

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

RICARDO ALEXANDRE PAGANELLI

EFEITOS DO EXTRATO DE GINKGO BILOBA, EGb 761, EM RATOS SUBMETIDOS À  
ISQUEMIA CEREBRAL: UMA ANÁLISE HISTOLÓGICA E COMPORTAMENTAL

MARINGÁ  
2006

RICARDO ALEXANDRE PAGANELLI

EFEITOS DO EXTRATO DE GINKGO BILOBA, EGb 761, EM RATOS SUBMETIDOS À  
ISQUEMIA CEREBRAL: UMA ANÁLISE HISTOLÓGICA E COMPORTAMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Milani

MARINGÁ  
2006

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Pedro e Lourdes, a minha esposa, Simone, aos meus irmãos, Osmar e Márcia, aos meus cunhados, aos meus sobrinhos, ao meu sogro e sogra, pelo incentivo, carinho e amor durante a realização deste trabalho. Dedico também a meu filho em gestação.

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço inicialmente a Deus, que me deu forças e concedeu saúde e sabedoria para realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Humberto Milani, que soube mais do que ninguém conviver com minhas dificuldades e me apoiar em todos os momentos, sempre me incentivando a se aprofundar no conhecimento e discernimento de uma pesquisa bem conduzida.

Ao Técnico de Laboratório Marcos Alberto Trombelli, pela incansável ajuda na parte experimental, com experiência e dedicação.

A Senhora Helena, Secretária do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo apoio e dedicação sem limites para a promoção do curso.

Agradeço aos técnicos do Departamento de Farmácia e Farmacologia que direta ou indiretamente me ajudaram na condução experimental: Carlos, Solidalva, Jailson e Ademir.

Agradeço à Profa. Luzmarina Hernandez e ao pessoal técnico Tarcila, Maria Eurides e Maria dos Anjos, do Laboratório de Histotécnica, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, pelo apoio técnico e amizade.

## RESUMO

O Extrato Padronizado da *Ginkgo biloba L.* (EGb 761), tem sido usado no tratamento de várias desordens degenerativas do sistema nervoso central (SNC), incluindo aquelas de natureza hipóxica/isquêmica. Diversas ações têm sido descritas para o EGb 761, com destaque para o antagonismo do receptor do PAF (fator ativador de plaquetas) e redução dos níveis de PAF que se encontram aumentados durante a isquemia, bem como uma ação antioxidante, principalmente em nível de membrana celular. O efeito neuroprotetor do EGb 761 tem sido observado mais diretamente usando-se modelos animais *in vivo* de isquemia cerebral focal ou global. Contudo, são escassos os estudos envolvendo uma análise comportamental dos efeitos do EGb 761 no sentido de verificar o seu potencial em favorecer a conservação e/ou recuperação de funções após lesão isquêmica cerebral. No modelo de isquemia cerebral, global e transitória (ICGT) no rato, tais estudos não existem. Por outro lado, são várias as evidências mostrando os efeitos benéficos do EGb 761 sobre as funções cognitivas em animais intactos, jovens ou idosos. No presente estudo propusemos investigar se o tratamento com EGb 761 pode reduzir ou reverter os efeitos neurodegenerativos e cognitivos causados pela ICGT em ratos. Os animais foram submetidos a 15 minutos de isquemia cerebral, conforme o modelo de oclusão dos 4 vasos (4-VO). Esse estudo foi dividido em duas partes. Na primeira, o produto comercial Tebonin® (EGb 761, solução oral, 40 mg/mL) foi administrado por via oral nas doses de 10, 40 ou 100 mg/kg/dia, durante 14 dias antes da isquemia. Num outro experimento, Tebonin® foi dado nas doses de 40 ou 100 mg/kg/dia, durante 14 dias pré-isquemia, seguido de mais 7 dias pós-isquemia, totalizando 21 dias consecutivos de tratamento. O grupo controle recebeu isquemia + água. O grau de lesão hipocampal na região CA1 foi analisado 8 dias após a isquemia. Nesses grupos, 15 minutos de 4-VO causou uma profunda neurodegeneração hipocampal ( $p < 0,001$ , Falso-isquêmico vs

isquêmico). Esse efeito neurodegenerativo da isquemia não foi modificado pelo tratamento com Tebonin®, independente da dose e duração do tratamento ( $p > 0,05$ , Tebonin vs água).

Na segunda parte, o EGb 761 foi usado na sua forma manufaturada original, ou seja, Extrato Seco Liofilizado. O EGb 761 (50 ou 150 mg/kg/dia, via oral) foi dado imediatamente antes da isquemia, e continuado pelos próximos 3 dias pós-isquemia, num regime de 3 doses/dia. A capacidade de aprendizagem e memória foi avaliada no teste do labirinto radial aversivo (LRA). Os efeitos do Extrato Seco Liofilizado sobre o desempenho de aquisição e retenção da memória foram medidos. No experimento de aquisição, os ratos foram treinados no LRA entre o 23º e 38º dias pós-isquemia (treinamento pós-cirurgia). No experimento de retenção, primeiramente os animais foram treinados por 10 dias e, então, submetidos à ICGT (treino pré-cirurgia), e o teste de retenção da cognição foi conduzido nos dias 31, 35 e 39 pós-isquemia. O desempenho de aprendizagem e memória é expresso (a) pela latência gasta pelo animal para encontrar a zona de recompensa (esconderijo), (b) número de erros de memória de referência, e (c) número de erros de memória operacional. A capacidade de aquisição e retenção foi marcadamente prejudicada pela ICGT ( $p < 0,001 - 0,05$ ). A dose de 50 mg/kg de EGb 761 não foi efetiva para reverter esse efeito da isquemia. Na dose de 150 mg/kg, contudo, o Extrato Seco Liofilizado reverteu completamente o déficit de aquisição, conforme expresso pelos parâmetros de latência e erros de referência ( $p < 0,01 - 0,05$ ), mas não de memória operacional. O Extrato Seco Liofilizado (150 mg/kg) reduziu também o déficit de retenção causado pela isquemia. Esse efeito, porém, não alcançou significância estatística. Diversamente do Tebonin®, o Extrato Seco Liofilizado reduziu a extensão da lesão hipocampal ( $p < 0,001 - 0,01$ ), um efeito que se sustentou pelo menos até 40 dias após a isquemia. Esses dados sugerem que o EGb 761 é eficaz em reduzir, pelo menos parcialmente, tanto os efeitos cognitivos quanto histológicos da ICGT. A ausência de efeito neuroprotetor

do Tebonin® não pode ser explicada no presente estudo, mas podemos especular que o regime de uma dose única por dia não deve ter sido suficiente para propiciar uma concentração adequada do EGb 761 no cérebro, pelo menos do rato.

Palavras-chave: Ratos, Isquemia cerebral, Tebonin®, EGb 761, Neuroproteção, Aquisição, Retenção, Labirinto Radial Aversivo.

## ABSTRACT

The standardized extract of *Ginkgo biloba* L., EGb 761, has been used to treat several SNC-related disorders, including those from hypoxic/ischemic nature. The antagonism of platelet activating factor (PAF) receptors and a reduction in PAF levels which increase during ischemia, as well as a potent antioxidative effect are believed to contribute to the neuroprotective properties of EGb 761. Neuroprotection by EGb 761 has also been demonstrated *in vivo* animal models of cerebral ischemia. However, there is a paucity of studies aiming to investigate whether EGb 761 could facilitate behavioral recovery from ischemic brain damage. In both young and old, intact animals, EGb 761 has been shown to improve cognitive performance measured in different behavioral testing. Therefore, in the present study, we used the rat 4-vessel occlusion model (4-VO) to evaluate the effects of EGb 761 on ischemia-induced hippocampal damage and learning/memory impairments. This study was divided in two parts. Firstly, EGb 761 was delivered as the commercial product Tebonin® (EGb 761, oral solution, 40 mg/ml), in doses of 10, 40 or 100 mg/kg/day, *p.o.*, for 14 days before ischemia. In other groups, Tebonin® was given at 40 or 100 mg/kg/day, for 14 days before plus 7 days after ischemia. The degree of hippocampal damage in the CA1 region was assessed 7 days after ischemia. Fifteen minutes 4-VO caused marked neurodegeneration ( $p < 0.001$ , sham vs. ischemic). However, Tebonin® failed to provide CA1 neuroprotection, whatever the treatment used ( $p > 0.05$ , Tebonin vs. water). In the second part of this study, the originally manufactured, dry extract form of EGb 761 (50 or 150 mg/kg/day) was given orally, starting before ischemia and continuing for up 3 days after ischemia. Learning and memory performances were assessed in a non-food motivated, aversive radial maze task. The effects of EGb 761 on acquisition (learning) and retention (memory) performances, were investigated. In the acquisition experiment, rats were rendered



ischemic, and 23 days later they were tested for acquisition performance (post-operative training). In the retention experiment, rats were trained for 10 days and then subjected to ischemia (pre-operative training); the retention of cognition was assessed on days 31, 35 and 39 after ischemia. Acquisition and retention performances were expressed by a) latency to find a goal box, b) number of reference memory errors, and c) number of working memory errors. TGCI markedly disrupted both acquisition and retention performance ( $p < 0.001 - 0.05$ ). EGb 761 (150 mg/kg) reversed acquisition impairment as measured by the parameters 'latency' and 'number of reference errors' when performance was examined across sessions ( $p < 0.01 - 0.05$ ). However, EGb 761 did not statistically reduce the effects of TGCI on the parameter 'working memory errors' (across session and total). At 50 mg/kg, EGb 761 did not affect ischemia-induced acquisition impairment at all. The retention deficit caused by ischemia was not statistically reduced by EGb 761 (150 mg/kg), whatever examined across session or as total. EGb 761, given as the dry extract, reduced the extent of hippocampal CA1 cell loss ( $p < 0.01-0.001$ ), an effect sustained at least up to 40 days after ischemia. These findings show that EGb 761 is effective in reducing, at least partially, both the cognitive impairments and hippocampal damage after TGCI in rats, and suggest that its effect on behavioral recovery may be dissociated from the neuroprotective effect on the hippocampus. The failure of Tebonin® in protecting hippocampal cell from ischemia-induced neurodegeneration can not be explained from the present study, but we have hypothesized that one dose /day may not be sufficient to afford a sustained and adequate concentration of EGb 761 into the brain, at least in the rat.

Key Words: Rats, Cerebral ischemia, Tebonin®, EGb 761, Neuroprotection, Aversive radial maze.

# SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	10
1.1 – CONSIDERAÇÕES HISTÓRICAS E BOTÂNICAS .....	10
1.2 CONSIDERAÇÕES QUÍMICAS. ....	11
1.3 CONSIDERAÇÕES FARMACOLÓGICAS.....	13
1.3.1 EFEITOS DO EGb 761 SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) ....	14
1.3.2 – ISQUEMIA.....	18
2.0 OBJETIVO .....	21
3.0 MÉTODOS.....	21
3.1 ANIMAIS.....	21
3.2 INDUÇÃO DA ISQUEMIA .....	22
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	24
3.3.1 Efeitos do TEBONIN® sobre a neurodegeneração hipocampal induzida pela ICGT .....	24
3.3.2 Efeitos do Extrato Seco Liofilizado sobre a neurodegeneração hipocampal e distúrbios cognitivos induzidos pela ICGT .....	25
3.4 ANÁLISE COMPORTAMENTAL .....	26
3.4.1 APARELHO DE TESTE .....	26
3.4.2 PROCEDIMENTO DE TESTE .....	27
3.4.2.1 TESTE DE AQUISIÇÃO.....	28
3.4.2.2 TESTE DE RETENÇÃO .....	30
4.0 HISTOLOGIA.....	31
5.0 ESTATÍSTICA.....	32
7.0 RESULTADOS .....	33
7.1 Efeitos do Tebonin® .....	33
7.2 Efeitos do Extrato Seco Liofilizado.....	34
7.2.1 Aquisição .....	34
7.2.2 Retenção .....	37
7.2.3 Efeito Histológico do Extrato Seco Liofilizado .....	39
8.0 DISCUSSÃO.....	41
9.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48

# 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 – CONSIDERAÇÕES HISTÓRICAS E BOTÂNICAS

Originária da China, a árvore *Ginkgo biloba* L. é considerada uma das espécies vivas mais antigas, não tendo aparentemente relação com nenhuma outra planta viva da mesma espécie. Dada a sua antiguidade, tem sido considerada um fóssil vivo, hipótese esta sustentada pelos achados fósseis de partes da planta em rochas que datam de mais de 200 milhões de anos. Tem como características ser bastante alta, medindo entre 20 a 30 metros de altura, viver por um tempo extremamente longo (> 1000 anos), e ter folhas divididas em dois lobos distintos, daí a denominação “biloba”. As principais razões para um período tão longo de sobrevivência incluem: resistência a bactérias, fungos e vírus (relacionados às propriedades inseticida e fungicida da planta), sua alta capacidade de adaptação a diferentes ambientes e o longo tempo de vida entre suas gerações, o que diminui a possibilidade de mutações genéticas (Defeudis, 1998; The Complete German Commission E Monographs, 1998; McGovern e Barkley, 1999; Oken et al., 1998). A Figura 1 ilustra partes aéreas da planta.



**Figura 1** – Folhas e fruto da árvore *Ginkgo biloba* L. (WIKIPÉDIA. A enciclopédia livre).

O uso de sementes da *Ginkgo biloba L.* foi mencionado pela primeira vez no herbário da Dinastia Yan, e publicado em 1350 d. C. A árvore *Ginkgo biloba L.* foi descrita pela primeira vez pelo médico alemão Engelbert Kaelmpter, por volta de 1690 (WIKIPÉDIA. A enciclopédia livre). Em 1771, Lineu a classificou taxionomicamente em (The Plants Database, 2000):

Reino: ***Plantae***  
Sub-reino: ***Tracheobionta***  
Super-divisão: ***Spermatophyta***  
Divisão: ***Ginkgophyta***  
Classe: ***Ginkgoopsida***  
Ordem: ***Ginkgoales***  
Família: ***Ginkgoaceae***  
Gênero: ***Ginkgo L***  
Espécie: ***Ginkgo biloba L.***

Somente após a Segunda Guerra Mundial os pesquisadores passaram a se interessar pela planta *Ginkgo biloba L.*, quando perceberam que a mesma tinha sobrevivido à radiação em Hiroshima, brotando no solo da cidade devastada (Defeudis, 1998; WIKIPÉDIA. A enciclopédia livre.).

## **1.2 CONSIDERAÇÕES QUÍMICAS.**

O EGb 761 é um extrato padronizado obtido a partir das folhas da *Ginkgo biloba L.*, as quais passam por 18 processos de extração e purificação, visando principalmente à eliminação de algumas substâncias consideradas tóxicas, como por exemplo, os ácidos ginkgólicos, causadores de sérias reações alérgicas. (Defeudis, 1998; McGovern e Barkley, 1999). Dentre

as principais classes de compostos presentes no EGb 761 destacam-se os flavonóides, proantocianidias, terpenóides e ácidos orgânicos. O EGb 761 contém aproximadamente 24% de flavonóides glicosídeos e 6% de terpeno lactonas (2,8 – 3,4% ginkgolideos A, B e C, e 2,6 – 3,2% de bilobalideo) (Defeudis, 1998; The Complete German Comission E Monographs, 1998, Biber, 2003). As estruturas químicas das frações flavonóide, ginkgolideo e bilobalideo são mostradas nas figuras 2 e 3.

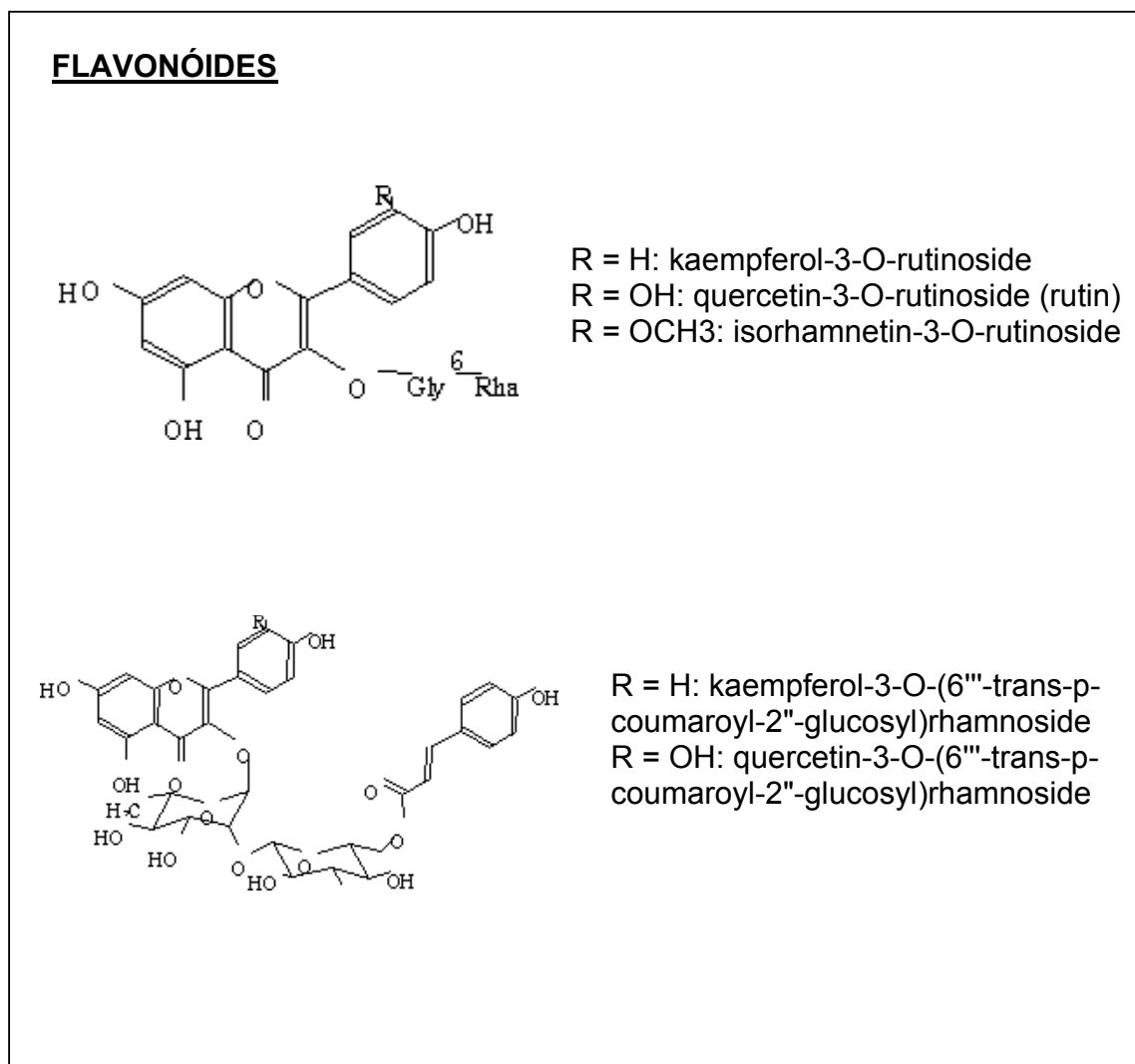
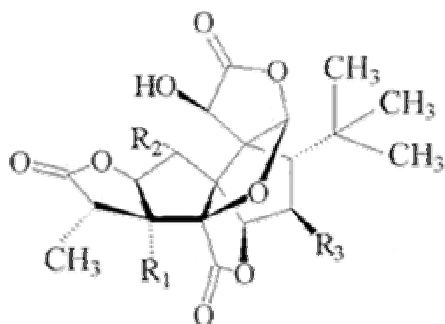


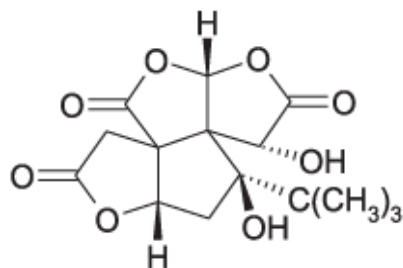
Figura 2. Estrutura química dos principais flavonóides presentes nas folhas da *Ginkgo biloba* L (Biber, 2003).

## TERPENÓIDES



	R1	R2	R3
A	OH	H	H
B	OH	OH	H
C	OH	OH	OH

### **Ginkgolídeo (A, B e C)**



### **Bilobalídeo**

Figura 3. Estrutura química dos principais terpenóides (ginkgolídeos e bilobalídeo) presentes nas folhas da *Ginkgo biloba* L (Biber, 2003).

## **1.3 CONSIDERAÇÕES FARMACOLÓGICAS.**

O uso de plantas, extrato de plantas ou compostos químicos derivados de plantas para o tratamento de doenças é uma modalidade terapêutica que tem sido testada ao longo dos anos. Atualmente muitas classes farmacológicas de drogas incluem protótipos de produtos naturais descobertos a partir de estudos sobre o uso de remédios populares. As evidências mostram que plantas medicinais contêm combinações sinérgicas e/ou neutralizadoras de efeitos adversos (Gilani e Rahman, 2005), como ocorre com algumas plantas que produzem efeitos

farmacológicos significantes quando usadas na forma de extrato. O mesmo não ocorre, porém, quando seus constituintes são usados ou testados isoladamente. Apesar de atualmente se conhecer mais sobre as frações e os mecanismos responsáveis pelo resultado terapêutico do EGb 761, deve-se ter cautela quando tais atividades são atribuídas a um dos componentes isoladamente, pois o mesmo efeito pode não ser observado quando o extrato total é administrado *in vivo* (Sticher, 1993; Defeudis, 1998).

### **1.3.1 EFEITOS DO EGb 761 SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)**

Embora as propriedades do EGb 761 em melhorar as funções cognitivas em seres humanos não estejam conclusivamente estabelecidas, vários estudos em animais fornecem evidências de sua utilidade clínica. Por exemplo, em camundongos submetidos a um teste de condicionamento para obtenção de alimento (recompensa), o tratamento com EGb 761 (100 mg/kg/dia), dado por via oral durante 4 a 8 semanas antes do treino, melhorou o desempenho do animal para a realização da tarefa. Os mesmos animais continuaram recebendo o EGb 761 por mais 10 semanas após o término do teste de aquisição, sendo então, testados para a capacidade de retenção (consolidação) da cognição adquirida durante o treinamento. Sobre este parâmetro (consolidação da memória) o EGb 761 também se mostrou eficaz (Winter, 1989). Resultados semelhantes foram obtidos em ratos submetidos ao teste do labirinto radial de 8 braços para medição da capacidade de aprendizagem e memória espacial. Quando administrado logo após o término de cada sessão de treinamento, o EGb 761 (50 mg/kg) não alterou o desempenho de aquisição. Entretanto, os animais que receberam EGb 761 antes das sessões de treinamento cometeram um menor número de erros, indicando uma aquisição mais rápida da tarefa (Winter, 1998). Cohen-Salmon et al. (1997) examinaram os efeitos do EGb 761 (40 mg/kg/dia, i.p) na performance de camundongos jovens e idosos no teste de aprendizado do labirinto em cruz elevado. Observou-se que a performance dos animais foi

melhorada somente enquanto o tratamento com EGb 761 foi mantido durante o treino (os 3 primeiros dias). Após a interrupção do tratamento (a partir do 4º dia de treino), o desempenho dos animais voltou ao nível do grupo controle. Em conjunto, esses estudos sugerem que o EGb 761 deve agir facilitando as funções de aprendizagem e memória. Estudos recentes dão suporte a esta hipótese. Wang et al. (2006) demonstraram em ratos idosos que o EGb 761 (60 mg/kg/dia, durante 30 dias) melhorou o desempenho dos animais no teste do labirinto aquático de Morris e, paralelamente, aumentou a magnitude da potencialização de longo prazo (LTP, “long-term potentiation”), parâmetro este considerado representar um correlato sináptico, eletrofisiológico do processo de aprendizagem e memória (Shen et al., 1994). Outros estudos conduzidos em animais de laboratório suportam a hipótese de que o EGb 761, de fato, pode ser útil no tratamento de distúrbios cognitivos no ser humano (para revisão ver MacLennan et al., 2002).

