage. *Acta Neuropathol.* 135, 409–425. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1794-7>.
- Girault, J.A., Raisman-Vozari, R., Agid, Y., Greengard, P., 1989. Striatal phosphoproteins in Parkinson disease and progressive supranuclear palsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2493–2497. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2493>.
- Greenamyre, J.T., Cannon, J.R., Drolet, R., Mastroberardino, P.G., 2010. Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 141–142. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.12.006>.
- Hacioglu, G., Seval-Celik, Y., Tanriover, G., Ozsoy, O., Saka-Topcuoglu, E., Balkan, S., Agar, A., 2012. Docosahexaenoic acid provides protective mechanism in bilaterally MPTP-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Folia Histochem. Cytobiol.* 50, 228–238. <https://doi.org/10.5603/FHC.2012.0032>.
- Hashimoto, M., Hossain, S., Al Mamun, A., Matsuzaki, K., Arai, H., 2017. Docosahexaenoic acid: one molecule diverse functions. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37, 579–597. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1207153>.
- Hongo, H., Kihara, T., Kume, T., Izumi, Y., Niidome, T., Sugimoto, H., Akaike, A., 2012. Glycogen synthase kinase-3β activation mediates rotenone-induced cytotoxicity with the involvement of microtubule destabilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 426, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.042>.
- Hung, C.H., Cheng, S.S., Cheung, Y.T., Wuwongse, S., Zhang, N.Q., Ho, Y.S., Lee, S.M., Chang, R.C., 2018. A reciprocal relationship between reactive oxygen species and mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Redox. Biol.* 14, 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.08.010>.
- Jackson-Lewis, V., Blesa, J., Przedborski, S., 2012. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord. Suppl.* 1, S183–S185. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(11\)70057-8](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(11)70057-8).
- Jenner, P., 1993. Altered mitochondrial function, iron metabolism and glutathione levels in Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 146, 6–13.
- Johnson, M.E., Lim, Y., Senthikumar, M., Zhou, X.F., Bobrovskaya, L., 2015. Investigation of tyrosine hydroxylase and BDNF in a low-dose rotenone model of Parkinson's disease. *J. Chem. Neuroanat.* 70, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2015.11.002>.
- Kim, Y.J., Takahashi, R., 2006. Role of polyunsaturated fatty acids for misfolding protein aggregations: implication for neurodegenerative diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1086, 11–20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502230200>.
- Kumar, A., Huang, Z., Calne, D.B., 2005. Parkinson's disease: where are we? In: Ebadi, M., Pfeiffer, R.F. (Eds.), *Parkinson's Disease*. CRC, Washington D.C., pp. 27–38.