Entretanto, se os resultados obtidos em animais de experimentação podem ser seguramente trasladados para humanos, não está devidamente esclarecido. Até o presente momento, relativamente poucos estudos clínicos bem controlados têm sido realizados para examinar a eficácia do EGb 761 em melhorar a capacidade cognitiva em seres humanos saudáveis (MacLennan et al., 2002). Segundo esses autores, talvez o estudo mais bem planejado para investigar os efeitos do EGb 761 sobre as funções neuropsicológicas em adultos cognitivamente intactos foi conduzido por Mix e Crews (2000). Indivíduos com idade entre 55 e 86 anos que preencheram os quesitos mínimos de atividade cognitiva (“Mini-Mental State Examination”), o tratamento com EGb 761 (180 mg), dado diariamente durante 6 semanas, melhorou significativamente a capacidade cognitiva, além de propiciar aos indivíduos tratados uma habilidade maior para relatar o benefício experimentado. Estes dados



sugerem que um tratamento de curto prazo com EGb 761 pode auxiliar no progresso de algumas funções cognitivas em pessoas idosas que não foram cognitivamente prejudicadas.

Uma outra propriedade atribuída ao EGb 761 é seu efeito neuroprotetor, ou seja, sua capacidade em proteger o cérebro contra os danos estruturais e funcionais resultantes de situações estressantes. Dentre estas, destacam as condições de hipóxia e/ou isquemia cerebral. A diminuição ou interrupção, ainda que breve, no aporte de oxigênio e nutrientes (normalmente glicose) ao cérebro desestrutura os vários sistemas bioquímicos inerentes à sobrevivência celular. Tem sido demonstrado que o tratamento com EGb 761 aumenta o fluxo sanguíneo cerebral e preserva o metabolismo energético celular após um evento hipóxico/isquêmico (Le Poncin Lafitte et al., 1980; Karcher et al., 1984; Janssens et al., 1995; Pierre et al., 1999). Kriegstein et al. (1986) investigaram os efeitos de uma dose única de EGb 761 (130 mg/kg), dado por via intravenosa (i.v.) sobre o fluxo sanguíneo cerebral e utilização da glicose pelo cérebro de animais intactos. O EGb 761 aumentou o fluxo cerebral em 50-100% na maioria das áreas cerebrais examinadas. Enquanto os níveis sanguíneos de glicose aumentaram, o EGb 761 não alterou a utilização cerebral de glicose local. Além disso, investigando as mudanças induzidas pelo EGb 761 na atividade metabólica do SNC, Duverger et al. (1995) mediram a utilização cerebral de glicose após o tratamento repetido com EGb 761. Ratos receberam 50 ou 150 mg/kg/dia de EGb 761 via oral por 15 dias. No final deste período, a utilização de glicose foi medida em 49 estruturas do SNC. O EGb 761 produziu mudanças de leve à moderada na utilização da glicose na maioria das estruturas do SNC. Outro efeito metabólico do EGb 761 é contra a diminuição do ATP em condições de hipóxia, onde se propõe que este efeito seja devido à estabilização e proteção da atividade respiratória em nível mitocondrial (Janssens et al., 1995; Eckert et al. 2005). O pré-tratamento com EGb 761 (100 mg/kg/dia, via oral) por 10 dias demonstrou um efeito protetor contra a diminuição

da atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase após isquemia em camundongos (Pierre et al., 1999). Num outro estudo, o EGb 761 reduziu a decomposição fosfolipídica da membrana desencadeada pela hipóxia no hipocampo em ratos (Scremin e Jenden, 1989; Rothman e Olney, 1995; Klein et al., 1997). O desequilíbrio na produção de espécies reativas oxigênio/nitrogênio (radicais livres) está envolvido na fisiopatologia da injúria cerebral isquêmica seguida de reperfusão. A morte de células neuronais devido ao estresse oxidativo (quando se tem mais oxidantes que antioxidantes) tem sido implicada nos distúrbios de origem isquêmica, na injúria cerebral traumática, na doença de Alzheimer e na doença de Parkinson (Sastre et al., 1998; Ishige et al., 2001). Vários estudos têm demonstrado que o EGb 761 é um composto antioxidante multifuncional que pode efetivamente proporcionar proteção contra o estresse oxidativo, atenuando a modificação protéica e lipoperoxidação, culminando num efeito neuroprotetor (Marcocci et al., 1994a; Ramassamy et al., 1995; Sastre et al., 1998; Urikova et al. 2006). Oyama et al. (1992) examinaram os efeitos do EGb 761 sobre os níveis de peróxido de hidrogênio (método do 2',7'-dichlorofluorescein, DCFH) em neurônios cerebelares. O EGb 761 reduziu a oxidação do DCFH a DCF, e tem sido mostrado ter efeito similar em neurônios com sobrecarga de íons  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Oyama et al., 1994). Em um estudo posterior, o EGb 761 mostrou aumentar a viabilidade de células neuronais sobre o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (Oyama et al., 1996). O efeito antioxidante do EGb 761 foi consistentemente demonstrado em diferentes modelos de estresse oxidativo, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Marcocci et al. 1994b; Maitra et al., 1995; Kobuchi et al., 1997; Bastianetto et al., 2000). Uma inibição direta da atividade enzimática da óxido nítrico-sintetase também foi observada, sugerindo que o EGb 761 suprime a produção de óxido nítrico através de vários processos. Desta forma, estes estudos de natureza bioquímica fornecem subsídios sobre as propriedades neuroprotetoras do EGb 761 em condições de hipóxia/isquemia cerebral.

### 1.3.2 – ISQUEMIA

A lesão isquêmica do cérebro acarreta, via de regra, importantes disfunções neuropsicológicas, principalmente na esfera cognitiva da aprendizagem e memória (Cummings et al., 1984; Zola-Morgan et al. 1986; Petito et al., 1987, Sudo et al., 2001, Peskine et al., 2004; Lim et al., 2004). Condições de hipóxia ou isquemia cerebral ocorrem frequentemente como resultado, por exemplo, de uma parada cardíaca reversível, ou então após um quadro hipotensivo grave. Insuficiência cardíaca congestiva, ou ainda disritmia cardíaca são também capazes de levar a um quadro de encefalopatia hipóxica/isquêmica (Garcia et al., 1993). Em humanos vítimas de colapso cardiopulmonar, uma síndrome de amnésia tem sido descrita (Volpe et al., 1983; Cummings et al., 1984; Lim et al., 2004, Peskine et al., 2004). Alguns pacientes tornam-se severamente incapacitados, manifestando a síndrome comportamental do lobo frontal, a qual compreende dificuldades na realização de tarefas executivas (raciocínio, planejamento, tomada de decisões), persistência em um determinado erro, e déficit de memória (Peskine et al., 2004). A perseverança recorrente, definida como a repetição de um comportamento anterior, compreende um dos vários sintomas comportamentais da síndrome isquêmica do lobo frontal em humanos (Bogousslavsky, 1994). Esta síndrome tem sido caracterizada como uma combinação de disfunções cognitivas, executivas e motoras, e não como um efeito residual isolado da parada cardiocirculatória (Lim et al., 2004).

Alguns aspectos estruturais e comportamentais observados em seres humanos vítimas de colapso cardiocirculatório reversível podem ser reproduzidos em modelos animais de isquemia cerebral global e transitória (ICGT). Nestes modelos, observam-se não só lesões neuronais em certas regiões altamente vulneráveis aos efeitos da isquemia, a exemplo do hipocampo, como também ocorrem alterações comportamentais que se expressam

preponderantemente por um déficit de aprendizagem e memória, o qual pode estar relacionado, pelo menos parcialmente, à lesão neuronal do hipocampo, especificamente (Nun e Hodges 1994; Bachevalier e Meunier, 1999). Para avaliar experimentalmente os efeitos da isquemia cerebral sobre a capacidade de aprendizagem e memória em ratos, dois testes têm sido amplamente utilizados e descritos na literatura, ou seja, o Labirinto Aquático de Morris e o Labirinto Radial de 8-Braços, os quais são particularmente sensíveis aos efeitos cognitivos decorrentes da lesão hipocampal (para revisão ver Hodges, 1996). Recentemente, uma versão modificada do labirinto radial foi desenvolvida em nosso laboratório para investigar os efeitos cognitivos da isquemia cerebral e os efeitos de drogas em reduzir as seqüelas cognitivas observadas em ratos (Paganelli et al., 2004; Benetoli et al., 2004; Neto et al., 2005).

A hipótese de que o EGb 761 pode ser útil para o tratamento contra os efeitos neurodegenerativos da isquemia cerebral tem sido baseada principalmente em efeitos bioquímicos que podem estar diretamente envolvidos na patofisiologia da injúria cerebral isquêmica. Tais efeitos incluem: a) o antagonismo dos receptores do fator ativador de plaquetas (PAF) (Braquet et al., 1991), bem como uma redução no nível de PAF, que se encontra elevado durante a isquemia (Akisu et al., 1998); b) redução do dano oxidativo da membrana da célula (Seif-El-Nasr et al., 1995); c) normalização do metabolismo fosfolipídio de membrana, alterado pela isquemia (Rabin et al., 1998); d) normalização da atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$  de membrana (Pierre et al., 1999); e e) inativação dos radicais livres derivados do óxido nítrico (NO) (Bastianetto et al., 2000; Calapai et al., 2000).

Entretanto, a suposta utilidade do EGb 761 como uma estratégia neuroprotetora tem sido demonstrada mais diretamente em modelos animais *in vivo* de isquemia cerebral. Em modelos de isquemia cerebral focal, tanto em ratos quanto em camundongos, o EGb 761 tem demonstrado, na avaliação morfométrica, ser capaz em reduzir o tamanho do infarto

(Krieglstein, et al., 1995; Clark et al., 2001; Ünal et al., 2001, Lee et al., 2002). Resultados similares têm sido obtidos em modelos de isquemia cerebral global e transitória (ICGT) conduzidos em gerbil (Calapai et al., 2000; Chandrasekaran et al., 2001) ou em ratos (modelo de oclusão dos 4-vasos, 4-VO) (Hrehorovská et al., 2004). No modelo que combina oclusão das artérias carótidas e hipotensão (modelo 2-VO + hipotensão) em ratos, os efeitos do EGb 761 não foram confirmados (Krieglstein, et al., 1995).

Apesar dos resultados bioquímicos e morfométricos descritos anteriormente sustentarem um suposto uso terapêutico do EGb 761 para o tratamento da isquemia cerebral, a eficácia do EGb 761 em conservar e/ou promover a recuperação funcional (comportamental) após a lesão isquêmica cerebral induzida experimentalmente não foi suficientemente investigada. Aparentemente, apenas dois estudos reportam o efeito protetor do EGb 761 nas alterações comportamentais induzidas pela isquemia. No primeiro, um extrato não padronizado de *Ginkgo biloba L.*, assim como sua fração flavonóide, reduziram o efeito amnésico induzido pela isquemia focal em camundongos submetidos ao teste de esquiva passiva inibitória, 48 horas após isquemia. Entretanto, a avaliação morfométrica do dano cerebral não foi relatada (Tadano et al., 1998). Mais tarde, foi demonstrado que o tratamento com o EGb 761 reduziu o déficit de memória, medido no teste do labirinto radial, em ratos submetidos à hipoperfusão cerebral crônica (modelo 2-VO permanente) (Lin et al., 2003).

Entretanto, a eficácia do EGb 761 na redução dos déficits comportamentais causados pela ICGT, em ratos, nunca foram investigados.

Portanto, estudos adicionais são necessários para estabelecer, de modo mais seguro, se o extrato da *Ginkgo biloba L.*, EGb 761, exerce efeito neuroprotetor em modelos animais, *in vivo*, de isquemia cerebral.

## **2.0 OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia do extrato padronizado da *Ginkgo biloba* L., EGb 761, na redução da perda neuronal no hipocampo e os efeitos neurodegenerativos e comportamentais da ICGT, induzida conforme o modelo de oclusão dos 4 vasos (4-VO) em ratos.

Esse estudo foi dividido em duas partes. Na primeira parte, utilizou-se uma preparação farmacêutica contendo o EGb 761, isto é, o medicamento TEBONIN®. Neste experimento, avaliou-se se o TEBONIN® administrado em diferentes doses e por diferentes tempos poderia reduzir a neurodegeneração induzida pela ICGT na região CA1 do hipocampo. Na segunda parte, o EGb 761 foi administrado na sua forma manufaturada original, ou seja, como EXTRATO SECO LIOFILIZADO.

Nesta série de experimentos, parâmetros histológicos e comportamentais (cognitivos) foram quantificados. A seqüência experimental adotada se deu com base na disponibilidade do EGb 761 e na obtenção dos resultados. Não foi o objetivo desse estudo comparar os resultados do Tebonin® com aqueles do Extrato Seco Liofilizado.

## **3.0 MÉTODOS**

### **3.1 ANIMAIS**

Foram usados ratos Wistar, adultos, pesando entre 270-300 g. Os animais foram alojados em caixas de plástico (39 x 33 x 16 cm) em grupos de três ou quatro, a temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ \text{C}$ ). O ciclo de luz (claro/escuro) foi controlado automaticamente e mantido em 12h, sendo as luzes acesas as 07:00 horas. A renovação de ar atmosférico foi mantida constante através de um exaustor. Comida e água foram oferecidas à vontade.

### **3.2 INDUÇÃO DA ISQUEMIA**

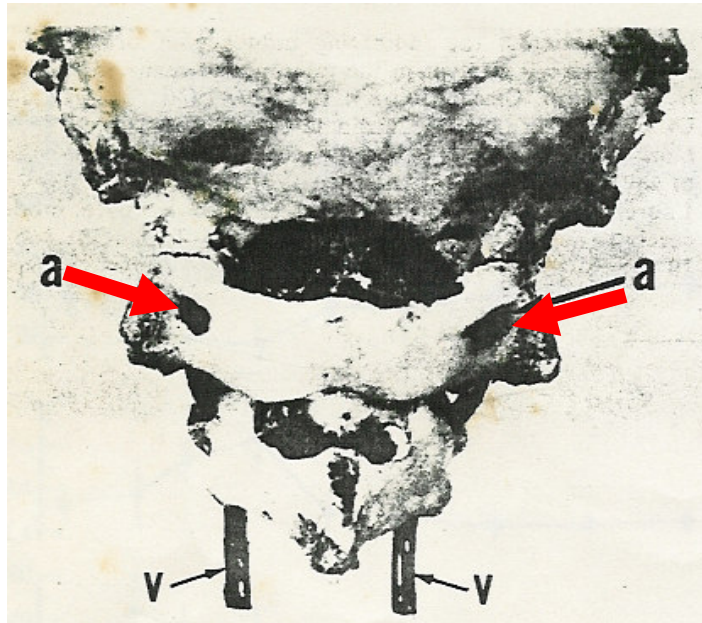
Sob anestesia com éter, os animais foram fixados a uma base estereotática e uma incisão de 2 cm na região dorsal da cervix expôs o forame alar da primeira vértebra cervical. Usando a ponta do eletrocautério introduzida no forâmen, a artéria vertebral foi primeiramente rompida e em seguida eletrocauterizada bilateralmente. A incisão foi suturada e o animal colocado na posição supina. Uma segunda incisão, na parte ventral do pescoço, expôs as artérias carótidas comuns, as quais foram separadas do tecido adjacente e do nervo vago.

Um fio de seda foi então transpassado de modo a envolver ambas as artérias carótidas. As extremidades do fio foram exteriorizadas e presas ao dorso do animal com um ponto de sutura. Após recuperação da anestesia (5 a 6 horas após o término das cirurgias), os animais foram submetidos à oclusão das artérias carótidas por um período de 15 minutos, mediante o tracionamento do fio de seda. A Figura 4 ilustra os pontos de oclusão das artérias vertebrais e carótidas, para a indução da isquemia cerebral global e transitória.

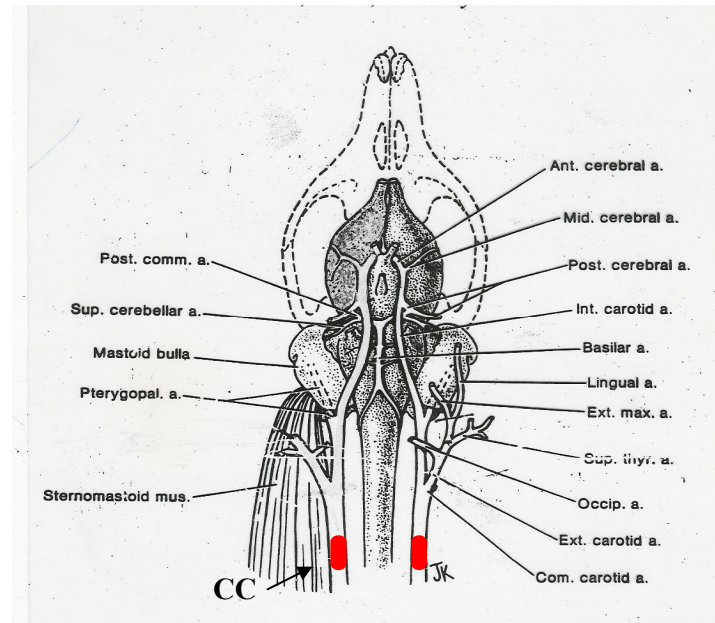
A perda do reflexo de endireitamento durante o tempo de oclusão, a ausência de resposta do animal ao toque não doloroso, o desenvolvimento de midríase, e a extensão tônica das patas foram considerados como sinais indicativos de uma isquemia cerebral efetiva.

Completado o período de oclusão, o fio de seda foi afrouxado e removido, permitindo a reperfusão cerebral através das artérias carótidas. Durante todo o período de oclusão bem como durante a primeira hora pós-reperfusão, a temperatura retal foi monitorada com o auxílio de um termômetro digital (Minipa, APPA MT-520, São Paulo, São Paulo, Brasil), cujo sensor foi introduzido a uma profundidade de aproximadamente 6 cm no reto.

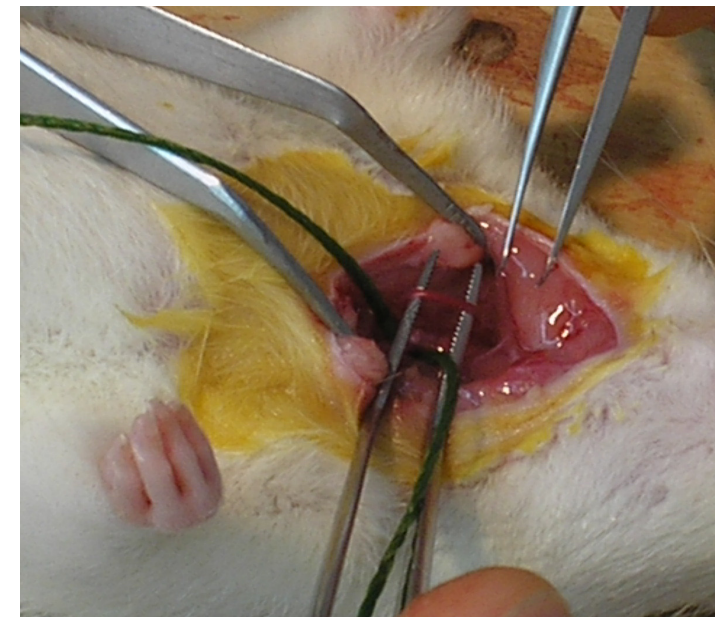
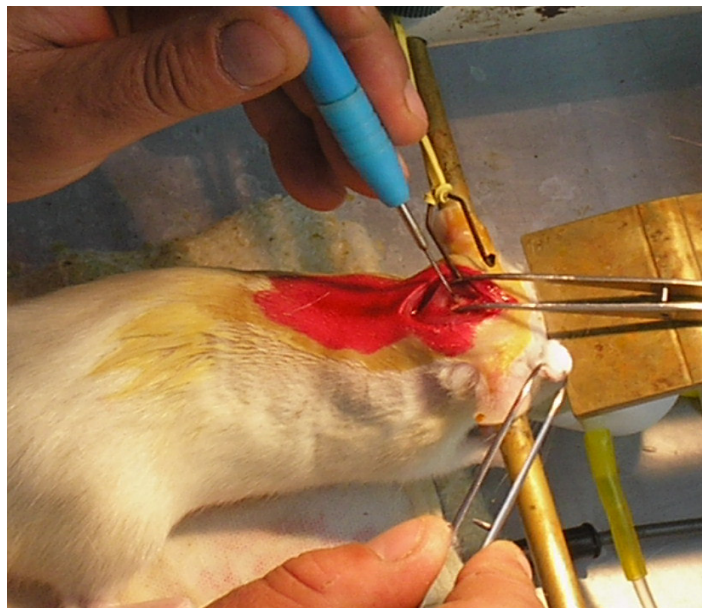
Os animais controle para a isquemia (falso-operados) foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, exceto a oclusão das artérias vertebrais e carótidas.



(Mod. from Pulsinelli & Brierley – Stroke 1979;10(3):267-272).



(Mod. from Longa et al. – Stroke 1989;20:84-91).



**Figura 4 – Ilustrações esquemáticas e fotográficas do procedimento cirúrgico para oclusão das artérias vertebrais (V) (lado esquerdo) e das artérias carótidas comuns (CC) (direita). O acesso às artérias vertebrais é feito através do forame alar (a) localizado na primeira vértebra cervical.**



### **3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

#### **3.3.1 Efeitos do TeBONIN® sobre a neurodegeneração hipocampal induzida pela ICGT**

Os seguintes grupos experimentais foram preparados, conforme os tratamentos cirúrgico e farmacológico recebidos:

Grupo 1: Falso-isquêmico (nenhum tratamento farmacológico)

Grupo 2: Isquemia + Veículo (água)

Grupo 3: Isquemia + Tebonin 10 mg/kg

Grupo 4: Isquemia + Tebonin 20 mg/kg

Grupo 5: Isquemia + Tebonin 40 mg/kg

Grupo 6: Isquemia + Tebonin 40 mg/kg

Grupo 7: Isquemia + Tebonin 100 mg/kg

O tratamento com Tebonin® foi dado por via oral, com o auxílio de uma cânula de gavagem. Para os grupos 2 a 5, Tebonin® ou veículo foram dados 1 vez ao dia, durante 14 dias antes da isquemia, sendo a última dose administrada 30 minutos antes da isquemia. Nos grupos 6 e 7, Tebonin® foi administrado também 1 vez/dia, mas agora, por um período de 14 dias antes da isquemia seguido por mais 7 dias após a isquemia, inclusive no dia da isquemia.

Para cada dose, o produto Tebonin® foi diluído na proporção 1:10 ou 4:10 com água destilada, conforme a necessidade; o volume administrado variou entre 0,6 a 0,96 mL de acordo com o peso do animal. O grupo controle recebeu água destilada em volume correspondente ao peso. Tebonin® ou água destilada foram administrados entre 17:00 e 18:00 horas. Nesta série de experimentos, os animais foram sacrificados 8 dias após serem submetidos à isquemia. O produto comercial Tebonin® foi fornecido gratuitamente pela indústria Farmacêutica AltanaPharma, São Paulo, Brasil.

### **3.3.2 Efeitos do Extrato Seco Liofilizado sobre a neurodegeneração hipocampal e distúrbios cognitivos induzidos pela ICGT**

Para o experimento de AQUISIÇÃO, os animais foram alocados aleatoriamente em quatro grupos, conforme os tratamentos cirúrgico e farmacológico:

Grupo 1: Falso-isquêmico (nenhum tratamento farmacológico)

Grupo 2: Isquemia + Veículo

Grupo 3: Isquemia + EGb 761 (50 mg/kg)

Grupo 4: Isquemia + EGb 761 (150 mg/kg).

Para o experimento de RETENÇÃO, os seguintes tratamentos foram aplicados:

Grupo 1: Falso-isquêmico (nenhum tratamento farmacológico)

Grupo 2: Isquemia + Veículo

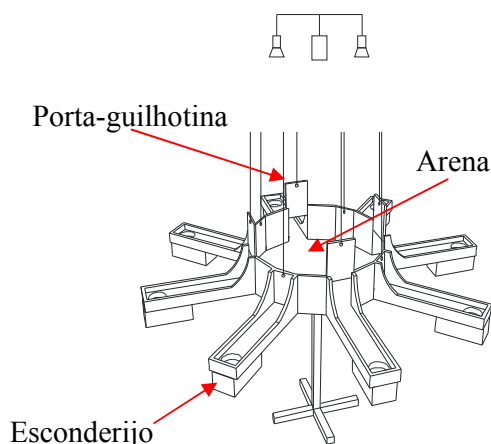
Grupo 3: Isquemia + EGb 761 (150 mg/kg)

Para a preparação da solução a ser administrada oralmente, uma alíquota do Extrato Seco foi pesada e solubilizada em uma mistura de 30% de polietilenoglicol (PEG400) e água destilada. Ratos submetidos à ICGT receberam a solução do Extrato Seco Liofilizado nas doses de 50 ou 150 mg/kg, por via oral. A primeira dose foi administrada imediatamente antes da isquemia, sendo a segunda dose administrada 4 horas mais tarde. O tratamento continuou durante os 3 dias seguintes, em um regime de 3 doses/dia, administradas no período diurno, por volta das 08:00, 13:00 e 17:30 horas. Para cada dia de tratamento, uma nova solução do Extrato Seco foi preparada. Durante todo o período de estudo, o Extrato Seco Liofilizado foi conservado sob refrigeração (4°C) e devidamente lacrado. O Extrato Seco Liofilizado, EGb 761, foi doado pela Schwabe Extract GmbH & Co, KG, Karlsruhe, Alemanha, mediante intermediação da indústria Farmacêutica AltanaPharma Co., São Paulo, Brasil.

### 3.4 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

#### 3.4.1 APARELHO DE TESTE

A Figura 5 ilustra um desenho do labirinto radial aversivo (LRA), originalmente desenvolvido no Laboratório de Isquemia Cerebral e Neuroproteção (Paganelli et al., 2004) e posteriormente aperfeiçoado (Neto et al, 2005).



**Figura 5 – Desenho esquemático do LRA (Neto et al., 2005).**

O teste do LRA se baseia no comportamento natural do rato em se esquivar de um ambiente amplamente aberto e iluminado, e buscar um esconderijo escuro, estreito e seguro. Os oito braços do equipamento (55 cm x 15 cm) se estendem radialmente a partir dos lados alternados de uma arena poligonal (16 lados, 71 cm lado-a-lado). Na extremidade distal de cada braço, uma abertura circular (9 cm de diâmetro) permite ao animal o acesso à zona de recompensa, representada por um esconderijo. Este é constituído por uma caixa de madeira (23 x 11 x 9,5 cm) que pode ser inserida e removida como uma gaveta na face inferior do braço (ver Figura 5). Dos oito braços, porém, somente um contém o esconderijo verdadeiro, ou seja, além das paredes, ele contém um fundo, o que permite que o animal desça da superfície do braço para o interior do esconderijo e ali se sinta protegido. Os demais

esconderijos são falsos, apenas uma imitação externa (paredes) do esconderijo verdadeiro, ou seja, eles possuem paredes, mas não possuem o fundo. Assim, o animal pode chegar até o orifício e inspecionar o esconderijo, sem, contudo, adentrá-lo.

Paredes de acrílico transparente (2,5 cm altura) erguem-se das laterais de cada braço individual, cuja finalidade é prevenir a eventual queda do animal. Cada braço do labirinto é separado da arena central por uma porta-guilhotina de acrílico transparente (19 cm de altura).

O labirinto encontra-se elevado a 90 cm do solo podendo ser girado livremente sobre sua base de sustentação. Varias pistas extra-labirinto (exemplo, cartazes nas paredes, uma porta fechada, uma janela e alguns objetos tridimensionais) encontram-se dispostas na sala de teste, sendo a posição das mesmas mantidas constante durante todo o experimento. Um pequeno circulador de ar localizado no chão gera um ruído constante na sala de teste por todo período experimental. Duas lâmpadas incandescentes (200 W cada), e um par de lâmpadas de halogênio (40 W cada) encontram-se fixadas no teto da sala, 180 cm do labirinto. Uma câmera de vídeo encontra-se posicionada a 220 cm de distancia, e 130 cm acima do labirinto para registro do comportamento do animal e auxílio do experimentador na condução do experimento. A operação de abrir e fechar as portas-guilhotina para confinar e liberar o animal é efetuada pelo experimentador que se encontra localizado em uma sala anexa, mediante um sistema de cordas e roldanas conectadas a cada porta-guilhotina individualmente.

### **3.4.2 PROCEDIMENTO DE TESTE**

A tarefa do rato no LRA é encontrar o esconderijo, aprender e memorizar sua localização espacial em função do treinamento recebido. Durante a fase de treino, dois processos cognitivos ocorrem de modo interdependente, ou seja, aquisição e retenção da informação. O processo de aquisição refere-se mais especificamente aos mecanismos envolvidos na obtenção

e processamento da informação, enquanto o processo de retenção compreende os mecanismos envolvidos no armazenamento daquela informação e consolidação da mesma na forma de memória. Embora se considere que aquisição e consolidação sejam um contínuo de um mesmo processo mnemônico (McGough, 2000), há evidências de que se tratam de processos separados e independentes (Zach et al., 2005). Não é o escopo desse estudo, contudo, discorrer sobre os processos e mecanismos intrínsecos à função de aprendizagem e memória.

### **3.4.2.1 TESTE DE AQUISIÇÃO**

Aqui, os ratos foram primeiramente submetidos à isquemia e, simultaneamente, ao tratamento farmacológico (ver delineamento experimental, item 3.3). Vinte dias após a isquemia, deu-se início ao teste de aquisição. Inicialmente, os animais foram habituados (ou familiarizados) ao ambiente de teste. Para tanto, cada animal foi colocado diretamente na arena central do labirinto e permitidos a explorar o labirinto livremente, inclusive para encontrar e entrar no esconderijo. Se o esconderijo não era encontrado após um período de 4 minutos, o rato era conduzido pelo experimentador até o braço contendo o esconderijo, e gentilmente “forçado” a adentrá-lo. Ao rato foi permitido permanecer no esconderijo por 1 minuto, após o que ele foi retornado ao alojamento.

Durante a habituação, as pistas extra-labirinto foram removidas e a posição espacial do esconderijo era aleatoriamente alterada entre um animal e outro dentro da mesma sessão. Este procedimento de habituação foi repetido por 3 dias, isto é, nos dias 20, 21 e 22 pós-isquemia. No 23º dia, as pistas extra-labirinto foram recolocadas e o treinamento para aquisição da tarefa foi iniciado. O animal foi treinado durante 15 dias consecutivos (1 dia = 1 sessão), sendo que em cada sessão a ele foram dadas três tentativas. No início de cada sessão (dia), o rato era colocado no centro da arena e confinado na mesma por um período de 30 segundos (primeira tentativa), após o que todas as portas-guilhotina eram abertas simultaneamente

dando-lhe acesso para explorar os braços radiais do labirinto. Ao entrar num braço falso (sem o esconderijo verdadeiro), todos os outros eram imediatamente fechados, menos o visitado, permitindo assim o seu retorno para a arena central onde ele era novamente confinado pelo período 10 segundos (“delay time”). Passado este tempo, as portas-guilhotina eram novamente suspensas permitindo uma outra escolha, ainda dentro da mesma tentativa, e assim sucessivamente até que o animal encontrasse o esconderijo, obedecendo ao tempo limite de 4 minutos para cada tentativa. No caso do rato encontrar o esconderijo, a ele foi dado 1 minuto de permanência no mesmo, após o que uma outra tentativa era iniciada (“intertrial interval”, 90 – 120 segundos). Se, em uma dada tentativa, o esconderijo não fosse encontrado em 4 minutos, o rato era colocado no braço correto e gentilmente “forçado” a entrar no esconderijo.

Entre as tentativas, o labirinto era limpo de excrementos, permanecendo, porém, saturado com relação aos odores dos animais ao longo de todo experimento. Entre uma tentativa e outra, o labirinto era girado aleatoriamente sobre seu eixo central e o esconderijo passado aleatoriamente para qualquer um dos demais braços, mantendo-se, porém, a sua posição espacial em relação às pistas extra-labirinto inalterada ao longo de todo experimento.

O desempenho de aprendizagem e memória sobre a localização do esconderijo em função do treino é expresso pelos seguintes parâmetros: (a) latência para encontrar o esconderijo, (b) número de erros de memória de referência, e (c) número de erros de memória operacional. Dentro de cada tentativa, um erro de referência foi registrado toda vez que o rato visitava um braço falso pela primeira vez. Se o rato retornava a um braço falso previamente visitado dentro da mesma tentativa, um erro de memória operacional era registrado. Segundo Dudchenko (2004), a memória operacional pode ser definida com uma memória de curto-prazo para um objeto, estímulo ou lugar, a qual é útil dentro de uma sessão de teste, mas não entre uma sessão e outra. A memória operacional distingui-se da memória de referência,

sendo esta última uma memória de longo-prazo, tipicamente adquirida após repetidas sessões (dias) de treinamento, podendo persistir por dias ou meses. Em contraste, a memória operacional constitui-se na representação de um estímulo, e ela é tipicamente dependente da demora com que aquele estímulo é apresentado. Em outras palavras, a memória operacional é uma memória contexto-dependente, necessária para dirigir o comportamento dentro de um determinado contexto somente. A memória operacional adquirida em uma sessão de teste deixa de ser relevante para a sessão subsequente. Importante, a memória operacional não deve necessariamente estar associada à memória de referência. Além disso, há evidências que os dois tipos de memória devem ser operados por sistemas neurais distintos (Dudchenko, 2004). Assim, no presente estudo, se o rato entra no mesmo braço falso por mais de uma vez durante a mesma tentativa, então sua memória operacional falhou, e um erro de memória operacional é registrado.

Considerou-se que um braço foi visitado quando o corpo todo do rato encontrava-se no seu interior. O animal era considerado ter deixado o braço quando colocava as quatro patas na plataforma central.

#### **3.4.2.2 TESTE DE RETENÇÃO**

Aqui, ratos intactos foram primeiramente submetidos à habituação, e em seguida treinados por um período de 10 dias consecutivos, para aquisição da tarefa no labirinto radial aversivo, conforme os mesmos procedimentos descritos anteriormente (item 3.4.2.1). Um dia após a última sessão de treino (11º dia de experimentação), os ratos foram submetidos à cirurgia e tratados com EGb 761 ou veículo (ver protocolo experimental, item 3.3). Transcorridos 20 dias após a isquemia, os animais foram retestados no labirinto radial para avaliação da capacidade de retenção da cognição adquirida durante o treino dado antes da isquemia. O teste

de retenção foi aplicado em três sessões (dias), intercalados por um intervalo de 3 dias, ou seja, os retestes aconteceram nos dias 21, 25 e 29 pós-isquemia.

## **4.0 HISTOLOGIA**

Dependendo do experimento, os animais foram sacrificados 8 dias após a isquemia (Experimento com Tebonin®), ou um dia após o término dos testes comportamentais. Os ratos foram profundamente anestesiados com éter e perfundidos por via transcardíaca com solução salina 0,9%, seguido por solução fixadora de Bouin (20 mL/mim, durante 7-10 min). Em seguida procedeu-se a decaptação, sendo a cabeça imersa em gelo (1-2°C) por cerca de 1 hora. O cérebro foi cuidadosamente extraído e mantido em solução de Bouin por 3 dias, sob refrigeração (4°C). Após processamento (fixação e diafanização do material) os cérebros foram emblocados em parafina. Usando um micrótomo rotativo, oito a doze cortes coronais seriados com espessura de 5 µm foram retirados de cada cérebro ao nível estereotático correspondente, aproximadamente, a 4,52 mm posterior ao bregma. Os cortes foram corados pelo método da fucsina ácida/azul celeste. Três cortes foram escolhidos para contagem bilateral dos neurônios aparentemente normais, no estrato piramidal da região CA1 do hipocampo. As células piramidais gigantes exibindo núcleo e nucléolo distintos, bem como um citoplasma basofílico, foram consideradas como sendo neurônios aparentemente normais. Foram contadas bilateralmente numa extensão linear de 1,35 mm (aumento de 400 x, diâmetro do campo = 450 µm, Olympus), e expressos como o número médio de neurônios em três cortes coronais. A identidade dos grupos não foi revelada durante a avaliação histológica. Todos os procedimentos experimentais seguiram os princípios atribuídos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, <http://www.cobea.org.br>).



## 5.0 ESTATÍSTICA

Por causa da heterogeneidade da variância nos resultados da análise comportamental, a transformação logarítmica dos dados brutos foi usada para a análise estatística. Os dados de aquisição e de retenção medidos diariamente foram analisados usando a Análise de Variância Multifatorial para Amostras Repetidas (MANOVA), sendo as comparações realizadas entre os grupos (falso-isquêmico x isquemia + veículo x isquemia + EGb 761; “between factor”) e dentro do grupo (dias de teste; “within factor”) (Statistic 6.0). No caso de efeito global significativo, o Teste de Comparações Múltipla de Duncan foi usado para distinguir entre os grupos. O teste de Análise de Variância de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan foi aplicado para comparar os diferentes grupos quando os parâmetros de “latência total” e “número total de erros” foram calculados. Os resultados da análise histológica foram quantificados pela ANOVA de uma via (“One-Way”), seguido pelo teste de Duncan. Significância estatística foi definida para um valor de  $p < 0,05$ .

## 7.0 RESULTADOS

### 7.1 Efeitos do Tebonin®

A Figura 6 mostra o efeito do tratamento prolongado com Tebonin® (EGb 761 solução oral, 40 mg/mL) sobre a neurodegeneração hipocampal causada pela isquemia.

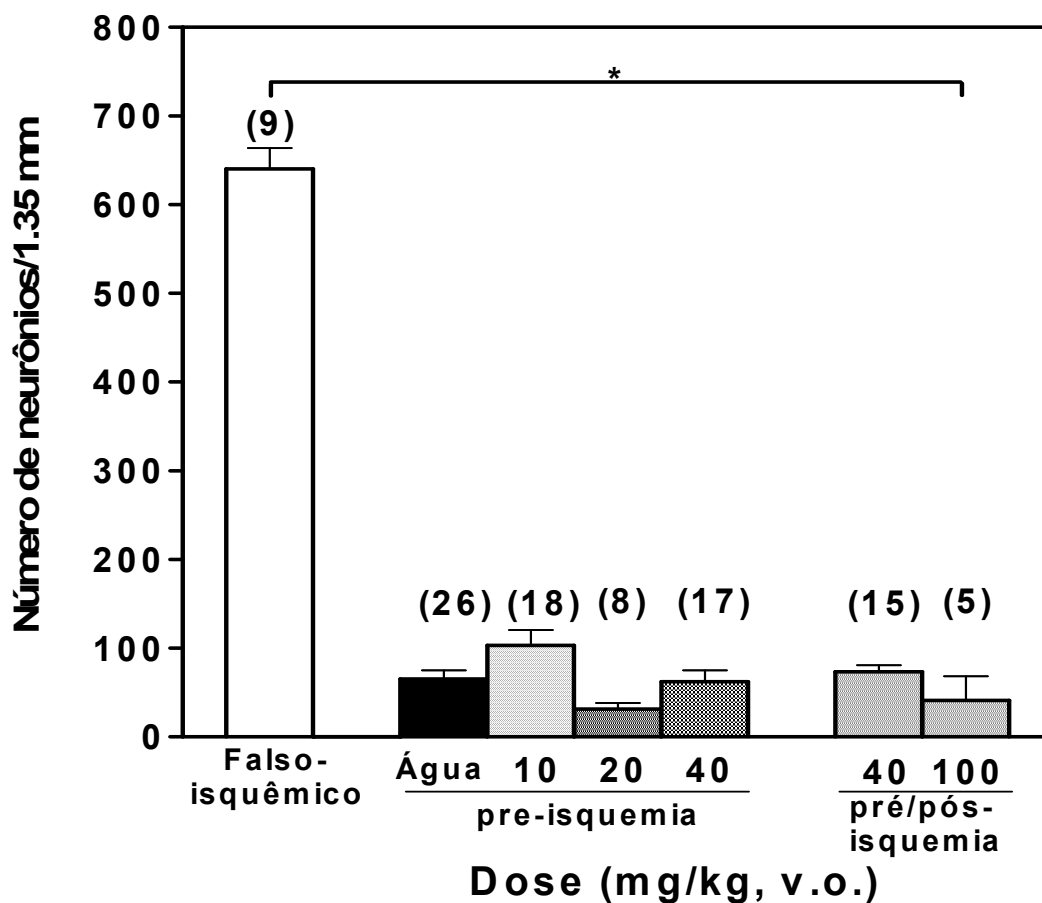


Figura 6. Efeito do Tebonin® (EGb 761 solução oral, 40 mg/mL) sobre a perda neuronal na região CA1 do hipocampo de ratos submetidos à ICGT. As células foram contadas em uma extensão linear de 1,35 mm. Os valores são a média  $\pm$  EPM do grupo. (\* $p < 0,0001$ , Falso-isquêmico vs veículo;  $p > 0,05$  veículo vs Tebonin). O número de animais é indicado entre parêntesis.

Comparado com o grupo falso-isquêmico, 15 minutos de isquemia causou uma profunda perda de neurônios piramidais, correspondente a 89% em relação ao grupo intacto (efeito principal de grupo:  $F(6, 97) = 131.0$ ; falso-isquêmico vs veículo:  $p < 0,0001$ , teste post-hoc de Duncan). Este efeito neurodegenerativo da isquemia não foi reduzido após o tratamento prolongado com Tebonin® (75-90% de morte celular), independente da dose ou da duração do tratamento empregado ( $p > 0,05$ , Tebonin® vs veículo).

## **7.2 Efeitos do Extrato Seco Liofilizado**

### **7.2.1 Aquisição**

A Figura 7 mostra os efeitos do Extrato Seco Liofilizado sobre o déficit causado pela isquemia cerebral global e transitória. Examinando o desempenho diário dos animais durante as sessões de treino (painel superior), a ANOVA para amostras repetidas revelou um efeito significativo do tratamento medido pelos parâmetros de “latência” ( $F_{3, 332} = 5.78$ ,  $p < 0,01$ ), “erro de referência” ( $F_{3, 332} = 7.25$ ,  $p < 0,001$ ) e “erro operacional” ( $F_{3, 332} = 2.96$ ,  $p < 0,05$ ). Observa-se um efeito altamente significativo do treinamento (sessões) evidente para todos os três parâmetros analisados ( $F_{4, 332} = 85.24 - 155.80$ ,  $p < 0,0001$ ). Um efeito de interação (Tratamento vs Treino) apareceu para os parâmetros de “latência” ( $F_{12, 332} = 1.95$ ,  $p < 0,05$ ) e “erro de referência” ( $F_{12, 332} = 3.32$ ,  $p < 0,001$ ). A análise *post-hoc* (teste de Duncan) mostrou que o grupo submetido à ICGT e tratado com veículo teve seu desempenho de aquisição (aprendizagem) prejudicado em todos os três parâmetros ( $p < 0,01 - 0,05$ , Veículo vs Falso-isquêmico). O tratamento com Extrato Seco Liofilizado na dose de 150 mg/kg, melhorou o desempenho na aquisição prejudicado pela isquemia, quando avaliados pelos parâmetros de latência ( $p = 0,019$ ) e números de erros de referência ( $p = 0,05$ , EGb 150 mg/kg vs Veículo). O déficit verificado na contagem dos erros operacionais não foi significativamente reduzido

pelo tratamento com o EGb 761 ( $p = 0,14$ ). A dose de 50 mg/kg não foi eficaz em reduzir o déficit cognitivo. Analisado pela latência total e do número total de erros (parte inferior da figura) o efeito prejudicial da isquemia sobre a capacidade de aquisição também expressou claramente para todos os três parâmetros (Kruskal-Wallis = 8,32 – 18,52,  $p < 0,01 - 0,05$ ); a latência total e o número total de erros aumentaram significativamente no grupo tratado com veículo ( $p < 0,01 - 0,05$  vs falso-isquêmico). Por esta análise, o efeito do Extrato Seco Liofilizado (150 mg/kg) em melhorar o desempenho aquisitivo alcançou significância estatística somente para o parâmetro “erro de referência” ( $p < 0,01$ , EGb vs Veículo), embora o valor médio da latência total também tenha sido revertido ao nível do controle (falso-isquêmico) após 150 mg/kg Extrato Seco Liofilizado.