- Lin, T.K., Cheng, C.H., Chen, S.D., Liou, C.W., Huang, C.R., Chuang, Y.C., 2012. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress promote apoptotic cell death in the striatum via cytochrome c/caspase-3 signaling cascade following chronic rotenone intoxication in rats. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 8722–8739. <https://doi.org/10.3390/ijms13078722>.
- Lindahl, P.E., Oberg, K.E., 1960. Mechanism of the physiological action of rotenone. *Nature* 187, 784.
- Liu, Y., Sun, J.D., Song, L.K., Li, J., Chu, S.F., Yuan, Y.H., Chen, N.H., 2015. Environment-contact administration of rotenone: a new rodent model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 294, 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.07.058>.
- Luis-García, E.R., Limón-Pacheco, J.H., Serrano-García, N., Hernández-Pérez, A.D., Pedraza-Chaverri, J., Orozco-Ibarra, M., 2017. Sulforaphane prevents quinolinic acid-induced mitochondrial dysfunction in rat striatum. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 31, e21837. <https://doi.org/10.1002/jbt.21837>.
- Maldonado, E.N., Patnaik, J., Mullins, M.R., Lemasters, J.J., 2010. Free tubulin modulates mitochondrial membrane potential in cancer cells. *Cancer Res.* 70, 10192–10201. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2429>.
- Melo, T.Q., Dunhao, A.M., Martins, S.A., Farizatto, K.L., Chaves, R.S., Ferrari, M.F., 2013. Rotenone-dependent changes of anterograde motor protein expression and mitochondrial mobility in brain areas related to neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Neurobiol.* 33, 327–335. <https://doi.org/10.1007/s10571-012-9898>.
- Navarro, A., Boveris, A., Bández, M.J., Sánchez-Pino, M.J., Gómez, C., Muntané, G., Ferrer, L., 2009. Human brain cortex: mitochondrial oxidative damage and adaptive response in Parkinson disease and in dementia with Lewy bodies. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 1574–1580. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.007>.
- Noraziti, A., Meedeniya, A.C., Nguyen, M.N., Mackay-Sim, A., 2010. Progressive loss of dopaminergic neurons induced by unilateral rotenone infusion into the medial forebrain bundle. *Brain Res.* 1360, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.070>.
- Orozco-Ibarra, M., García-Morales, J., Calvo-Silva, F.J., Fernández-Valverde, F., Serrano-García, N., 2018. Striatal mitochondria response to 3-nitropropionic acid and fish oil treatment. *Nutr. Neurosci.* 21, 132–142. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2016.1237074>.
- Ozkan, A., Parlak, H., Tanriover, G., Dilmac, S., Ulker, S.N., Birsen, L., Agar, A., 2016. The protective mechanism of docosahexaenoic acid in mouse model of Parkinson: the role of hemoxygenase. *Neurochem. Int.* 101, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.10.012>.
- Ozsoy, O., Seval-Celik, Y., Hacıoglu, G., Yargicoglu, P., Demir, R., Agar, A., Aslan, M., 2011. The influence and the mechanism of docosahexaenoic acid on a mouse model of Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* 59, 664–670. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.06.012>.
- Palmer, G., Horgan, D.J., Tisdale, H., Singer, T.P., Beinert, H., 1968. Studies on the respiratory chain-linked reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase. XIV. Location of the sites of inhibition of rotenone, barbiturates, and ptericidin by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 243, 844–847.
- Panov, A., Dikalov, S., Shalbuyeva, N., Taylor, G., Sherer, T., Greenamyre, J.T., 2005. Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *J. Biol. Chem.* 280, 42026–42035. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508628200>.
- Rasband, W.S., 1997–2016. ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <https://imagej.nih.gov/ij/>.
- Rojas, P., Serrano-García, N., Mares-Sámano, J.J., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverri, J., Ogren, S.O., 2008. EGb761 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. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06314.x>.
- Samadi, P., Grégoire, L., Rouillard, C., Bédard, P.J., Di Paolo, T., Lévesque, D., 2006. Docosahexaenoic acid reduces levodopa-induced dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys. *Ann. Neurol.* 59, 282–288. <https://doi.org/10.1002/ana.20738>.
- Samii, A., Nutt, J.G., Ransom, B.R., 2004. Parkinson's disease. *Lancet* 363, 1783–1793. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16305-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16305-8).
- Schapiro, A.H., 2007. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell Death Differ.* 14, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402160> 6, 1261–1266.
- Shin, M.S., Jeong, H.Y., An, D.I., Lee, H.Y., Sung, Y.H., 2016. Treadmill exercise facilitates synaptic plasticity on dopaminergic neurons and fibers in the mouse model with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 621, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.04.015>.
- Singer, T.P., Ramsay, R.R., 1994. The reaction sites of rotenone and ubiquinone with mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1187, 198–202.
- Stocchi, F., Vacca, L., Radicati, F.G., 2015. How to optimize the treatment of early stage Parkinson's disease. *Transl. Neurodegener.* 4, 4. <https://doi.org/10.1186/2047-9158-4-4>.
- Takalo, M., Salminen, A., Soininen, H., Hiltunen, M., Haapasalo, A., 2013. Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *Am. J. Neurodegener. Dis.* 2, 1–14. <https://doi.org/10.1186/2047-9158-4-4>.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S.A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J.S., De Groot, B.L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., Jahn, R., 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127, 831–846. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.030>.
- Tanriover, G., Seval-Celik, Y., Ozsoy, O., Akkoyunlu, G., Savcioglu, F., Hacıoglu, G., Demir, N., Agar, A., 2010. The effects of docosahexaenoic acid on glial derived neurotrophic factor and neurturin in bilateral rat model of Parkinson's disease. *Folia Histochem. Cytobiol.* 48, 434–441. <https://doi.org/10.2478/v10042-010-0047-6>.
- Utter, A.A., Basso, M.A., 2008. The basal ganglia: an overview of circuits and function. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.11.003>.
- Wang, P.Y., Chen, J.J., Su, H.M., 2010. Docosahexaenoic acid supplementation of primary rat hippocampal neurons attenuates the neurotoxicity induced by aggregated amyloid beta protein (42) and up-regulates cytoskeletal protein expression. *J. Nutr. Biochem.* 21, 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.01.012>.
- Wen, Y., Li, W., Potteet, E.C., Xie, L., Tan, C., Yan, L.J., Ju, X., Liu, R., Qian, H., Marvin, M.A., Goldberg, M.S., She, H., Mao, Z., Simpkins, J.W., Yang, S.H., 2011. Alternative mitochondrial electron transfer as a novel strategy for neuroprotection. *J. Biol. Chem.* 286, 16504–16515. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.208447>.
- West, M.J., Slomianka, L., Gundersen, H.J., 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.* 231, 482–497. <https://doi.org/10.1002/ar.1092310411>.
- Xiong, N., Long, X., Xiong, J., Jia, M., Chen, C., Huang, J., Ghoorah, D., Kong, X., Lin, Z., Wang, T., 2012. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. *Crit. Rev. Toxicol.* 42, 613–632. <https://doi.org/10.3109/10408444.2012.680431>.
- Zhang, Z.N., Zhang, J.S., Xiang, J., Yu, Z.H., Zhang, W., Cai, M., Li, X.T., Wu, T., Li, W.W., Cai, D.F., 2017a. Subcutaneous rotenone rat model of Parkinson's disease: dose exploration study. *Brain Res.* 1655, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.11.020>.
- Zhang, X., Yang, Y., Du, L., Zhang, W., Du, G., 2017b. Baicalein exerts anti-neuroinflammatory effects to protect against rotenone-induced brain injury in rats. *Int. Immunopharm.* 50, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.06.007>.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00115

Matrícula: 210380860

EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS ω -3 SOBRE EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO NIGROESTRIAL ANTE EL DAÑO GENERADO POR ROTENONA, MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 11 del mes de octubre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. VERONICA SOUZA ARROYO
DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ
DRA. LETICIA GRANADOS ROJAS
DRA. SONIA GALVAN ARZATE

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: NORMA SERRANO GARCIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



NORMA SERRANO GARCIA
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. VERONICA SOUZA ARROYO

VOCAL

DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO
JIMENEZ

VOCAL

DRA. LETICIA GRANADOS ROJAS

SECRETARIA

DRA. SONIA GALVAN ARZATE