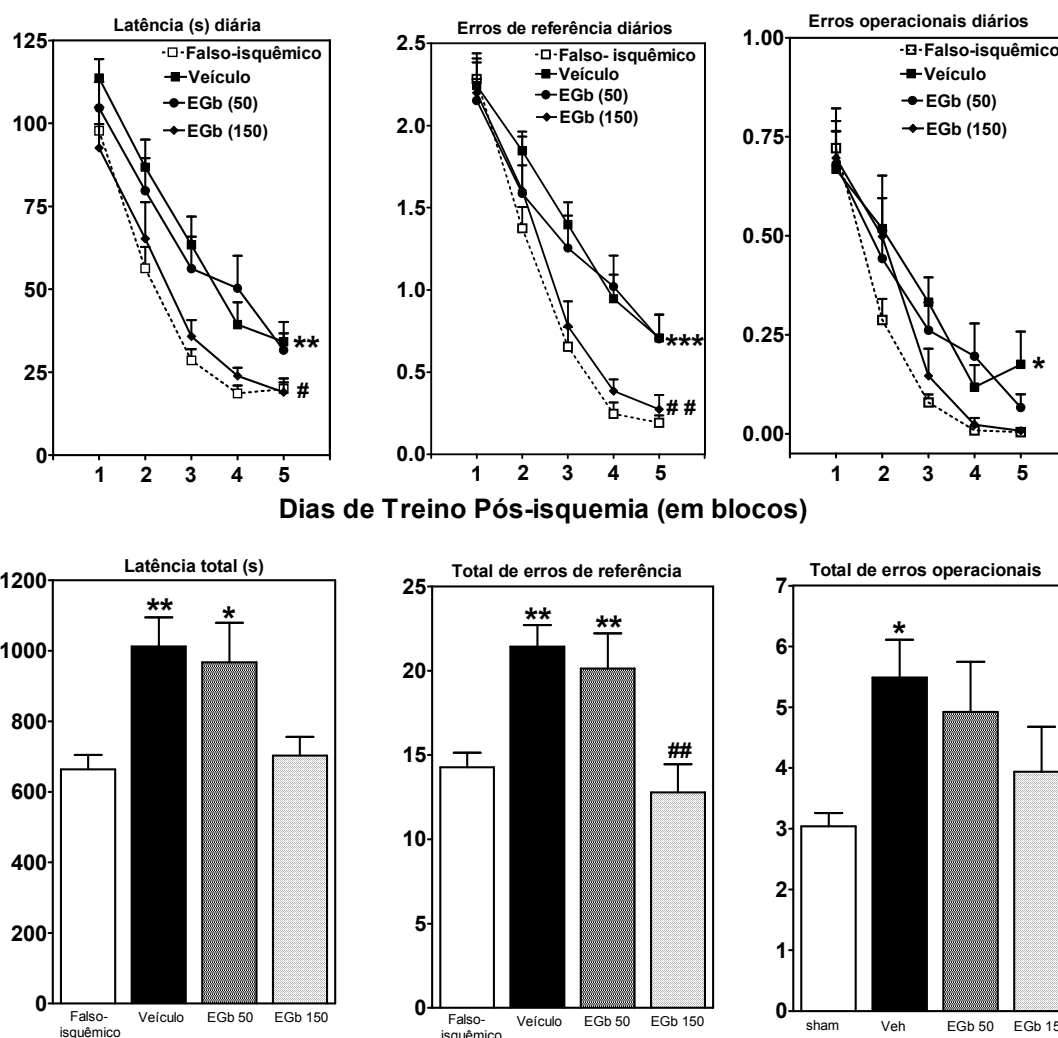


Figura 7 – Efeito do Extrato Seco Liofilizado (50 e 150 mg/kg, p.o.) sobre o desempenho aquisitivo. Para cada tratamento, a média dos valores obtidos nas três tentativas/sessão (dia) foi usada para expressar o desempenho em termos de latência (esquerda), número de erros de referência (centro), e o número de erros operacionais (painel direito). O desempenho comportamental foi registrado entre os 23º e 37º dias pós-isquemia, e os valores plotados em blocos, sendo 3 dias/bloco (painéis superiores). A isquemia prejudicou a capacidade de aprendizagem da tarefa, efeito este revertido pela dose de 150 mg/kg do EGb 761. A latência total e o número total de erros (média  $\pm$  EPM) são representados nos painéis inferiores. \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (Veículo vs Falso-isquêmico); # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  (EGb 761 vs Veículo). Os valores são a média do grupo  $\pm$  EPM. Tamanho das amostras: Falso-isquêmico = 24; Isquemia + Veículo = 28; Isquemia + EGb (50) = 22; Isquemia + EGb (150) = 13.

### 7.2.2 Retenção

A Figura 8 mostra o efeito prejudicial da isquemia sobre a capacidade de retenção da cognição adquirida durante o treinamento realizado antes da isquemia. Os animais foram treinados por 10 dias antes da isquemia; durante esta fase os grupos designados para cada tratamento não diferiram entre si para os parâmetros de “latência” e “erros de referência ou operacional” (Efeito de Grupo:  $F_{2, 108} = 0,11 - 1,57$ ,  $p > 0,05$ ). A análise *post-hoc* revelou que o grupo tratado com veículo teve seu desempenho de retenção significativamente prejudicado pela ICGT ( $p < 0,01 - 0,05$ , Veículo vs falso-isquêmico). Este efeito de amnésia causado pela ICGT não foi significativamente reduzido pelo Extrato Seco Liofilizado ( $p > 0,05$ , EGb vs Veículo, parte superior da figura). Este resultado não se alterou quando o desempenho de retenção foi avaliado pela “latência total” e “número total de erros” (Fig. 8, parte inferior da figura). O efeito de amnésia causado pela ICGT é claramente manifestado (Kruskal-Wallis =  $8,06 - 14,96$ ,  $p < 0,001 - 0,05$ ), mas o efeito do Extrato Seco Liofilizado em preveni-lo não atingiu significância estatística. ( $p > 0,05$ , EGb 761 vs Veículo).

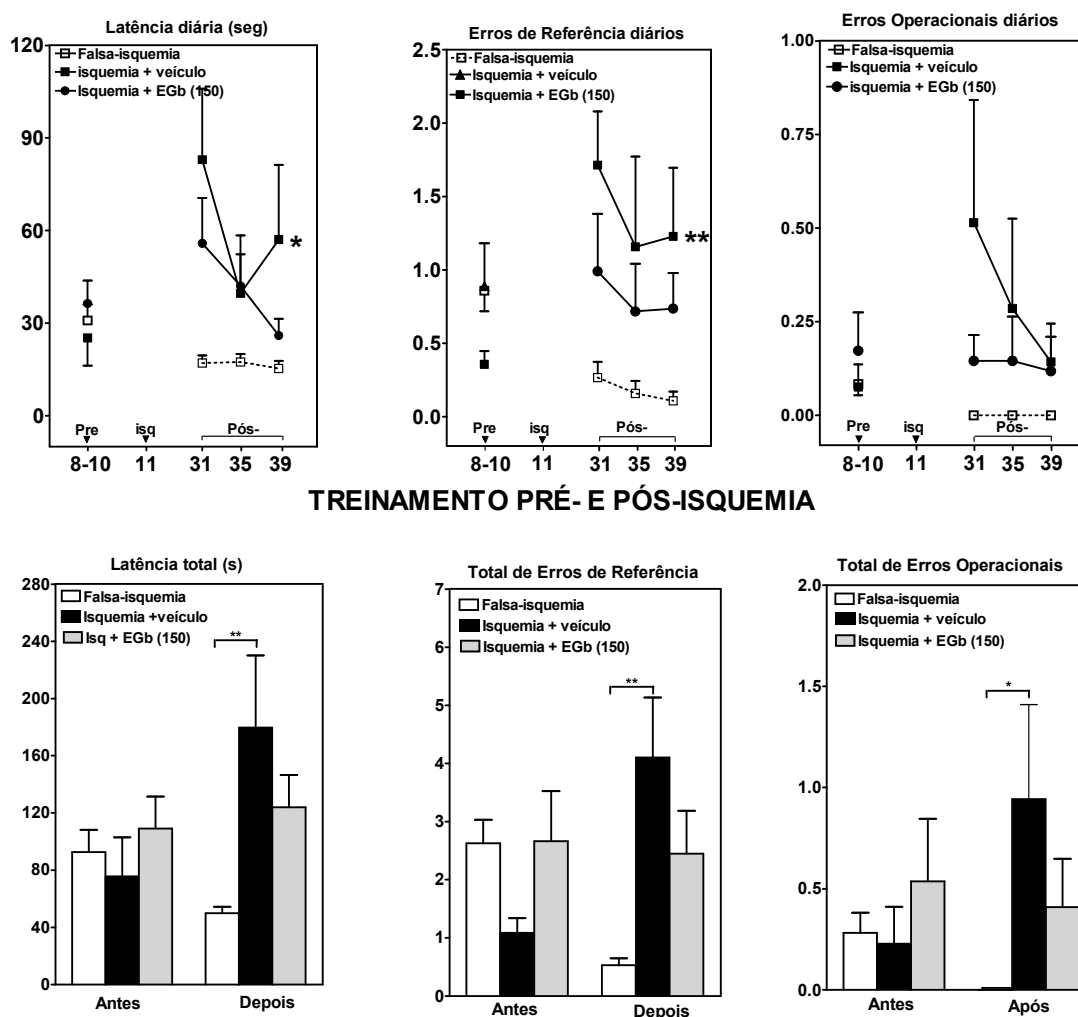


Figura 8. Efeito do Extrato Seco Liofilizado (EGb 761, 150 mg/kg, p.o.) sobre o déficit de retenção induzido pela ICGT. A isquemia foi induzida após 10 dias de treino (no dia 11), e o desempenho da retenção foi avaliado nos dias 31, 35 e 39 pós-isquemia. Na fase pré-isquêmica, a assíntota do desempenho é a média dos três últimos dias de treinamento (8° - 10° dia). Para cada animal, a média dos valores obtidos nas três tentativas, em cada sessão (dia), foi usada para expressar o desempenho da retenção em termos de latência (esquerdo), número de erros de referência (centro), e número de erros operacionais (painel direito). A ICGT prejudicou significativamente a capacidade de retenção, como expresso pelos três parâmetros. Este efeito deletério da ICGT não foi significativamente reduzido pelo EGb 761. A latência total e o número total de erros (média  $\pm$  EPM), são representados na parte inferior da figura. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (Veículo vs Falso-isquêmico). Os valores são a média do grupo  $\pm$  EPM. Tamanho das amostras: falso-isquêmico = 12; Isquemia + Veículo = 7; Isquemia + EGb (150) = 11.

### **7.2.3 Efeito Histológico do Extrato Seco Liofilizado**

A Figura 9 ilustra o efeito do Extrato Seco Liofilizado sobre a neurodegeneração hipocampal causada pela isquemia. Quinze minutos de isquemia causou 81,2% a 88,0% de perda neuronal no estrato piramidal no hipocampo dos ratos usados nos experimentos de aquisição e retenção, respectivamente ( $p < 0,001$  Falso-isquêmico vs Veículo). A extensão da morte celular no CA1 diminuiu para 48,2% ou 51,1% e 63,9% após administração do Extrato Seco Liofilizado nas doses de 50 ou 150 mg/kg, respectivamente. Portanto, o grau de neuroproteção atingiu 31,6% em média nos animais usados para o experimento de aquisição após as doses de 50 e 150 mg/kg. Este grau de neuroproteção atingiu significância estatística ( $F_{3, 82} = 59,62$ ,  $p < 0,0001$ ; EGb 50/150 vs Veículo:  $p < 0,001$ ). Efeito similar foi obtido nos animais usados para o experimento de retenção ( $F_{2, 29} = 131,50$ ,  $p < 0,0001$ ; EGb 150 vs Veículo:  $p < 0,01$ )



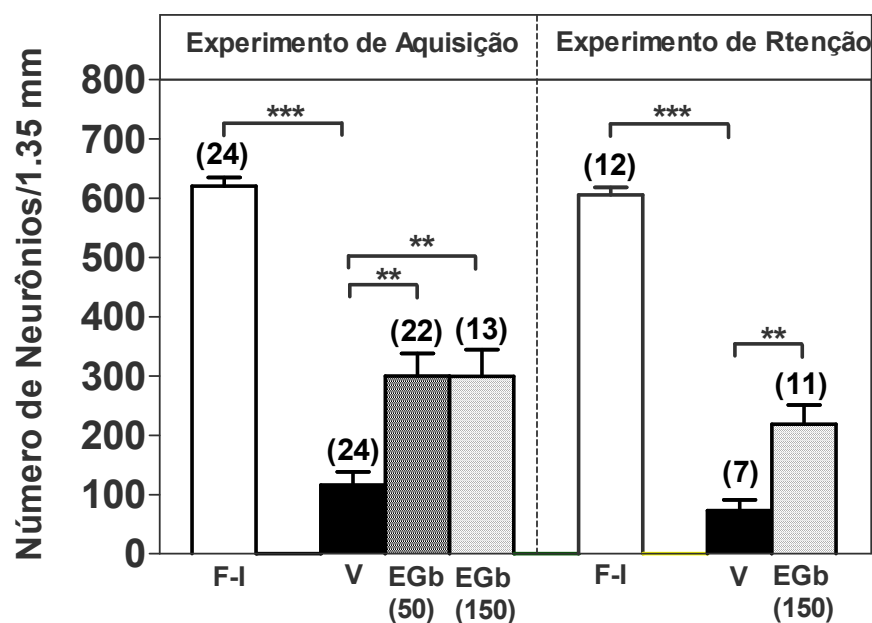


Figura 9. Efeito do Extrato Seco Liofilizado sobre a perda neuronal na região CA1 do hipocampo de ratos submetidos à ICGT. As células foram contadas em uma extensão linear de 1.35 mm. Os valores são a média  $\pm$  EPM do grupo. \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ . O tamanho das amostras é indicado entre parêntesis (4 ratos tratados com veículo no experimento de aquisição tiveram seus cérebros acidentalmente perdidos durante o processamento histológico). F-I = falso-isquêmico; V = veículo.

Não houve correlação entre o número de células piramidais aparentemente intactas encontradas na região CA1 do hipocampo e o desempenho comportamental medido nos ratos tratados com Veículo ou Extrato Seco Liofilizado 150 mg/kg ( $r = 0,070 - 0,27$ ,  $p > 0,05$ ; veículo  $n = 24$ , EGb 761  $n = 13$ , figura não apresentada).

A temperatura retal não foi afetada em nenhum tratamento, pelo menos durante as 3 ½ horas de reperfusão ( $36,5 \pm 0,07 - 37,2 \pm 0,02$ ,  $p > 0,05$  vs falso-isquêmico, figura não

apresentada), indicando que o efeito neuroprotetor do Extrato Seco Liofilizado, EGb 761, não ocorreu por um processo de hipotermia.

## **8.0 DISCUSSÃO**

No presente estudo avaliamos se o tratamento com Ginkgo biloba (EGb 761) poderia proteger o cérebro de ratos contra os efeitos neurodegenerativos agudos causados pela isquemia cerebral, global e transitória (ICGT). Ratos submetidos a 15 minutos de ICGT sofreram um profundo dano na região CA1 do hipocampo, assim como um déficit na aquisição e retenção da cognição avaliados no teste do labirinto radial aversivo.

O tratamento com Tebonin® (EGb 761, 40 mg/mL) não resultou em neuroproteção, a despeito da dose e da duração do tratamento. Esse resultado concorda com outros obtidos também em ratos tratados com EGb 761, administrado intravenosamente em uma única dose antes da isquemia (10 mg/kg), ou duas doses (2 x 100 mg/kg) após a isquemia (Krieglstein, et al., 1995). Estes resultados nos permitem supor que o uso de um produto comercial, no caso, TEBONIN®, ao invés do Extrato Seco Liofilizado, tal como originalmente manufaturado, não explica, por si só, a ineficácia do Tebonin® em promover neuroproteção, pelo menos na presente condição experimental. Considerando o Tebonin® como sendo uma preparação farmacêutica de qualidade, as doses de EGb 761 empregadas estão na mesma faixa de doses descritas por Krieglstein e cols. (1995), que também obtiveram resultado negativo com o extrato seco original. Visto que naquele estudo o EGb 761 foi administrado intravenosamente, a ausência de neuroproteção após Tebonin® no presente estudo não pode ser atribuída, por exemplo, a uma absorção deficiente do EGb 761 ou seus constituintes. Alternativamente, é possível que o esquema de administração usado para o Tebonin®, no presente estudo, não tenha sido suficiente para fornecer uma concentração cerebral adequada e uniforme do EGb

761 ou seus constituintes. Essa interpretação faz sentido, pois tem sido estimado, no rato, que o extrato das folhas do Ginkgo biloba é absorvido em cerca de 60%, apresentando um tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) em torno de 4,5 horas. Valores ainda menores de  $t_{1/2}$ , variando de 1,8 a 2,3 horas em média, foram encontrados para as frações purificadas do EGb 761, ginkgolídeo e bilobalídeo (Biber, 2003). Também foi relatado que os ginkgolídeos podem ser metabolizados rapidamente, além de serem instáveis *in vitro* (Krieglstein et al., 1995). Este fato pode explicar porque altas doses desses compostos (ginkgolídeos) são necessárias para alcançar uma concentração apropriada nos sítios de lesão por um período suficiente de tempo (Krieglstein et al., 1995). Portanto, é possível que uma única dose/dia, como usada para o Tebonin® no presente estudo, ou no estudo de Krieglstein et al. (1995) com o extrato seco EGb 761, não deve prover uma concentração cerebral adequada, uniforme e sustentada do EGb 761 e seus constituintes. Essa baixa concentração cerebral de EGb 761 seria ainda mais crítica nos primeiros dias pós-isquemia, quando o processo de maturação da lesão celular isquêmica atinge seu ápice. Outra possível explicação para a falta de neuroproteção após tratamento prolongado com Tebonin® refere-se ao efeito estimulante do EGb 761 sobre o sistema microssomal hepático. Ratos alimentados com uma dieta de extrato cru de Ginkgo biloba por 4 semanas desenvolvem um aumento acentuado da atividade microssomal (indução enzimática), sendo as isoenzimas CYP2B1/2, CYP3A1, CYP2A2 e CYP2B as mais afetadas (Shinozuka et al., 2002). Mais recentemente, ratos recebendo diariamente EGb 761 na dose de 100 mg/kg, via oral, por 14 dias demonstraram um forte aumento na atividade microssomal hepática, e uma alteração *ex-vivo* na biotransformação de androstenidiona e esteróides endógenos (Chatterjee et al., 2005). É possível, portanto, que a administração prolongada de Tebonin® antes da isquemia tenha causado tolerância devido à indução microssomal hepática, de modo que as doses administradas nos primeiros dias pós-isquemia

não fossem efetivas. Apesar de meramente especulativo, é a nossa interpretação que um esquema de administração insuficiente, associado a uma possível tolerância farmacocinética, podem ter contribuído para a obtenção dos resultados negativos com o Tebonin®. Essa interpretação, contudo, não encontra apoio nos resultados observados em gerbil (Calapai et al., 2000; Chandrasekaran et al., 2001) e mesmo em ratos após tratamento com Tanakam ® (Hrehorovska et al. 2004).

Em contraste aos experimentos com Tebonin®, o tratamento com o Extrato Seco Liofilizado reduziu não só o grau de neurodegeneração hipocampal, mas também o déficit cognitivo causados pela ICGT. Enquanto o mesmo grau de neuroproteção foi observado após ambas as doses do Extrato Seco (50 mg/kg e 150 mg/kg), somente a dose de 150 mg/kg reverteu o déficit cognitivo. O efeito do Extrato Seco Liofilizado em reduzir o déficit de retenção induzido pela isquemia (“amnésia retrógrada”) foi menos evidente, apesar do efeito neuroprotetor ser semelhante em ambos os grupos experimentais (experimento de aquisição vs experimento de retenção, ver Figura 9).

Esses resultados obtidos com o Extrato Seco Liofilizado estão de acordo com os dados observados em gerbil (Calapai et al., 2000; Chandrasekaran et al., 2001) ou em ratos (Hrehorovská et al. 2004). Entretanto, nós estamos considerando o grau de neuroproteção observado no presente estudo (28.5%, em geral) como sendo modesto. Níveis mais altos de neuroproteção foram estimados em gerbil após tratamento com o extrato seco liofilizado EGb 761 (56%, Chandrasekaran et al, 2001) ou Ph-Gb (38.7%, Calapai et al, 2000). Há que se notar, entretanto, que naqueles estudos os cérebros dos animais foram analisados 7 dias após a isquemia. Diferentemente, no presente estudo os animais sobreviveram por até 40 dias após a isquemia. Portanto, o menor grau de neuroproteção obtido no presente estudo pode ser uma consequência do longo tempo de sobrevida permitido aos ratos. Por outro lado, esse resultado

é o primeiro a demonstrar um efeito neuroprotetor sustentado do EGb 761 em modelo de isquemia cerebral.

O resultado mais interessante do presente estudo se refere aos efeitos do EGb 761 em reduzir os prejuízos de aprendizagem e memória induzidos pela isquemia. Nesse aspecto, nossos resultados são importantes, pois eles estendem para o nível funcional (comportamental) os achados histológicos descritos por diferentes pesquisadores. Além disso, nossos resultados parecem ser inéditos, pelo menos na presente condição experimental. É intrigante, contudo, a observação de que ambas as doses de EGb 761 (50 e 150 mg/kg) demonstraram a mesma eficácia para a neuroproteção, enquanto somente a dose de 150 mg/kg reverteu o déficit de aquisição (ver Figura 5). Isto sugere que outros componentes, sejam isolados ou em combinação com a preservação dos neurônios do CA1, devem contribuir para o efeito comportamental do EGb 761. Por exemplo, o EGb 761 deve facilitar as funções cognitivas mediante uma ação sobre sistemas neurotransmissores distintos, tais como noradrenérgico (Hadjiivanova et al., 2002), colinérgico (Lee et al., 2004) e glutamatérgico (Wang et al., 2005), e/ou por facilitar o processo de potenciação de longo-prazo no hipocampo (Wang et al. 2006; Williams et al., 2004). Disfunções de comportamentos complexos e recuperação dos mesmos devem refletir alterações ao nível subcelular, sináptico, ou eletrofisiológico, ou mesmo alterações morfológicas amplas que não podem ser quantificadas por uma simples contagem de células em uma área restrita de uma dada estrutura (Aronowski et al., 1996). Tais considerações ajudam a compreender porque o EGb 761 na dose de 50 mg/kg não reduziu os efeitos da isquemia sobre o comportamento de aprendizagem no labirinto radial (Figura 7), apesar de um efeito neuroprotetor semelhante aquele observado com a dose de 150 mg/kg (Figura 9). Contudo, não podemos descartar que o grau de neuroproteção exercido pelo EGb 761 no hipocampo possa influenciar de maneira

distinta os diferentes parâmetros comportamentais. Por exemplo, a memória operacional (de curto prazo) pode não estar necessariamente associada à memória de referência (de longo prazo), além do que há evidências que ambos os tipos de memória devem depender de sistemas cerebrais diferentes (Dudchenko, 2004). Apesar disso, bem como da falta de correlação entre parâmetros comportamentais e morfológicos, o presente estudo demonstra que o EGb 761 é eficaz para reduzir os efeitos morfológicos e comportamentais da isquemia em modelos animais, sugerindo assim um potencial terapêutico clinicamente relevante. Os resultados do presente estudo, principalmente a sustentação do efeito neuroprotetor, devem contribuir no sentido de propiciar os ensaios clínicos futuros.

Infelizmente, o efeito restaurador do EGb 761 sobre a capacidade de retenção do aprendizado (“consolidação da memória”) não foi tão claro quanto o seu efeito sobre a aquisição. Apesar da falta de significância estatística, não podemos desconsiderar a clara “tendência” de melhora da retenção, ocorrido de forma consistente para todos os três parâmetros, em particular para memória de referência e operacional. É possível que o tamanho da amostra usada no experimento de retenção (Figura 8) contribuiu, pelo menos parcialmente, para a falta de diferença quantitativa entre os grupos tratados com veículo e Extrato Seco, respectivamente. Apesar disso, esta “tendência” do EGb 761 em reduzir a amnésia retrógrada no presente estudo, concorda com os dados obtidos em ratos submetidos à hipoperfusão cerebral crônica e testados no labirinto radial (Lin et al., 2003). Similarmente, o EGb 761 tem mostrado reduzir os efeitos da isquemia sobre a capacidade de memória, medida em camundongos, no teste de esquiva passiva (Tadano et al., 1998). Esses dados fortalecem a hipótese de que o EGb 761, de fato, é capaz de reduzir também a amnésia retrógrada causada pela ICGT no presente estudo. Isto sugere mais uma vez o potencial clínico terapêutico do EGb 761 em condições de isquemia cerebral.

A importância de se avaliar as respostas comportamentais para se detectar o efeito neuroprotetor de drogas em modelos animais de injúria cerebral tem sido enfatizada pela “The Stroke Therapy Academic Industry Roundtable” (STAIR, 1999) como o principal requisito antes de começar os testes clínicos. Isto é justificado pelo fato que a proteção morfológica pode não implicar no restabelecimento ou preservação da função após o dano cerebral (Green et al., 1992, Corbett e Nurse, 1998). Por exemplo, tem-se observado que o fenobarbital protege contra a morte celular induzida pela isquemia na região CA1 do hipocampo, porém, a liberação de acetilcolina pelos terminais pré-sinápticos das células remanescentes permanece prejudicado (Ishimaru et al., 1995). Este distúrbio funcional subcelular pode ser suficiente para determinar um amplo déficit comportamental, apesar da proteção celular causada pela droga. O efeito oposto também tem sido relatado, isto é, melhora comportamental sem proteção histológica após isquemia (Grotta et al., 1990) ou lesão cerebral traumática (Sinson et al., 1995).

Com relação à farmacoterapia da lesão cerebral isquêmica, uma importante questão relaciona-se à janela terapêutica, isto é, o período transcorrido entre o início da isquemia e o começo do tratamento, durante o qual a droga será efetiva. No presente estudo, a primeira dose de EGb 761 (Extrato Seco Liofilizado) foi administrada imediatamente antes da isquemia. Isto, entretanto, não invalida sua possível utilidade clínica para o tratamento da isquemia cerebral. Embora as situações de hipóxia/isquemia observadas no ser humano ocorra mais frequentemente de maneira abrupta e inesperada, a injúria cerebral hipóxico/isquêmica também pode ocorrer durante procedimentos cirúrgicos (aneurisma, cirurgia cardíaca) ou diagnósticos (cateterismo, endarterectomia) os quais reduzem ou interrompem o fluxo sanguíneo cerebral temporariamente (Sudo et al., 2001). Em tais circunstâncias, uma possível lesão cerebral torna-se previsível, e uma droga neuroprotetora, segura, relativamente acessível

e disponível oralmente pode ser considerada para uso profilático em populações de alto risco (Fisher et al., 1994). Os resultados do presente estudo, associados a outros, reforçam esta hipótese. Por exemplo, o EGb 761 (Tanakan®) administrado por 5 dias antes da cirurgia reduziu a concentração de radicais livres induzidos pelo estresse oxidativo no plasma de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca (Pietri et al., 1997). Este efeito do EGb 761 tem também sido demonstrado no cérebro de animais submetidos à isquemia (Seif-el-Nasr e El-Fattat, 1995; Bastianetto et al., 2000; Calapai et al., 2000). Além disso, há que se enfatizar que o efeito neuroprotetor do EGb 761 observado no presente estudo, embora modesto, foi mantido por tempo prolongado (40 dias), sugerindo um efeito neuroprotetor persistente, e não meramente transitório. Esse achado não tem sido descrito anteriormente para o EGb 761, indicando, portanto, a contribuição do presente estudo.

Em conclusão, o presente estudo mostra que o EGb 761 reduz a disfunção cognitiva induzida pela isquemia e medida pelo teste do labirinto radial aversivo. Este efeito comportamental foi concomitante com o efeito do EGb 761 em reduzir a neurodegeneração hipocampal. Não houve correlação, entretanto, entre os efeitos estruturais e comportamentais do EGb 761. Estudos adicionais são necessários para caracterizar mais detalhadamente os efeitos do EGb 761 em melhorar o restabelecimento funcional após o dano cerebral isquêmico, com ênfase em: a) outros esquemas de dose, b) amnésia retrógrada, e c) avaliação histológica de outras estruturas cerebrais além do hipocampo, como por exemplo córtex frontal e outras áreas relacionadas com o comportamento de aprendizagem e memória.



## 9.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKISU, M.; KULTURSAY, N.; COKER, K.; HUSEYINOV A. *Platelet-activating factor is an important mediator in hypoxic ischemic brain injury in the newborn rat. Flunarizine and Ginkgo biloba extract reduce PAF concentration in the brain.* Biol Neonate, 1998;74(6):439-444.

ARONOWSKI, J.; SAMWAYS, E.; STRONG, R.; RHOADES, H. M.; GROTTA, J. C. *An alternative method for the quantitation of neuronal damage after experimental middle cerebral artery occlusion in rats: Analysis of behavioral deficits.* J Cereb Blood Flow Metab, 1996;16:705-713.

BACHEVALIER, J.; MEUNIER, M. *Cerebral Ischemia: Are the memory deficits associated with hippocampal cell loss?* Hippocampus, 1999;66:553-560.

BASTIANETTO, S.; ZHENG, W. H.; QUÍRION, R. *The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: Involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C.* J Neurochem, 2000;74:2268-2277.

BENETOLI, A.; PAGANELLI, R. A.; GIORDANI, F.; LIMA, K. C. M.; CESTARI-JUNIOR, L. A.; MILANI, H. *Effect of Tacrolimus (FK506) on Ischemia-Induced Brain Damage and Memory Dysfunction in Rats.* Pharmacol Biochem Behav, 2004; 77(3):607-615.

BIBER, A. *Pharmacokinetic of Ginkgo biloba Extracts.* Pharmacopsychiatry, 2003;36(Suppl 1): S32-S37.

BOGOUSSLAVSKY, J. *Frontal Stroke syndrome.* Eur Neurol, 1994;34:306-315.

BRAQUET, P.; ESANU, A.; BUISINE, E.; HOSFORD, D.; BROQUET, C.; KOLTAI, M. *Recent Progress in ginkgolide research.* Med Res Rev, 1991;11(3):295-355.

CALAPAI, G.; CRUPI, A.; FIRENZUOLI, F.; MARCIANO, M. C.; SQUADRITO, F.; INFERRERA, G.; PARISI, A.; RIZZO, A.; CRISAFULLI, C.; FIORE, A.; CAPUTI, A. P. *Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract in brain ischemia are mediated by inhibition of nitric oxide synthesis.* Life Sci, 2000; 67:2673-2683.

CHANDRASEKARAN, K.; MEHRABIAN, Z.; SPINNEWYN, B.; DRIEU, K.; FISKUM, G. *Neuroprotective effects of bilobalide, a component of the Ginkgo biloba extract (EGb 761), in gerbil global brain ischemia.* Brain Res, 2001;922:282-292.

CLARK, W. M.; RINKER, L. G.; LESSOW, N. S.; LOWERY, S. L.; CIPOLLA, M. J. *Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in mice.* Stroke, 2001;32:1000-1004.

COHEN-SALMON, C.; VENAULT, P.; MARTIN, B.; RAFFALLI-SÉBILLE, M. J.; BARKATS, M.; CLOSTRE, F.; PARDON, M. C.; CHRISTEN, Y.; CHAPOUTHIER, G.. *Effects of Ginkgo biloba extract (EGb-761) on learning and possible actions on aging.* J Physiol (Paris), 1997; 91, 291–300.

CHATTERJEE, S. S.; DOELMAN, C. J.; NOLDNER, M.; BIBER, A.; KOCH, E. *Influence of the Ginkgo extract EGb 761 on rat liver cytochrome P450 and steroid metabolism and excretion in rats and man.* J Pharm Pharmacol, 2005 May;57(5):641-50.

CORBETT, D.; NURSE, S.; *The problem of assessing effective neuroprotective in experimental cerebral ischemia.* Progr Neurobiol, 1998;54:531-548.

CUMMINGS, J. L.; TOMIYASU, U.; READ, S.; BENSON, D. F. *Amnesia with hippocampal lesions after cardiopulmonary arrest.* Neurology, 1984;34:679-781.

DEFEUDIS, F. V.: *Ginkgo biloba extract (EGb 761): from chemistry to the clinic.* Ullstein Medical Wiesbaden, 1998

DUDCHENKO, P. A. *An overview of the tasks used to test working memory in rodents.* Neurosci Biobehav Rev, 2004 Nov;28(7):699-709.

DUVERGER, D.; DEFEUDIS, F. V.; DRIEU, K. *Effects of repeated treatments with an extract of Ginkgo biloba (EGb-761) on cerebral glucose utilization in the rat: an autoradiographic study.* Gen Pharmacol, 1995; 26 (6), 1375–1383.

ECKERT, A.; KEIL, U.; SCHERPING, I.; HAUPTMANN, S.; MULLER, W. E. *Stabilization of Mitochondrial Membrane Potential and Improvement of Neuronal Energy Metabolism by Ginkgo Biloba Extract EGb 761.* Ann N Y Acad Sci, 2005 Nov;1056:474-85.

FISHER, M.; JONAS, S.; SACCO, R. L. *Prophylactic neuroprotection for cerebral ischemia*. Stroke, 1994;25(5):1075-80.

GARCIA, J. H.; YOSHIDA, Y.; CHEN, H.; LI, Y.; ZHANG, Z. G.; LIAN, J.; CHEN, S.; CHOPP, M. *Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat*. Am J Pathol, 1993;142(2):623-635.

GILANI, A. H. RAHMAN, A. U. *Trends in ethnopharmacology*. J Ethnopharmacol, 2005 Aug 22;100(1-2):43-49.

GREEN, E. J.; DIETRICH, W. D.; VAN DIJK, F.; BUSTO, R.; MARKGRAF, C. G.; MCCABE, P. M.; GINSBERG, M. D.; SCHNEIDERMAN, N. *Protective effects of brain hypothermia on behavior and histopathology following global cerebral ischemia in rats*. Brain Res, 1992; 580:197-204.

GROTTA, J. C.; PICONE, C. M.; OSTROW, P. T.; STRONG, R. A.; EARLS, R. M.; YAO, L. P.; RHOADES, H. M.; DEDMAN, J. R. *CGS-19755, a competitive NMDA receptor antagonist, reduces calcium-calmodulin binding and improves outcome after global cerebral ischemia*. Ann Neurol, 1990;27(6):612-9.

HADJIIVANOVA, C. I.; PETKOV, V. V. *Effect of Ginkgo biloba extract on beta-adrenergic receptors in different rat brain regions*. Phytother Res, 2002 Aug;16(5):488-90.

HOYTE, L.; KAUR, J.; BUCHAN, A. M. *Lost in translation: taking neuroprotection from animal models to clinical trials*. Exp Neurol, 2004 Aug;188(2):200-4

HODGES, H. *Maze procedures: the radial-arm and water maze compared*. Cognitive Brain Research, 1996 3(3-4):167-181

HREHOROVSKA, M.; BURDA, J.; DOMORAKOVA, I.; MECHIROVA, E. *Effect of Tanakan on postischemic activity of protein synthesis machinery in the rat brain*. Gen Physiol Biophys, 2004 Dec;23(4):457-65.

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. *Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms*. Free Rad Biol Med, 2001; 30 (4), 433–446.

ISHIMARU, H.; TAKAHASHI, A.; IKARASHI, Y.; MURUYAMA, Y. *Pentobarbital protects against CA1 pyramidal cell death but not dysfunction of hippocampal cholinergic neurons following transient ischemia*. Brain Res, 1995; 673:112-118.

JANSSENS, D.; MICHIELS, C.; DELAIVE, E.; ELIAERS, F.; DRIEU, K.; REMACLE, J.; *Protection of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells by Ginkgo biloba extract and bilobalide*. Biochem Pharmacol, 1995; 50 (7), 991–999.

KARCHER, L.; ZAGERMANN, P.; KRIEGLSTEIN, J.; *Effect of an extract of Ginkgo biloba on rat brain energy metabolism in hypoxia*. Arch Pharmacol, 1984; 327, 31–35.

KLEIN, J.; CHATTERJEE, S. S.; LÖFFELHOLZ, K. *Phospholipid breakdown and choline release under hypoxic conditions: inhibition by bilobalide, a constituent of Ginkgo biloba*. Brain Res, 1997; 755, 347–350.

KOBUCHI, H.; DROY-LEFAIX, M. T.; CHRISTEN, Y.; PACKER, L. *Ginkgo biloba extract (EGb-761): inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7*. Biochem Pharmacol, 1997; 53, 897–903.

KRIEGLSTEIN, J.; AUSMEIER, F.; EL-ABHAR, H.; LIPPERT, K.; WELSH, M.; RUPALLA, K.; HENRICH-NOACK, P. *Neuroprotective effects of Ginkgo Biloba constituents*. Eur J Pharmaceut Sci, 1995;3: 39-48.

KRIEGLSTEIN, J.; BECK, T.; SEIBERT, A. *Influence of an extract of Ginkgo biloba on cerebral blood flow and metabolism*. Life Sci, 1986.; 39, 2327–2334.

LE PONCIN LAFITTE, M.; RAPIN, J.; RAPIN, J. R. *Effects of Ginkgo biloba on changes induced by quantitative cerebral microembolization in rats*. Arch Int Pharmacodyn, 1980; 243, 236–244.

LEE, E. J.; CHEN, H. Y.; WU, T. S.; CHEN, T. Y.; AYOUB, I. A.; MAYNARD, K. I. *Acute administration of Ginkgo biloba extract (EGb 761) affords neuroprotection against permanent and transient focal cerebral ischemia in Sprague-Dawley rats*. J Neurosci Res, 2002;68: 636-645.

LEE, T. F.; CHEN, C. F.; WANG, L. C. *Effect of ginkgolides on beta-amyloid-suppressed acetylcholine release from rat hippocampal slices*. Phytother Res, 2004;18(7):556-60.

LIM, C.; ALEXANDER, M. P.; LAFLECHE, G.; SCHNYER, D. M.; VERFAELLIE, M. *The neurological and cognitive sequelae of cardiac arrest*. Neurology, 2004; 63(10):1774-8.

LIN, C. C. K.; CHENG, W. L.; HSU, S. H.; CHANG, C. M. J. *The effects of Ginkgo biloba extracts on the memory and motor functions of rats with chronic cerebral insufficiency*. Neuropsychobiology, 2003;47:47-51.

LONGA, E. Z.; WEINSTEIN, P. R.; CARLSON, S.; CUMMINS, R. *Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats*. Stroke, 1989 Jan;20(1):84-91.

MACLENNAN, K. M.; DARLINGTON, C. L.; SMITH, P. F. *The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and ginkgolides B*. Progr Neurobiol, 2002; 575:1-23.

MAITRA, I.; MARCOCCI, L.; DROY-LEFAIX, M. T.; PACKER, L. *Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract EGb-761*. Biochem. Pharmacol, 1995; 49 (11), 1649–1655.

MARCOCCI, L.; MAGUIRE, J. J.; DROY-LEFAIX, M. T.; PACKER, L. *The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb-761*. Biochem Biophys Res Commun, 1994b; 201 (2), 748–755.

MARCOCCI, L.; PACKER, L.; DROY-LEFAIX, M. T.; SEKAKI, A.; GARDÈS-ALBERT, M. *Antioxidant action of Ginkgo biloba extract EGb-761*. Methods Enzymol, 1994a; 46, 462–475.

MCGAUGH, J. L. *Memory – a Century of Consolidation*. Science, 2000; 287: 248–251.

MCGOVERN, T. W.; BARKLEY, T. M. *Botanical briefs. The Ginkgo tree--Ginkgo biloba L*. Cutis, 1999 Sep;64(3):154-6.

MIX, J. A.; CREWS, W. D. *An examination of the efficacy of Ginkgo biloba extract EGb-761 on the neuropsychologic functioning of cognitively intact older adults*. J Alternat Complement Med, 2000; 6 (3), 219–229.

NETO, C. J. B. F.; PAGANELLI, R. A. BENETOLI, A.; LIMA, K. C. M.; MILANI, H. *Permanent, 3-stage, 4-Vessel Occlusion as a Model of Chronic and Progressive Brain Hypoperfusion in Rats: A Neurohistological and Behavioral Analysis*. Behav Brain Res, 2005; 160(2):116-126.

NUNN, J.; HODGES, H. *Cognitive deficits induced by global cerebral ischaemia: relationship to brain damage and reversal by transplants*. Behav Brain Res, 1994;65:1-31.

OKEN, B. S.; STORZBACH, D. M.; KAYE, J. A. *The Efficacy of Ginkgo biloba on Cognitive Function in Alzheimer Disease*. Arch Neurol, 1998 Nov; 55: 1409-1415.

OYAMA, Y.; CHIKAHISA, L.; UEHA, T.; KANEMARU, K.; NODA, K. *Ginkgo biloba extract protects brain neurons against oxidative stress induced by hydrogen peroxide*. Brain Res, 1996; 712, 349–352.

OYAMA, Y.; FUCHS, P. A.; KATAYAMA, N.; NODA, K. *Myricetin and quercetin, the flavonoid constituents of Ginkgo biloba extract, greatly reduce oxidative metabolism in both resting and Ca<sup>2+</sup>-loaded brain neurons*. Brain Res, 1994; 635, 125–129.

OYAMA, Y.; UEHA, T.; HAYASHI, A.; CHIKAHISA, L.; NODA, K. *Flow cytometric estimation of the effect of Ginkgo biloba extract on the content of hydrogen peroxide in dissociated mammalian brain neurons*. Jpn J Pharmacol, 1992; 60 (4), 385–388.

PAGANELLI, R. A.; BENETOLLI, A.; LIMA, K. C.; CESTARI-JUNIOR, L. A.; FAVERO FILHO, L. A.; MILANI, H. *A novel version of the 8-arm radial maze: effects of cerebral ischemia on learning and memory*. J Neurosci Methods, 2004 Jan 15;132(1):9-18.

PAGANELLI, R. A.; BENETOLLI, A.; MILANI, H. *Sustained neuroprotection and facilitation of behavioral recovery by the Ginkgo biloba extract, EGb 761, after transient forebrain ischemia in rats*. Behavioural Brain Research, 2006 (Submitted).

PESKINE, A.; PICQ, C.; PRADAT-DIEHL, P. *Cerebral anoxia and disability*. Brain Inj, 2004;18(12): 1243–1254

PETITO, C. K.; FELDMANN, E.; PULSINELLI, W. A.; PLUM, F. *Delayed Hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest*. Neurology, 1987; 37:1281-1286.

PIERRE, S.; JAMME, I.; DROY-LEFAIX, M. T.; NOUVELOT, A.; MAIXENT, J. M. *Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects Na,K-ATPase activity during cerebral ischemia in mice*. Neuroreport, 1999;10:47-51.

PIETRI, S.; SEGUIN, J.R.; D'ARBIGNY, P.; DRIEU, K.; CULCASI, M. *Ginkgo biloba extract (EGb 761) pretreatment limits free radical-induced oxidative stress in patients undergoing coronary bypass surgery*. Cardiovasc Drugs Ther, 1997;11(2):121-31.

PULSINELLI, W. A.; BRIERLEY, J. B. *A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat*. Stroke, 1979;10(3):267-72.

RABIN, O.; DRIEU, K.; GRANGE, E.; CHANG, M. C. J.; RAPOPORT, S. I.; PURDON, A. D. *Effects of EGb 761 on fatty acid reincorporation during reperfusion following ischemia in the brain of the awake gerbil*. Mol Chem Neuropathol, 1998;34(1):79-101.

RAMASSAMY, C.; GIRBE, F.; CHRISTEN, Y.; COSTENTIN, J. *Peroxidation of synaptosomes alters the dopamine uptake complex but spares the exocytotic release of dopamine*. Neurodegeneration, 1995; 4, 155–160.

ROTHMAN, S. M.; OLNEY, J. W. *Excitotoxicity and the NMDA receptor: stroke lethal after 8 years*. Trends Neurosci, 1995; 18, 299–302.

SASTRE, J.; MILLÁN, A.; DE LA ASUNCIÓN, J. G.; PLÁ, R.; JUAN, G.; PALLARDO, F. V.; O'CONNOR, E.; MARTIN, J. A.; DROY-LEFAIX, M. T.; VIÑA, J. *A Ginkgo biloba extract (EGb-761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 1998; 24 (2), 298–304.

SCREMIN, O. U.; JENDEN, D. J. *Focal ischemia enhances choline output and decreases acetylcholine output from the rat cerebral cortex*. Stroke, 1989; 20, 92–95.

SEIF-EL-NASR, M.; EL-FATTAT, A. A. *Lipid peroxide, phospholipids, glutathione levels and superoxide dismutase activity in rat brain after ischaemia: effect of ginkgo biloba extract*. Pharmacol Res, 1995;32(5):273-8.

SHEN, Y.; SPECHT, S. M.; DE SAINT GHISLAIN, I.; LI, R. *The hippocampus: a biological model for studying learning and memory*. Prog Neurobiol, 1994; Dec;44(5):485-96.

SHINOZUKA, K.; UMEGAKI, K.; KUBOTA, Y.; TANAKA, N.; MIZUNO, H.; YAMAUCHI, J.; NAKAMURA, K.; KUNITOMO, M. *Feeding of Ginkgo biloba extract (GBE) enhances gene expression of hepatic cytochrome P-450 and attenuates the hypotensive effect of nicardipine in rats*. Life Sci, 2002 Apr 26;70(23):2783-92.

SINSON, G.; VODDI, M.; MCINTOSH, T. K. *Nerve growth factor administration attenuates cognitive but not neurobehavioral motor dysfunction or hippocampal cell loss following fluid-percussion brain injury in rats*. J Neurochem, 1995; 65:2209-2216.

STICHER, O. *Quality of Ginkgo preparations*. Planta Med, 1993 Feb;59(1):2-11.

STROKE THERAPY ACADEMIC INDUSTRY ROUNDTABLE (STAIR). Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. Stroke, 1984; 30:2752-2758

SUDO, Y.; TAKAHARA, Y.; NAKAJIMA, N. *Pulsatile cardiopulmonary bypass failed to prevent neuropsychological dysfunction*. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2001;7(2): 89-93.

TADANO, T.; NAKAGAWASAI, O.; TAN-NO, K.; MORIKAWA, Y.; TAKAHASHI, N.; KISARA, K. *Effects of Ginkgo Biloba Extract on impairment of learning induced by cerebral ischemia in mice*. Am J Chin Med, 1998;26(2):127-132.

THE COMPLETE GERMAN COMMISSION E MONOGRAPHS – Therapeutic Guide to Herbal Medicines. Blumenthal M. American Botanical Council, Austin, Texas, 1998; 136-8.

THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX. id: 262125-1 Version: 1.3. Disponível em: <<http://www.ipni.org/index.html>>. Acesso em 30 de Maio de 2006.

THE PLANTS DATABASE. database (version 5.1.1) 2000. National Plant Data Center, NRCS, USDA. Baton Rouge, LA 70874-4490 USA. Disponível em: <<http://plants.usda.gov> Ginkgo biloba>. Acesso em 30 de Maio de 2006.

ÜNAL, I.; GÜRSOY-ÖSDEMİR, Y.; BOLAY, H.; SÖYLEMEZOĞLU, F.; SARIBAS, O.; DALKARA, T. *Chronic daily administration of selegiline and EGb 761 increases brain's resistance to ischemia in mice*. Brain Res, 2001; 917:174-181.

URIKOVA, A.; BABUSIKOVA, E.; DOBROTA, D.; DRGOVA, A.; KAPLAN, P.; TATARKOVA, Z.; LEHOTSKY, J. *Impact of Ginkgo Biloba Extract EGb 761 on Ischemia/Reperfusion - Induced Oxidative Stress Products Formation in Rat Forebrain*. Cell Mol Neurobiol, 2006 Apr 14; [Epub ahead of print].

VOLPE, B. T.; HIRST, W. *The characterization of an amnesic syndrome following hypoxic ischemic injury*. Arch Neurol, 1983;40:436-440.



WANG, S. J.; CHEN, H. H. *Ginkgolide B, a constituent of Ginkgo biloba, facilitates glutamate exocytosis from rat hippocampal nerve terminals*. Eur J Pharmacol, 2005;514:141-149.

WANG, Y.; WANG, L.; WU, J.; CAI, J. *The in vivo synaptic plasticity mechanism of EGb 761-induced enhancement of spatial learning and memory in aged rats*. Br J Pharmacol, 2006; 148:147-153.

WIKIPÉDIA. A enciclopédia livre. Disponível em: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Ginkgo\\_biloba](http://en.wikipedia.org/wiki/Ginkgo_biloba)>. Acessado em: 30 de Maio de 2006.

WILLIAMS, B.; WATANABE, C. M. H.; SCHULTZ, P. G.; RIMBACH, G.; KRUCKER, T. *Age-related effects of Ginkgo biloba extract on synaptic plasticity and excitability*. Neurobiol Aging, 2004; 25:955–962.

WINTER, E. *Effects of an extract of Ginkgo biloba on learning and memory in mice*. Pharmacol Biochem Behav, 1989; 38, 109–114.

WINTER, J. C. *The effects of an extract of Ginkgo biloba, EGb-761, on cognitive behavior and longevity in the rat*. Physiol Beba, 1998; 63 (3), 425–433.

ZACH, N.; KANAREK, N.; INBAR, D.; GRINVALD, Y.; MILESTEIN, T.; VAADIA, E. *Segregation between acquisition and long-term memory in sensorimotor learning*. Eur J Neurosci, 2005; 22, 2357–2362.

ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L. R.; AMARAL, D. G. *Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the Hippocampus*. J Neurosci, 1986;6:2950-2967.

# **THE GINKGO BILOBA EXTRACT, EGb 761, FAILS TO PREVENT ISCHEMIA-INDUCED BRAIN DAMAGE IN RATS**

Ricardo Alexandre Paganelli, Arcélio Benetoli, Humberto Milani\*

Departamento de Farmácia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade  
Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, CEP 87020-900 Maringá, Paraná, Brazil.  
Tel.: +55-44-32614814; FAX: +55-44-32614999; E-mail: [hmilani@uem.br](mailto:hmilani@uem.br)

\*corresponding author

## **Abstract**

The present study evaluated whether Tebonin®, a pharmaceutical preparation containing the standardized extract of *Ginkgo biloba* L., EGb 761, could be effective in reducing the neurodegenerative effect of cerebral ischemia in rats. Male, Wistar rats were subjected to 15 min global, cerebral ischemia according the 4-vessel occlusion model (4-VO). In a first experimental series, Tebonin solution corresponding to 10, 40 or 100 mg/kg of EGb 761 was given *per orales* (p.o) once a day, for 14 days before ischemia, being the last dose given 30 min before ischemia. In the sencond experiment, Tebonin® (40 or 100 mg/kg EGb 761) was given also once a day (p.o.), but for 14 days before plus 7 days after ischemia, including the day of ischemia. Ischemia-induced neurodegeneration was assessed bilaterally in the CA1 sector of the hippocampus, along a transect of 450 µm length. Fifteen minutes ischemia caused profound neurodegeneration along the CA1 sector of the hippocampus ( $p < 0.0001$ , sham vs vehicle). Prolonged treatment with Tebonin® failed to provide CA1 neuroprotection, whatever the magnitude of dose and duration of treatment used ( $p > 0.05$ , Tebonin® vs vehicle). The lack of neuroprotection by EGb 761 observed here agrees with some scarce findings obtained in rat models of TGCI, but it is in contrast to those reported by other investigators using the gerbil model of TGCI. The present data are discussed in terms of the possible influences of dasage and pharmacokinetic parameters.

**Keys Words:** Rats, cerebral ischemia, Hippocampus, neurodegeneration, EGb 761, Sustained neuroprotection.

## Introduction

In both humans (Petito et al., 1987) and animals (Pulsinelli et al., 1982) brief interruptions of cerebral blood flow may cause neuronal death to vulnerable brain regions mainly the hippocampus, which is thought to cause permanent, cognitive dysfunction.

Ginkgo biloba is an ancient plant used for its medical properties. The standardized extract of *Ginkgo biloba* L., EGb 761, is marketed under the trade names of Rönkan, Tanakan, Tebonin and Ginkgold, and it has been considered useful in the treatment of a number of degenerative, CNS-related disorders, including those of a hypoxic/ischemic nature (MacLennan et al., 2002). This hypothesis has been based mainly on the wide range of biochemical effects of EGb 761 on parameters that may be involved in the pathophysiology of hypoxic/ischemic cell damage. These effects include antagonism of platelet activating factor (PAF) receptors; reduction in ischemia-induced, oxidative damage of the cell membrane; normalization of membrane  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity, and inactivation of NO-derived free radicals (for review see MacLennan et al., 2002).

The supposed utility of EGb 761 as a neuroprotective strategy has been demonstrated more directly in *in vivo* animal models of cerebral ischemia. Using the rat and mice models of focal brain ischemia, EGb 761 has been found to be effective in reducing infarct size (Krieglstein, et al., 1995; Clark et al., 2001; Ünal et al., 2001, Lee et al., 2002). In models of global, cerebral ischemia, followed by direct, morphometric examination of neuronal lesion, the data are more scarce and conflicting. Using the Mongolian Gerbil model of TGCI, only a few studies have provided more direct evidence for the effect of EGb 761 in preventing ischemia-induced, delayed neurodegeneration in the hippocampus (Calapai et al., 2000; Chandrasekaran et al., 2001). In rat models of TGCI, there is apparently only one study investigating the neuroprotective potential of EGb 761, yet with negative results (Krieglstein

et al., 1995). To our knowledge, there is no study using the rat 4-vessel occlusion (4-VO) model to evaluate the neuroprotective potential of EGb 761 by means of direct, morphometric measurement of lesion. The use of different animal models of ischemic brain damage is a major requirement necessary to ensure reliable, pre-clinical evaluation of neuroprotective drugs before starting clinical trials (STAIR, 1999). Accordingly, the challenge of translating animal data into the clinical setting has been recently addressed (Hoyte et al., 2004).

Therefore, in this study we used the rat 4-VO model of TGCI, with the aim to examine whether repeated treatment with EGb 761, used as the pharmaceutical product Tebonin®, given orally at different treatment schedules, could prevent ischemia-induced hippocampal neurodegeneration.

## **Methods**

### ***Animals***

Adult, male Wistar rats, weighing 270-300 g were used. The rats were housed in groups of three to four in plastic cages (39 x 33 x 16 cm) at a controlled temperature ( $22 \pm 1^\circ \text{C}$ ) on a 12-h light/dark cycle (lights on at 0700 hours) with constant air renewal. Food and water were offered *ad libitum*.

### ***Surgery***

The rat 4-vessel occlusion model (4-VO) (Pulsinelli and Brierley, 1979) was used with modifications. Under anesthesia with ether, the vertebral arteries were bilaterally electrocoagulated, followed by 15-min occlusion of the carotid arteries 5 to 6 hours later. Loss of the righting reflex within 2 min of carotid occlusion, unresponsiveness to gentle touch, mydriasis, and tonic extension of the paws were considered indicative of effective ischemia. Rectal temperature was monitored with a digital thermometer using a rectal probe inserted to

a depth of approximately 6 cm. Sham-operated animals were submitted to the same manipulations, except for vertebral and carotid artery occlusion.

### ***Pharmacological Treatment***

#### ***Experiment 1: Pre-ischemia Treatment with Tebonin<sup>®</sup>***

Rats were given EGb 761 (Tebonin<sup>®</sup>, oral solution, 40 mg/ml) at doses of 10, 20 or 40 mg/kg, p.o., for 14 days before ischemia, the last dose being given 30 min before ischemia. For each dose, the Tebonin<sup>®</sup> solution was diluted 1:10, 2:10, or 4:10, respectively, with distilled water; the volume injected ranged from 0.6 to 0.96 ml according to the animal's weight. The control group received distilled water in a corresponding weight-based volume. Tebonin<sup>®</sup> or distilled water were administered between 17:00 and 18:00 hours. A sham-operated group that did not receive any treatment was included. The animals were allowed to survive for 8 days after ischemia. Tebonin<sup>®</sup> was kindly supplied by AltanaPharma Pharmaceutical Co., São Paulo, Brazil.

#### ***Experiment 2: Pre- and Post-ischemia Treatment with Tebonin<sup>®</sup>***

Rats received EGb 761 (Tebonin<sup>®</sup>) at doses of 40 or 100 mg/kg, p.o., for 14 days before ischemia plus 7 days after ischemia. The treatment procedures followed here, as well as the post-ischemic survival time were as described for Experiment 1.

### ***Histology***

The rats were deeply anesthetized with ether and perfused transcardiacally with 0.9% saline followed by Bouin's fixative (20 ml/min for 7-10 min). Following decapitation, the head was immersed in crushed ice (1-2 °C) for 1 h. The brain was then carefully removed and

kept in Bouin's fluid for 3 days. Eight to twelve, paraffin-embedded, coronal sections (5  $\mu$ m thickness) were taken from each brain at three different stereotaxic levels, i. e., 3.80 mm, 4.30 mm and 5.20 mm posterior to bregma, and stained with celestine blue/acid fuchsin. Three sections were chosen for bilateral counts of normal-appearing neurons in the CA1 pyramidal stratum of the hippocampus. The number of intact pyramidal cells with a distinct nucleus and nucleolus was counted bilaterally along a transect of 450  $\mu$ m length, and expressed as the mean of the three sections. All experimental procedures followed the principles set down by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA, <http://www.cobea.org.br>).

### ***Statistical Analysis***

The data were analyzed using Prisma version 4.0 software. The One-way Analysis of Variance (ANOVA) was used to quantify the effects of the different treatments on the ischemia-induced hippocampal cell death. When a main group effect was detected, the Tuckey's Multiple Range Test was used to locate significantly different groups. Statistical significance was defined as a *P* value < 0.05.

### **Results**

Figure 1 shows the effect of Tebonin<sup>®</sup> (EGb 761 oral solution, 40 mg/ml) on ischemia-induced hippocampal neurodegeneration. Compared to the sham-operated group, 15 minutes ischemia caused around 89% cell loss in the CA1, pyramidal layer (main effect of Groups:  $F_{(6, 97)} = 131.0$ ; Tuckey's test for Sham vs Vehicle comparison:  $p < 0,0001$  ). This neurodegenerative effect of ischemia was not changed by Tebonin<sup>R</sup> (75-90% cell loss), whatever the dose and duration of treatment used ( $p > 0.05$ , Tebonin<sup>R</sup> vs vehicle). Figure 2 shows the representative photomicrographs of the hippocampus of rats treated with vehicles

or Tebonin®. Rectal temperature was unaffected by any treatment, at least up to 3 and half hours of reperfusion ( $36.5 \pm 0.07 - 37.2 \pm 0.02$ ,  $p > 0.05$  vs sham, figure not shown).

## **Discussion**

In the present study we investigated whether Tebonin®, a pharmaceutical preparation containing the Ginkgo biloba extract EGb 761, could protect the brain of rats against the neurodegenerative effects of transient, global cerebral ischemia (TGCI). TGCI is a common occurrence, mainly due to unexpected, reversible cardiac arrest. However, hypoxic/ischemic brain damage is often likely to occur during surgical or diagnostic procedures that may reduce or interrupt cerebral blood flow (Sudo et al., 2001). Under such conditions, a safe, relatively inexpensive, and orally available neuroprotective drug should be considered for prophylactic use in high-risk populations (Fisher et al., 1994). This assumption justified our purpose for using Tebonin® in the present study.

Our results demonstrate that prolonged treatments with Tebonin®, given for 14 days before ischemia, or for 14 days before plus 7 days after ischemia, did not prevent hippocampal neurodegeneration caused by transient forebrain ischemia in rats, independently of the doses used. This negative result with Tebonin® agrees with other data obtained also in rats, to which the originally manufactured, Dry Extract form of EGb 761 was administered intravenously either at single dose before ischemia (100 mg/kg), or twice ( $2 \times 100$  mg/kg) just after ischemia (Krieglstein, et al., 1995). This finding allows us to suppose that the use of a commercial product, instead the originally manufactured Dry Extract form of EGb 761, did not account, by itself, for the failure of Tebonin® in providing neuroprotection. To our knowledge, the Krieglstein's study and the present one are the only two works reporting on the failure of EGb 761 in providing neuroprotection after TGCI in rats. This is in contrast to



the positive findings observed in the gerbil model of TGCI ((Calapai et al., 2000; Chandrasekaran et al., 2001).

There is no conclusive explanation for the failure on detecting the putative neuroprotective effect of EGb 761 in the present study. Considering the Tebonin® formulation as a reliable source of EGb 761 and its constituents, the doses of EGb 761 used here are within the range of doses described by Krieglstein et al. (1995). Since in that study EGb 761 was given intravenously, the failure of neuroprotection by Tebonin® cannot be attributed to a deficient absorption of EGb 761 or its constituents. Alternatively, it is possible that the administration schedule used here for Tebonin® is not sufficient to provide an adequate and sustained brain concentration of EGb 761 or its constituents. It may be possible, however, that the use of a single dose/day should not be sufficient to cover the entire process of neuronal damage, despite the magnitude of the doses and the several days of administration used. This pharmacokinetic interpretation make sense, since although an absorption ratio of 60% for an extract from the Ginkgo biloba leaves has been determined in the rat, its half-life time ( $t_{1/2}$ ) around 4.5 hours. Yet, shorter  $t_{1/2}$  values ranging from 1.8h to 2.3h in average have been found for the purified ginkgolide and bilobalide fractions of EGb 761 (Biber, 2003). It has also been reported that ginkgolides can rapidly be metabolized and they are even unstable in vitro (personal communication given to Krieglstein et al., 1995). This may explain why high doses of the compounds (ginkgolides) are required to achieve appropriate concentrations at the site of lesion for a sufficient time period (Krieglstein et al., 1995). Therefore, a single dose/day as used in the present study, as well as in the study reported by Krieglstein et al. (1995), should not provide a sustained and adequate concentration of EGb 761 or its constituents into the rat hippocampus for the entire period of lesion maturation (48–72 hours). Other possible pharmacokinetic explanation for the lack of neuroprotection refers to the

stimulating effect of EGb 761 on the hepatic, metabolizing enzyme system. Rats fed a diet containing a crude extract of *Ginkgo biloba* for 4 weeks developed a marked increase in liver cytochrome P-450, the activities of isoforms CYP2B1/2, CYP3A1, CYP2A2 and CYP2B being the most affected (Shinozuka et al., 2002). Most recently, rats receiving EGb 761 at 100 mg/kg daily, p.o., for 4 days exhibited the liver CYP450 content strongly increased, and the ex-vivo biotransformation of androstendione and endogenous steroids was altered (Chatterjee et al., 2005). It is possible, therefore, that administrating EGb 761 for seven days before ischemia resulted in pharmacokinetic tolerance, so that the doses given nearly or within the ischemic period should not be effective, at least in the rat. We suppose, therefore, that an insufficient dosage schedule associated to an exacerbated hepatic metabolism of EGb 761 and its constituents may have contributed to the negative results obtained in the present study.

However, if the supposed influence of dosage/pharmacokinetic factors might help to explain the negative results observed in rats, they do not apply to the findings observed by other investigators using the gerbil model of TGCI. In the study reported by Chandrasekaran et al. (2001), EGb 761 was delivered at 50 mg/kg/day, one dose/day, for seven days before ischemia. Similarly, the treatment of gerbils with another standardized *Ginkgo biloba* extract (Ph-Gb) for 15 days before ischemia, being one dose/day (37.5-150 mg/kg, p.o.), also reduced ischemia-induced hippocampal cell death (Calapai et al., 2000). It seems, therefore, that EGb 761 acts more potently in the gerbil than in the rat subjected to TGCI. To our knowledge, the extent to which the pharmacokinetic of EGb 761 differs between gerbil and rat has apparently not been determined.

In conclusion, the present data demonstrate that EGb 761, given as the commercial product Tebonin® for prolonged time before and after ischemia, did not provide neuroprotection after transient, global cerebral ischemia in rats. An inadequate dosage

schedule associated to pharmacokinetic influences may have contributed to this result. Further studies are needed to better characterize the therapeutic potential of EGb 761 in the field of cerebral ischemia. We are currently investigating whether EGb 761 delivered at 3 doses/day, for the first three days post-ichema could prevent the histological and behavioral outcome of TGCI in rats.

## References

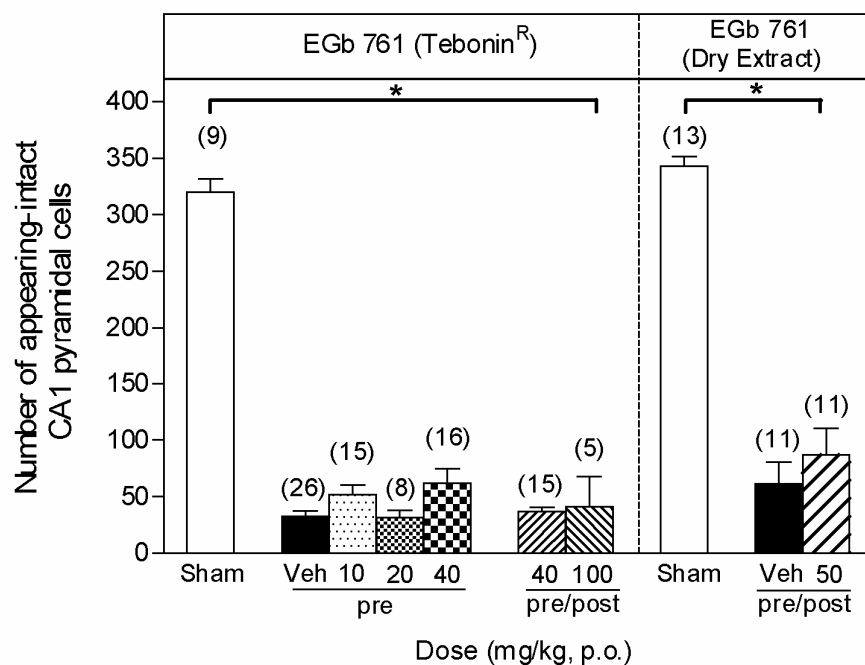
- Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD 1996. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 739: 88-96.
- Biber A 2003. Pharmacokinetic of Ginkgo biloba Extracts. *Pharmacopsychiatry* 36 Suppl 1: S32-S37.
- Calapai G, Crupi A, Firenzuoli F, Marciano MC, Squadrito F, Infrerera G, Parisi A, Rizzo A, Crisafulli C, Fiore A, Caputi AP 2000. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract in brain ischemia are mediated by inhibition of nitric oxide synthesis. *Life Sci* 67: 2673-2683.
- Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B, Drieu K & Fiskum G 2001. Neuroprotective effects of bilobalide, a component of the Ginkgo biloba extract (EGb 761), in gerbil global brain ischemia. *Brain Res* 922: 282-292.
- Chatterjee SS, Doelman CJ, Noldner M, Biber A, Koch E 2005. Influence of the Ginkgo extract EGb 761 on rat liver cytochrome P450 and steroid metabolism and excretion in rats and man. *J Pharm Pharmacol*. 2005; 57(5):641-50.
- Clark WM, Rinker LG, Lessow NS, Lowery SL, Cipolla MJ 2001. Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in mice. *Stroke* 32: 1000-1004.

- Fisher M, Jonas S, Sacco RL 1994. Prophylactic neuroprotection for cerebral ischemia. *Stroke* 25(5): 1075-80.
- Ginsberg MD, Busto R 1989. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 20:1627-1624.
- Hoyte L, Kaur J, Bucham AM 2004. Lost in translation: taking neuroprotection from animal models to clinical trials. *Exp Neurol* 188: 200-204.
- Kriegelstein J, Ausmeier F, El-Abhar H, Lippert K, Welsh M, Rupalla K, Henrich-Noack P 1995. Neuroprotective effects of Ginkgo Biloba constituents. *Eur J Pharmaceut Sci* 3: 39-48.
- Lee E-J, Chen H-Y, Wu T-S, Chen, T-Y, Ayoub IA, Maynard KI 2002. Acute administration of Ginkgo biloba extract (EGb 761) affords neuroprotection against permanent and transient focal cerebral ischemia in Sprague-Dawley rats. *J Neurosci Res* 68: 636-645.
- MacLennan KM, Darlington CL, Smith PF 2002. The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and ginkgolides B. *Progr Neurobiol* 57: 1-23.
- Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F 1987. Delayed Hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology* 37: 1281-1286.
- Pulsinelli WA, Brierley JB 1979. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10: 267-272.
- Pulsinelli WA, Brierley JB, Fred P 1982. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11: 491-498.
- Shinozuka K, Umegaki K, Kubota Y, Tanaka N, Mizuno H, Yamauchi J, Nakamura K, Kunitomo M. 2002. Feeding of *Ginkgo biloba* extract (GBE) enhances gene expression of hepatic cytochrome P-450 and attenuates the hypotensive effect of nicardipine in rats. *Life Sci* 70(23): 2783-2792.

Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) 1999. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 30: 2752-2758.

Sudo Y, Takahara Y, Nakajima N 2001. Pulsatile cardiopulmonary bypass failed to prevent neuropsychological dysfunction. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 7(2): 89-93.

Ünal I, Gürsoy-Ösdemir Y, Bolay H, Söylemezoğlu F, Saribas O, Dalkara T 2001. Chronic daily administration of selegiline and EGb 761 increases brain's resistance to ischemia in mice. *Brain Res* 917: 174-181.



**Figure 1** - Effect of EGb 761 on hippocampal pyramidal cell loss after 15-min, global forebrain ischemia. EGb 761 was given *p.o.* as the commercial product Tebonin<sup>R</sup> for 14 days before ischemia (10, 20, or 40 mg/kg) or for 14 days before plus 7 days after ischemia (40 or 100 mg/kg). The groups assigned to vehicle (water) pre- or pre/post-ischemia were pooled. For each individual, the number of cells were counted in the three estereotaxic planes (-3.80 mm, -4.30 mm and -5.20 mm). In each coronal section, the number of intact pyramidal cells with a distinct nucleus and nucleolus was counted bilaterally along a transect of 1.35 mm length. For each subject, the number of cells represents the mean of three coronal brain sections. Bars are the mean ( $\pm$  SEM) of groups. The numbers within brackets indicate sample size. Compared to vehicle, EGb 761 did not prevent ischemia-induced cell death ( $p > 0.05$ ). \*  $p < 0.001$ , sham vs vehicle or sham vs Tebonin<sup>R</sup> groups.

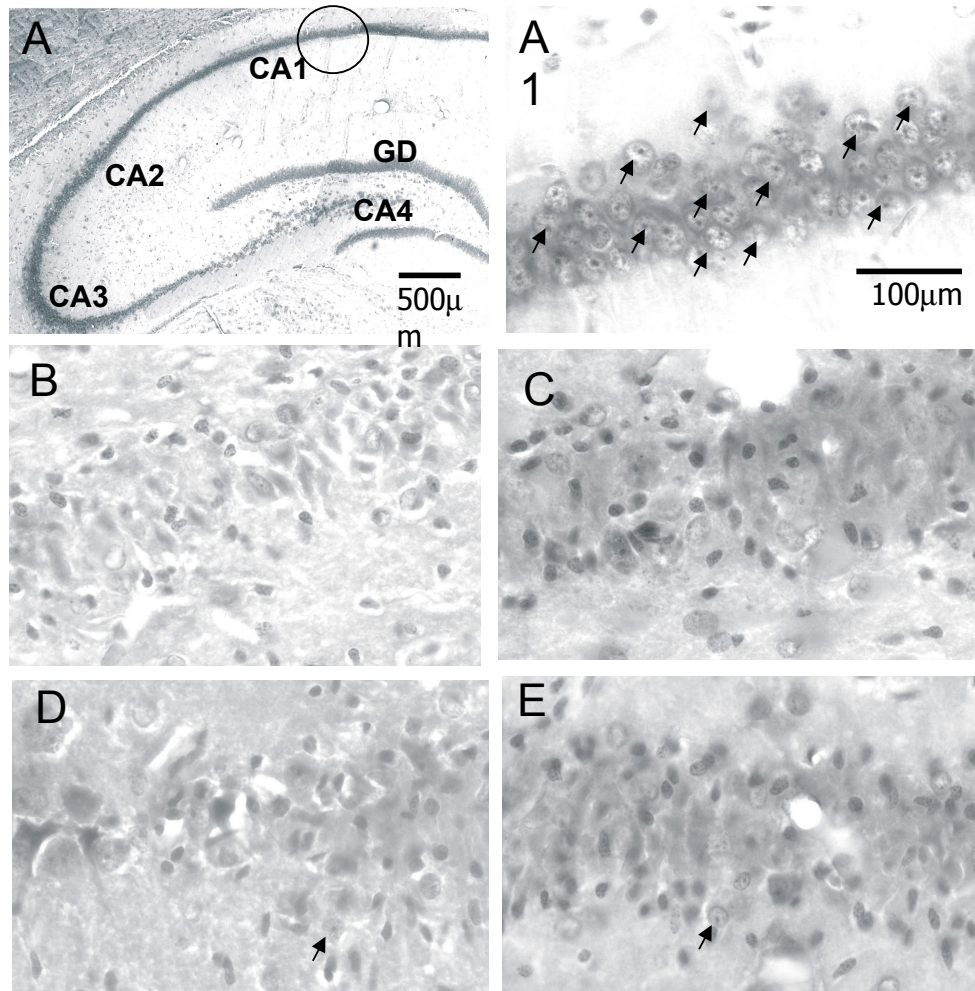


FIGURE 2. Photomicrographs of coronal sections of the hippocampus in rats subjected to: sham operation (panels **A** and **A1**); ischemia + water (panel **B**); ischemia + Tebonin (EGb 761 40 mg/kg), given for 14 days pre-ischemia (panel **C**); ischemia + Tebonin (EGb 761 40 mg/kg or 100 mg/kg), given for 14 days pre- plus 7 days post-ischemia (panels **D** and **E**, respectively). Magnifications are 50x (panel **A**) and 400x (panels **A1**, **B**, **C**, **D** and **E**). The celestine blue/acid fuchsin staining method was used. In panel **A**, the circle indicate the approximate location of the cell counts at the CA1 field. CA2, CA3 and CA4 indicate the other sectors of the hippocampus. DG = dentate gyrus. Intact-appearing pyramidal neurons are indicated by arrows in the sham-operated rats (panel **A1**), which are absent in the other groups. Bars = 500  $\mu$ m (50x) and 100  $\mu$ m (400x).

# Sustained Neuroprotection and Facilitation of Behavioral Recovery by the Ginkgo biloba Extract, EGb 761, After Transient Forebrain Ischemia in Rats

RICARDO ALEXANDRE PAGANELLI

ARCELIO BENETOLI

HUMBERTO MILANI\*

*Department of Pharmacy and Pharmacology, Health Science Center, Pharmaceutical Sciences Post-Graduation Program, State University of Maringá, Av. Colombo, 5790, CEP 87020-900 Maringá, Paraná, Brazil.*

*\*Corresponding author*

Departamento de Farmácia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, CEP 87020-900 Maringá, Paraná, Brazil.

Tel.: +55-44-32614814; FAX: +55-44-32614999; E-mail: hmilani@uem.br



## Abstract

The effects of the *Ginkgo biloba* extract, EGb 761, on ischemia-induced learning/memory impairments and hippocampal damage were evaluated in a non-food motivated, aversive radial maze task (AvRM). Rats were subjected to 15-min transient, global cerebral ischemia (TGCI). In the first experiment, rats were rendered ischemic, and 23 days later were tested for acquisition performance (post-operative training). In a second experiment, rats were trained for 10 days and then subjected to ischemia (pre-operative training); the retention of cognition performance was assessed on days 31, 34 and 39 after ischemia. Acquisition and retention performances were expressed by a) latency to find a goal box, b) number of reference memory errors, and c) number of working memory errors. EGb 761 (50 or 150 mg/kg) was given orally, starting before ischemia and continuing for up to 3 days after ischemia. TGCI markedly disrupted both acquisition and retention performance ( $p < 0.001 - 0.05$ ). EGb 761 (150 mg/kg) completely reversed acquisition impairment as measured by the parameters 'latency' and 'number of reference errors' when performance was examined across sessions ( $p < 0.01 - 0.05$ ). The total number of reference errors was also completely abolished by EGb 761 (150 mg/kg). However, EGb 761 did not statistically reduce the effects of TGCI on the parameter 'working memory errors' (across session and total). At 50 mg/kg, EGb 761 did not affect ischemia-induced acquisition impairment at all. The retention deficit caused by ischemia was not statistically reduced by EGb 761 (150 mg/kg), whatever examined across session or as total. EGb 761 reduced the extent of hippocampal CA1 cell loss ( $p < 0.01 - 0.001$ ), an effect sustained at least up to 40 days after ischemia. These findings show that EGb 761 is effective in reducing, at least partially, both the cognitive impairments and hippocampal damage after TGCI in rats, and suggest that its effect on behavioral recovery may be dissociated from the neuroprotective effect on the hippocampus. The present results

also validate the AvRM as an alternative, reliable behavioral test to assess the effects of drugs on behavioral recovery after ischemic brain damage.

**Keywords:** Cerebral ischemia, Hippocampus, Neurodegeneration, Cognitive impairments, Aversive radial maze, EGb 761, Neuroprotection, Behavioral recovery

## **Introduction**

Transient, global, cerebral ischemia (TGCI) leads to major neuropsychological dysfunctions, including learning and memory disabilities [9, 25, 30, 31, 39, 49]. In animal models of TGCI, learning and memory dysfunction have been associated to irreversible neuronal damage in vulnerable brain regions, in particular the hippocampus [28]. An amnesic syndrome, characterized as a combination of cognitive, executive and motor impairments has been described in humans after cardiopulmonary arrest [9, 25, 43], and some patients become severely disabled suffering a wide range of memory deficits and executive dysfunctions [30]. TGCI is commonly encountered in daily clinical practice, mainly due to unexpected, reversible cardiac arrest, severe hypotension or shock [12], but it can also occurs after both surgical and diagnostic procedure [39]. Thus, the search for treatments effective against such ischemia-induced neuropsychological dysfunctions is urgently needed. To this end, the use of behavioral end-points has been consistently recommended in the preclinical phase of drug development [38].

Recently, we developed a novel version of the 8-arm radial maze paradigm, which has been called the aversive radial maze (AvRM) since it works on the basis of the rat's natural behavior of avoiding open and illuminated areas, and its preference for a darkened, enclosed shelter. Compared to the conventional, appetitive radial maze, the AvRM has the advantage that it does not require food deprivation [29]. Subsequently, we modified the original AvRM from the unconfined to the confined version, thus improving its quality as a task for spatial learning and memory, and further confirmed its usefulness to study the effects of ischemic brain damage, [27, other unpublished findings]. In this study we began to use the confined

AvRM to investigate the potential effects of drugs on behavioral recovery from ischemic brain damage.

The prototypic, standardized extract obtained from the leaves of *Ginkgo biloba* L., EGb 761, may constitute a potential therapy for protection against the neurodegenerative outcome of cerebral ischemia. This notion lies partially in the wide range of biochemical effects exercised by EGb 761, including antagonism of platelet activating factor (PAF) receptors [4] and reduction in PAF levels which increase during ischemia [1], reduction in ischemia-induced, oxidative damage to the cell membrane [36], normalization of membrane phospholipid metabolism disrupted by ischemia [35], normalization of membrane  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity [32], and inactivation of NO-derived free radicals [3, 5]. The putative efficacy of EGb 761 or its active constituents in treating acute, ischemia-induced neurodegeneration is further suggested by studies performed in animal models of TGCI *in vivo*, both in gerbils [5, 6] and rats [20]. EGb 761 also reduces infarct size in models of focal cerebral ischemia [7, 22, 23]. However, other studies were unable to observe neuroprotection by both EGb 761 and their purified fractions, bilobalide or ginkgolide B, in rats subjected to TGCI [10, 22].

Despite the biochemical and histological findings supporting the putative therapeutic usefulness of EGb 761 in treating cerebral ischemia, and although it is well known that TGCI leads to learning and memory impairments, whether EGb 761 is effective in preventing ischemia-induced cognitive disruption has not been sufficiently investigated. Apparently, only two studies have evaluated the use of behavioral parameters to assess the effects of EGb 761 in promoting functional recovery after ischemic brain damage. In one, a non-standardized extract of *Ginkgo biloba*, and its flavonoid fraction, reduced the amnesic effect induced by focal ischemia in mice, as tested in a step-through, passive avoidance task applied 48 hours

after ischemia. However, morphometric assessment of brain damage was not performed [40]. In the second study, post-surgical, daily treatment with EGb 761 reduced memory impairment as assessed in the radial maze task after chronic, cerebral hypoperfusion in rats (permanent 2-VO model). Neither cortical nor hippocampal neuronal death was observed, however [26]. To our knowledge, the efficacy of EGb 761 in reducing the behavioral deficits caused by TGCI in rats has not been investigated. In contrast, it is well documented that EGb 761 improves learning and memory performances in old rats [19, 46], and reduces stress- or drug-induced cognitive impairment measured in different behavioral tasks [44, 48]. In addition, the pharmaceutical preparation Zingicomb®, a combination of *Zingiber officinale* and *Ginkgo biloba* extracts has been shown to improve learning and memory as measured either in the inhibitory avoidance task [41] or radial maze task [42], an effect that may be associated with reduction by Zingicomb of the oxidative stress in the aged brain [42]. EGb761 has also been found to increase synaptic plasticity in the hippocampus of old rats, an effect which correlates with cognitive improvement [46, 47].

Thus, and considering the sensitivity of the AvRM to detect the effects of cerebral ischemia on learning and memory of spatial tasks, our objective in the present study was to evaluate whether EGb 761 can improve recovery from learning and memory impairment caused by TGCI in rats, and whether this effect is accompanied by neuronal preservation in the hippocampus.

## Materials and Method

### 2.1 Animals

A total of 117 young-adult, male Wistar rats (inbred strain, Local Vivarium, State University of Maringá) weighing 270-300 g were used, being 36 sham-operated and 81 animals subjected to TGCI. The rats were housed in groups of three to four in plastic cages (39 x 33 x 16 cm) at a controlled temperature ( $22 \pm 1$  °C) on a 12-h light/dark cycle (lights on at 0700 hours) with constant air renewal. Food and water were offered *ad libitum*. These housing conditions were maintained until the end of the experiments.

### 2.2 Surgery

A modified 4-vessel occlusion model (4-VO) [34] was used. Briefly, under ether anesthesia, the vertebral arteries were bilaterally electrocoagulated. To avoid the risk of defective vertebral artery occlusion, the vertebral arteries were firstly severed by placing the tip of a unipolar electrode within the alar foramen and gently rotated until bleeding was produced, and then immediately stanching by electrocoagulation. In sequence, an incision at the ventral neck exposed the common carotid arteries, which were loosely snared with a silk thread. Five to six hours later, the thread was carefully tightened for a period of 15-min. Loss of the righting reflex within 2 min of carotid occlusion, unresponsiveness to gentle touch, mydriasis, and tonic extension of the paws were considered indicative of effective ischemia. Rectal temperature was monitored with a digital thermometer (Minipa, APPA MT-520, São Paulo, São Paulo, Brazil) using a rectal probe inserted to approximately 6 cm depth. Core temperature was controlled only during surgery and was kept around 37.5°C by a heating

blanket. During ischemia and reperfusion, core temperature was monitored but not controlled during the ischemic period, and up to 3.5 hours reperfusion. Sham-operated animals were subjected to the same manipulations, except for occlusion of the vertebral and carotid arteries.

### **2.3 Pharmacological Treatment**

Animals were assigned to one of the following groups: (1) sham-operation (sham), (2) ischemia + vehicle (Vehicle), (3) ischemia + EGb 761, 50 mg/kg, (EGb 50) or (4) ischemia + EGb 761, 150 mg/kg, (EGb 150). EGb 761 was dissolved in a 30% solution of polyethylene glycol (PEG400) and distilled water, and administered orally (p.o.). The first dose was delivered immediately prior to ischemia, and a second dose was administered four hours later. Treatment was continued for the next three days, on a regimen of 3 doses/day. Fresh EGb 761 solution was prepared daily. The EGb 761 was gift from Schwabe Extract GmbH & Co (KG, Karlsruhe, Germany) a process mediated by the AltanaPharma Pharmaceutical Co. (São Paulo, Brazil).

### **2.4. Apparatus**

The aversive, 8-arm, radial maze (AvRM) was used in its confined version as described elsewhere [27]. In this maze, eight arms (55 cm X 15 cm) radiate outwards from alternate sides of a central polygonal platform (71 cm across, sixteen sides). At the end of each arm, an opening 9 cm in diameter provides access to a darkened (black inside), wooden box (23 x 11 x 9.5 cm) that can be inserted and removed like a drawer below any opening, serving as a refuge for the rat (*the goal box*). Of the 8 arms, however, only one contained the true refuge,

i.e., a close-ended box, that could be shifted from one arm to another between trials. In the remaining seven arms, the boxes were open-ended, i.e., they have walls like the true goal box, but lack the bottom. When visiting a false goal box, the rat inserts its head into the open-ended box, detects the absence of the bottom, and returns to the central arena. Transparent, acrylic rails, 2.5-cm high, bordered each arm to prevent the animal from falling. The central arena is separated from the arms by transparent, acrylic guillotine doors (19 cm in height). The rotatable maze was elevated 90 cm above the floor on a metal stand. From a separate room, a pulley system is connected to each individual guillotine door, allowing the experimenter to confine the animal in the central arena before release to explore the arms. Several extra-maze cues (i.e., posters on the walls, a closed door, a window and removable, tridimensional objects) were available in the room. A small ventilator located on the floor generated constant noise in the testing room throughout the experiment. Two spotlights of 200 W each, plus a pair of ordinary, 40 W incandescent lamps were fixed to the ceiling, 180 cm above the maze. The video camera was positioned 220 cm away from, and 130 cm above, the maze. For descriptive data analysis, the 8 arms were numbered according to their location in relation to the extra-maze cues such that the sequence and frequency of visits to each different location could be recorded.

## **2.4. Behavioral procedures**

### **2.4.1. Postoperative acquisition trial (experiment 1)**

Rats were examined for acquisition performance post-operatively. Twenty days after ischemia, the animals were habituated to the testing apparatus. They were placed individually



and directly in the center of the maze which they were allowed to explore until finding the goal box, or until a 4-min period had elapsed. If the goal box was not found within 4 min, the rat was placed into the arm containing the correct goal box and gently forced to enter it by the experimenter. The rat remained in the goal box for 4 min, after which it was returned to its home cage. During habituation, the extra-maze cues were removed from the testing room, except the video camera, the pair of lamps, the door and the window. The spatial position of the goal box was randomly changed between subjects. The habituation procedure was repeated for 3 days, i.e., on days 20, 21 and 22 post-ischemia. On day 23, the extra-maze cues were replaced, and acquisition training was started. The rats were trained using three trials/session, one session per day. For training, each rat was placed into the center of the arena, all arms being closed, and the video camera was turned on. Thirty seconds later, the arms were opened simultaneously, and the animal was allowed to explore the entire maze. When the rat entered half way down a non-rewarded arm (containing a false goal box), the guillotine doors of the remaining arms were lowered simultaneously. On the rat's return to the central area, the newly-visited arm was closed immediately, and the animal was again confined in the arena for a further 30-second period. When the rat found and entered half way down the rewarded arm (containing the true goal box), the guillotine door of that arm was lowered, forcing the animal to enter the correct goal box, where it was left for 1 min. If the rat did not find the correct arm within 4 min, it was placed into it and gently introduced into the shelter. When the rat inserted only its head into an incorrect opening and remained there for more than 1 min, it was replaced at the center of the maze and the trial re-started. If an animal persisted with this behavior for more than 4 consecutive sessions (days), it was excluded from the experiment. Between trials, the maze was cleaned of excrement and randomly rotated on its central axis; the goal box was randomly moved to any of the other seven arms, although its

spatial position in relation to the extra-maze cues was kept unchanged across trials and sessions, and was the same for all rats. Behavioral performance was measured by latency to find the goal box, the number of reference memory errors, and the number of working memory errors. Within a given trial, a reference error was counted when the rat visited an arm containing a false goal box for the first time. However, if the rat returned to an arm which had been visited previously during that trial, a working memory error was registered. An arm was considered visited when the rat entered halfway down the arm. The animal was considered to have left an arm when it placed all four paws on the central platform.

#### **2.4.2. Postoperative retention trial (experiment 2)**

Naive, intact animals were habituated and trained for acquisition of the spatial task for 10 days, as in experiment 1. On the day after the last training session (day 11), the rats were subjected to either the sham-operation (Sham), ischemia + vehicle (Vehicle) or ischemia + EGb 761, 150 mg/kg (EGb 150), as described in experiment 1. The rats were allowed to recover from surgery for 20 days. On days 31, 35 and 39 post-ischemia, they were tested for retention of cognition acquired during the pre-ischemia training.

### **2.5 Histology**

One day after behavioral testing, the animals were deeply anesthetized with ether and perfused transcardiacally with 0.9% saline followed by Bouin's fixative (20 ml/min for 7-10 min). Following decapitation, the head was immersed in crushed ice (1-2 °C) for 1 h. The brain was then carefully removed and fixed in Bouin's fluid for 3 days. Eight to twelve, paraffin-embedded, coronal sections (5- $\mu$ m thickness) were taken from each brain at a level corresponding to approximately 4.52 mm posterior to bregma, and stained with

celestine blue/acid fuchsin. Three coronal sections were chosen for bilateral counts of normal-appearing neurons in the dorsal portion of the CA1 subfield. In each hemisphere, the number of intact-appearing pyramidal cells showing a distinct nucleus and nucleolus was counted along a transect 1.35 mm in length (magnification 400x, field diameter = 450  $\mu$ m, Olympus). The number of pyramidal cells for each rat was expressed as the mean of the three coronal sections. The identity of the groups was not revealed during histological assessment. All experimental procedures followed the principles set down by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the State University of Maringá, Paraná, Brazil (Protocol Number 029/2004-CEEA).

## **2.6 Statistical Analysis**

Owing to the heterogeneity of variance across ‘Session’ and ‘Trials’, a logarithmic transformation of the behavioral data was used for statistical analysis. The data for acquisition and retention performance measured across individual ‘Sessions’ (days) were analyzed using a Multifactorial Analysis of Variance for Repeated Measures (MANOVA) with Groups as the ‘between’ and Sessions as the ‘within’ subjects factors (Statistic 6.0). In the case of a significant global effect of Groups, Duncan’s Multiple Range Test was used to distinguish between means. The Kruskal-Wallis Analysis of Variance, followed by Dunn’s *post-hoc* test where appropriate, was used to compare the groups when the parameters ‘total latency’ and ‘total number of errors’ (summed across 15 acquisition trials or 3 retention trials, respectively) were computed. The results of the histological analysis were quantified by One-way ANOVA, followed by Tukey's Multiple Comparison Test. Statistical significance was defined as a *P* value  $\leq 0.05$ .

### 3. Results

Of 154 rats designed to 4-VO, 73 subjects (47.4%) died following different circumstances such as: 1) during the surgery, apparently due to the effect of anesthesia (6.8%, 5/73); 2) during the occlusion of carotid arteries by cardiorespiratory arrest and/or convulsion (31.5%, 23/73), or by accidental rupture of the carotid artery when tightening the silk thread (16.4%, 12/73); 3) within the first 48 h of reperfusion either spontaneously or after convulsion (37.0%, 27/73) and 4) some rats were sacrificed for technical or ethical reasons (8.2%, 6/73).

Figure 1 shows the effects of EGb 761 on the acquisition impairment resulting from TGCI. Examining performances across training Sessions (*upper panels*), the repeated measures ANOVA revealed a significant ‘Group’ effect on ‘latency’ ( $F_{3, 332} = 5.78$ ,  $p < 0.01$ ), ‘number of reference memory errors’ ( $F_{3, 332} = 7.25$ ,  $p < 0.001$ ) and ‘number of working memory errors’ ( $F_{3, 332} = 2.96$ ,  $p < 0.05$ ). There was also a highly significant ‘Session’ effect for all three parameters ( $F_{4, 332} = 85.24 - 155.80$ ,  $p < 0.0001$ ), and a Group vs Session interaction appeared for ‘latency’ ( $F_{12, 332} = 1.95$ ,  $p < 0.05$ ) and ‘reference errors’ ( $F_{12, 332} = 3.32$ ,  $p < 0.001$ ). Duncan’s multiple range test showed that acquisition performance was impaired for all three parameters ( $p < 0.01-0.05$ , Vehicle vs Sham) in the group subjected to TGCI and treated with vehicle alone. EGb 761 treatment at 150 mg/kg abolished the disruptive effect of ischemia on acquisition as measured by ‘latency’ ( $p = 0.019$ ) and ‘reference memory errors’ ( $p = 0.005$ , EGb 150 mg/kg vs Veh). However, working memory impairment was not significantly reduced by 150 mg/kg EGB 761 ( $p = 0.14$ ). At 50 mg/kg, EGb 761 failed to provide any behavioral protection at all. When examined using ‘total latency’ and ‘total number of errors’ summed ( $\Sigma$ ) from day 1 to day 15 of training (*lower panels*), the disruptive effect of ischemia on acquisition was also seen in all three parameters (K-W = 8.32 – 18.52,

$p < 0.01 - 0.05$ ); the ‘total latency’ and ‘total number of errors’ increased significantly in the ischemic, vehicle-treated group ( $p < 0.01 - 0.05$  vs sham). In this analysis, the restorative effect of EGb 761 (150 mg/kg) was only significant for ‘reference errors’ ( $p < 0.01$ , EGb vs Vehicle), although the mean value of ‘total latency’ was also reduced to the control level (sham) after 150 mg/kg EGb 761 (Figure 1, *lower panels*).

Figure 2 shows the effect of ischemia on retention of cognition. Animals were trained for 10 days before ischemia; during this phase, the groups assigned to each treatment did not differ from each other for the parameters ‘latency’ and ‘number of errors’ (Group effect:  $F_{2, 108} = 0.11 - 1.57$ ,  $p > 0.05$ ). In the *upper panels*, the pre-ischemic, asymptotic performances are represented by the mean for the final 3 days of training (day 8-10). Comparing the groups during the retention trials on days 31, 35 and 39, the repeated measures ANOVA revealed a significant ‘Group’ effect for ‘latency’ ( $F_{2, 54} = 9.52$ ,  $p < 0.001$ ), ‘number of reference errors’ ( $F_{2, 54} = 9.83$ ,  $p < 0.001$ ) and ‘number of working errors’ ( $F_{2, 54} = 3.40$ ,  $p < 0.05$ ). The *post-hoc* analysis revealed that retention performance in the vehicle-treated group was significantly disrupted by TGCI ( $p < 0.001 - 0.05$ , Vehicle vs Sham). This amnesic effect of TGCI was not prevented by EGb 761 ( $p > 0.05$ , EGb vs Vehicle, *upper panels*), a result unchanged when retention performance was evaluated using ‘total latency’ and ‘total number of errors’ (Fig. 2, *lower panels*). In this analysis, the amnesic effect of TGCI is clearly manifested (K-W = 8.06 – 14.96,  $p < 0.001 - 0.05$ , Vehicle vs Sham), but the restorative effect of EGb 761 was not statistically significant ( $p > 0.05$ , EGb vs Veh).

Figure 3 illustrates the effect of EGb 761 on ischemia-induced, hippocampal neurodegeneration. Fifteen minutes 4-VO induced 81.2 and 88.0% pyramidal cell loss in the hippocampus of the rats used in the acquisition and retention experiments, respectively ( $p < 0.001$  Sham vs Vehicle). The extent of CA1 cell loss decreased to 48.2% and 51.1% after

EGb 761 at 50 mg/kg and 150 mg/kg, respectively, in the acquisition experiment. In the retention experiment, the degree of CA1 neurodegeneration decreased to 63.9% after 150 mg/kg EGb 761. Thus, on average, the degree of neuroprotection by EGb 761 reached 31.6% after 50 and 150 mg/kg in the animals used for the acquisition experiment. This degree of neuroprotection was statistically significant ( $F_{3, 82} = 59.62$ ,  $p < 0.0001$ ; EGb 50/150 *vs* Vehicle:  $p < 0.001$ ). In the retention experiment, 24.1% cell preservation was found after EGb 761 (150 mg/kg), an effect also statistically significant ( $F_{2, 29} = 131.50$ ,  $p < 0.0001$ ; EGb 150 *vs* Vehicle:  $p < 0.01$ ). However, in both experiments, the degree of cell loss remained significantly high after EGb 761 treatment ( $p < 0.01 - 0.001$ , EGb *vs* Sham). There was no correlation between the number of intact-appearing pyramidal cells remaining in the CA1 region of the hippocampus and acquisition performance as measured in the rats treated with vehicle or 150 mg/kg EGb 761 ( $r = 0.070 - 0.27$ ,  $p > 0.05$ ; Vehicle  $n = 24$ , EGb 761  $n = 13$ , data not shown). Rectal temperature was unaffected by TSCI and EGb 761 in both experiments, at least up to 3.5 hours reperfusion ( $37.3 \pm 0.08 - 37.8 \pm 0.11$  °C, data not shown).

## Discussion

In the present study, rats subjected to 15 minutes TSCI suffered profound neuronal damage to the CA1 sector of the hippocampus. Further, they were impaired for acquisition and retention of cognition as measured in the aversive, non-food rewarded version of the radial maze task. These effects of ischemia may rely partially on the disruption of hippocampal-dependent information-encoding processes, memory retrieval processes, and/or on mechanisms of memory consolidation [18]. Both histological damage and acquisition

impairment caused by TGCI were reduced by daily, repeated doses of EGb 761. While a similar degree of histological neuroprotection was observed with both 50 and 150 mg/kg EGb 761, only the latter dose reversed acquisition impairment as measured by ‘latency’ and ‘number of reference errors’. The effect of EGb 761 in reducing the ischemia-induced retention deficit was less evident, despite histological neuroprotection in the hippocampus.

The present histological findings agree with those for the gerbil [5, 6] and rat models of TGCI [20]. However, we are considering the degree of neuroprotection provided by EGb 761 in the present study (28.5% in overall) as being modest. Higher levels of neuroprotection have been estimated in the gerbil model after EGb 761 (56%) [6] or Ph-Gb extracts (38.7%) [5]. In these studies, the animals were kept alive for 7 days before histological analysis. The lower degree of neuroprotection found in the present study may be a consequence of the lengthy, 40-days survival period. The degree of neuroprotection afforded by FK506 is slightly lower in rats surviving for 30 days compared to those killed 8 days after TGCI [13].

The major finding of this study concerns the reversal of ischemia-induced acquisition impairment by EGb 761. Apparently there are no reports on behavioral recovery promoted by EGb 761 in models of transient, global cerebral ischemia, in which profound, CA1 hippocampal lesioning is present. Our findings extend the protective properties of EGb 761 from the histological to the behavioral level. Curiously, while both doses (50 and 150 mg/kg) provided similar degrees of histological neuroprotection, only the 150 mg/kg dose reverses ischemia-induced acquisition impairment as measured by ‘latency’ and ‘reference memory errors’. Other components, either alone or in combination with CA1 pyramidal cells preservation, may thus account for the behavioral effects of EGb 761. For example, EGb 761 may improve cognition by acting on distinct neurotransmission systems such as noradrenergic [16, 48], cholinergic [24] and glutamatergic [45], and/or by facilitating long-term potentiation

in the hippocampus [46, 47]. Dysfunction of complex behaviors and recovery may reflect alterations at the subcellular, synaptic or electrophysiological levels, or even of widespread morphological changes that cannot be quantified by a simple cell count in a restricted region of a given structure [2]. These considerations may help to comprehend why EGb 761 at 50 mg/kg did not alter the ischemia-induced acquisition deficit at all (Fig. 1), although its histological, neuroprotective effect is similar to that at 150 mg/kg (Fig. 3). Moreover, we can not discard the possibility that the degree of neuroprotection elicited by EGb 761 in the hippocampus could differently affect restoration of each behavioral parameter in separation. For example, working memory may not necessarily be associated with long-term memory (reference memory), and there is evidence that the two types of memory may depend on different brain systems [11]. Despite this, and the lack of a behavioral vs histological correlation, EGb 761 can reduce both histological damage and functional disturbances after ischemic brain damage in rats, emphasizing its potential clinical relevance. The present findings further support the notion that EGb 761 may be of therapeutic use in cerebral ischemia.

The restorative effect of EGb 761 on retention of cognition was not statistically confirmed, in contrast to acquisition performance. However, retention performance tended to improve, and followed a consistent pattern in all three parameters, particularly reference and working memory. It is unlikely that the lack of significance for the effect of EGb 761 on retention (Figure 2) be due to the lower level of histological neuroprotection, although statistically significant (Figure 3), since no correlation between the degree of CA1 cell loss and behavioral performance has been found. However, the tendency of EGb 761 to reduce retrograde amnesia deserves consideration, since it agrees with other studies demonstrating that EGb 761 reduces the retrograde amnesia caused by chronic, cerebral hypoperfusion in rats tested in the



conventional radial maze [26]. EGb 761 also has been shown to reduce the effect of ischemia on memory retention as measured in mice assessed in the inhibitory avoidance task [40] which, in turn, agrees with data obtained in intact rats [19, 41, 42]. Our findings thus suggest that EGb 761 may also reduce the retrograde amnesia induced by TGCI. Further investigations are needed, however, to better clarify this component of ischemia-induced cognitive deficits and the effects of EGb 761 thereon.

The importance of assessing behavioral parameters in detecting the neuroprotective effect of drugs in animal models of brain injury has been emphasized by “The Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR)” [38] as major requirement prior to beginning clinical trials. This is justified by the fact that histomorphological protection does not necessarily imply recovery or preservation of function after brain damage [8]. For example, while phenobarbital provides considerable protection against ischemia-induced, hippocampal CA1 cell death, the release of acetylcholine by the cell’s presynaptic terminals remains impaired [21]. This subcellular, functional disturbance may be sufficient to cause broad behavioral impairments, despite neuronal rescue by the drug. The opposite effect also has been reported, i.e., behavioral improvement without histomorphological protection after ischemic [14] or traumatic [37] brain injury.

An important issue regarding the pharmacotherapy of brain damage concerns the therapeutic window of action, i.e., the time elapsed between the onset of ischemia and the beginning of treatment, during which the drug can be effective. In this, the first dose of EGb 761 was delivered immediately before ischemia. However, this does not invalidate its clinical usefulness in treating cerebral ischemia. Although cerebral hypoxia or ischemia occurs mainly due to unexpected, reversible cardiac arrest, hypoxic/ischemic brain damage is also often likely to occur during surgical or diagnostic procedures that may reduce or interrupt cerebral

blood flow [39]. Under such conditions of anticipated ischemic brain damage, a safe, relatively inexpensive, and orally available neuroprotective drug should be considered for prophylactic use in high-risk populations [15]. Our findings corroborate this assumption, which is further supported by other findings. For example, EGb 761 (Tanakan©) administered for 5 days pre-surgery reduces radical-induced oxidative stress in the plasma of cardiopulmonary bypass patients [33], an effect also demonstrated in the brain of animals subjected to ischemia [3, 5, 36]. Further, neuroprotective effect of EGb 761 observed here was sustained for up to at least 40 days after ischemia, suggesting a persistent rather than transient protective effect. This finding has not been reported for EGb 761 in models of cerebral ischemia.

*In conclusion, the present study shows that EGb 761 reduces ischemia-induced cognitive dysfunction as measured in the aversive, radial maze task, thus further suggesting the usefulness of the AvRM model to assess the cognitive impairments of brain damage and the effects of drugs thereon. This behavioral effect was concomitant with the sustained reduction in hippocampal neurodegeneration induced by ischemia. There was no correlation, however, between the structural and functional effects of EGb 761. Additional studies are needed to further characterize the effect of EGb 761 in improving functional recovery after ischemic brain damage, with emphasis on a) alternative dosage schedules, b) different, post-ischemic therapeutic windows, c) ischemia-induced retrograde amnesia, and d) histological assessment of other brain structures beyond the hippocampus, such as the frontal cortex and its relationship to behavior, in particular, working memory.*

## REFERENCE

- [1] Akisu M, Kultursay N, Coker K, Huseyinov A. 1998. Platelet-activating factor is an important mediator in hypoxic ischemic brain injury in the newborn rat. Flunarizine and Ginkgo biloba extract reduce PAF concentration in the brain. *Biol. Neonate* 74(6):439-444.
- [2] Aronowski J, Samways E, Strong R, Rhoades HM, Grotta JC. 1996. An alternative method for the quantitation of neuronal damage after experimental middle cerebral artery occlusion in rats: Analysis of behavioral deficits. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:705-713.
- [3] Bastianetto S, Zheng W-H, Quirion R. 2000. The *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: Involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. *J Neurochem* 74:2268-2277.
- [4] Braquet P, Esanu A, Buisine E, Hosford D, Broquet C, Koltai M. 1991. Recent Progress in ginkgolide research. *Med Res Rev* 11(3):295-355.
- [5] Calapai G, Crupi A, Firenzuoli F, Marciano MC, Squadrito F, Inferrera G, Parisi A, Rizzo A, Crisafulli C, Fiore A, Caputi AP. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract in brain ischemia are mediated by inhibition of nitric oxide synthesis. *Life Sci* 2000; 67:2673-2683.
- [6] Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B, Drieu K & Fiskum G. Neuroprotective effects of bilobalide, a component of the Ginkgo biloba extract (EGb 761), in gerbil global brain ischemia. *Brain Res* 2001;922:282-292.
- [7] Clark WM, Rinker LG, Lessow NS, Lowery SL, Cipolla MJ. Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in mice. *Stroke* 2001;32:1000-1004.
- [8] Corbett D, Nurse S. The problem of assessing effective neuroprotective in experimental cerebral ischemia. *Progr Neurobiol* 1998;54:531-548.
- [9] Cummings JL, Tomiyasu U, Read S, Benson DF. Amnesia with hippocampal lesions after cardiopulmonary arrest. *Neurology* 1984;34:679-781.

- [10] Demerlé-Pallardy C, Duverger D, Spinnewyn B, Pirotzky E & Braquet P. Peripheral type benzodiazepine binding sites following transient forebrain ischemia in the rat: effect of neuroprotective drugs. *Brain Res* 1991;565(2):312-320.
- [11] Dudchenko PA. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 2004; 28:699-709.
- [12] Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J, Chen S, Chopp M. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 1993;142(2):623-635.
- [13] Giordani F, Benetoli A, Favero-Filho LA, Lima KCM, Cestari JL, Milani H. Tacrolimus (FK506) reduces ischemia-induced hippocampal damage in rats: a 7- and 30-day study. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(4):495-502
- [14] Grotta JC, Picone CM, Ostrow PT, Strong RA, Earls RM, Yao LP, Rhoades HM, Dedman JR. CGS-19755, a competitive NMDA receptor antagonist, reduces calcium-calmodulin binding and improves outcome after global cerebral ischemia. *Ann Neurol* 1990;27(6):612-9.
- [15] Fisher M, Jonas S, Sacco RL. Prophylactic neuroprotection for cerebral ischemia. *Stroke* 1994;25(5):1075-80.
- [16] Hadjiivanova ChI, Petkov VV. Effect of Ginkgo biloba extract on beta-adrenergic receptors in different rat brain regions. *Phytother Res.* 2002;16(5):488-90.
- [18] Hodges H. Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Cogn Brain Res* 1996;3(3-4):167-181.
- [19] Hoffman JR, Donato A, Robbins SJ. *Ginkgo biloba* promotes short-term retention of spatial memory in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004;77:533-539.

- [20] Hrehorovská M, Burda J, Domoraková I, Mechírová E. Effect of Tanakan on postischemic activity of protein synthesis machinery in the rat brain. *Gen Physiol Biophys*. 2004;23(4):457-65.
- [21] Ishimaru H, Takahashi A, Ikarashi Y, Muruyama Y. Pentobarbital protects against CA1 pyramidal cell death but not dysfunction of hippocampal cholinergic neurons following transient ischemia. *Brain Res* 1995;673:112-118.
- [22] Kriegelstein J, Ausmeier F, El-Abhar H, Lippert K, Welsh M, Rupalla K, Henrich-Noack P. Neuroprotective effects of Ginkgo Biloba constituents. *Eur J Pharmaceut Sci* 1995;3: 39-48.
- [23] Lee E-J, Chen H-Y, Wu T-S, Chen, T-Y, Ayoub IA, Maynard KI. Acute administration of Ginkgo biloba extract (EGb 761) affords neuroprotection against permanent and transient focal cerebral ischemia in Sprague-Dawley rats. *J Neurosci Res* 2002;68: 636-645.
- [24] Lee TF, Chen CF, Wang LC. Effect of ginkgolides on beta-amyloid-suppressed acetylcholine release from rat hippocampal slices. *Phytother Res*. 2004;18(7):556-60.
- [25] Lim C, Alexander MP, LaFleche G, Schnyer DM, Verfaellie M. The neurological and cognitive sequelae of cardiac arrest. *Neurology* 2004;63(10):1774-8.
- [26] Lin C-C K, Cheng W-L, Hsu S-H, Chang C-M J. The effects of *Ginkgo biloba* extracts on the memory and motor functions of rats with chronic cerebral insufficiency. *Neuropsychobiology* 2003;47:47-51.
- [27] Neto CJB, Paganelli RA, Benetoli A, Lima KCM, Milani H. Permanent, 3-stage, 4-Vessel Occlusion as a Model of Chronic and Progressive Brain Hypoperfusion in Rats: A Neurohistological and Behavioral Analysis. *Behav Brain Res* 2005;160(2):116-126.

- [28] Nunn J, Hodges H. Cognitive deficits induced by global cerebral ischaemia: relationship to brain damage and reversal by transplants. *Behav Brain Res* 1994;65:1-31.
- [29] Paganelli RA, Benetoli A, Lima KCM, Favero-Filho LA, Milani H. A novel version of the 8-arm radial maze: effects of cerebral ischemia on learning and memory. *J Neurosci Meth*, 2004;132:9-18.
- [30] Peskine A, Picq C, Pradat-Diehl P. Cerebral anoxia and disability. *Brain Inj*. 2004;18(12): 1243–1254
- [31] Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F. Delayed Hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology* 1987;37:1281-1286.
- [32] Pierre S, Jamme I, Droy-Lefaix M-T, Nouvelot A, Maixent J-M. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects Na,K-ATPase activity during cerebral ischemia in mice. *Neuroreport* 1999;10:47-51.
- [33] Pietri S, Seguin JR, d'Arbigny P, Drieu K, Culcasi M. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) pretreatment limits free radical-induced oxidative stress in patients undergoing coronary bypass surgery. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1997;11(2):121-31.
- [34] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 1979;10(3):267-72.
- [35] Rabin O, Drieu K, Grange E, Chang MCJ, Rapoport SI, Purdon AD. Effects of Egb 761 on fatty acid reincorporation during reperfusion following ischemia in the brain of the awake gerbil. *Mol Chem Neuropathol* 1998;34(1):79-101.
- [36] Seif-el-Nasr M, El-Fattat AA. Lipid peroxide, phospholipids, glutathione levels and superoxide dismutase activity in rat brain after ischaemia: effect of *ginkgo biloba* extract. *Pharmacol Res* 1995;32(5):273-8.

- [37] Sinson G, Voddi M, McIntosh TK. Nerve growth factor administration attenuates cognitive but not neurobehavioral motor dysfunction or hippocampal cell loss following fluid-percussion brain injury in rats. *J Neurochem* 1995; 65:2209-2216.
- [38] Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 1999; 30:2752-2758
- [39] Sudo Y, Takahara Y, Nakajima N. Pulsatile cardiopulmonary bypass failed to prevent neuropsychological dysfunction. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2001;7(2): 89-93.
- [40] Tadano T, Nakagawasai O, Tan-no K, Morikawa Y, Takahashi N, Kisara K. Effects of *Ginkgo Biloba* Extract on impairment of learning induced by cerebral ischemia in mice. *Am J Chin Med* 1998;26(2):127-132.
- [41] Topic B, Hasenöhl RU, Häcker R, Huston JP. Enhanced conditioned inhibitory avoidance by a combined extract of *Zingiber officinale* and *Ginkgo biloba*. *Phytother Res*. 2002;16:312-315.
- [42] Topic B, Tani E, Tsiakitzis K, Kourounakis PN, Dere E, Hasenöhl RU, Häcker R, Mattern CM, Huston JP. Enhanced maze performance and reduced oxidative stress by combined extracts of *zingiber officinale* and *ginkgo biloba* in the aged rat. *Neurobiol Aging* 2002;23:135-143.
- [43] Volpe BT, Hirst W. The characterization of an amnesic syndrome following hypoxic ischemic injury. *Arch Neurol* 1983;40:436-440.
- [44] Walesiuk A, Trofimiuk E, Braszko JJ. *Ginkgo biloba* normalizes stress- and corticosterone-induced impairment of recall in rats. *Pharmacol Res*. 2006;53:123-128.
- [45] Wang S-J, Chen H-H. Ginkgolide B, a constituent of *Ginkgo biloba*, facilitates glutamate exocytosis from rat hippocampal nerve terminals. *Eur J Pharmacol*. 2005;514:141-149.

- [46] Wang Y, Wang L, Wu J, Cai J. The *in vivo* synaptic plasticity mechanism of EGb 761-induced enhancement of spatial learning and memory in aged rats. *Br J Pharmacol*. 2006; 148:147-153.
- [47] Williams B, Watanabe CMH, Schultz PG, Rimbach G, Krucker T. Age-related effects of Ginkgo biloba extract on synaptic plasticity and excitability. *Neurobiol Aging* 2004; 25:955–962.
- [48] Zhang M, Cai J. Extract of *Ginkgo biloba* leaves reverses yohimbine-induced spatial working memory deficit in rats. *Behav Pharmacol* 2005;16:651-656.
- [49] Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. *Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the Hippocampus. J Neurosci* 1986;6:2950-2967.



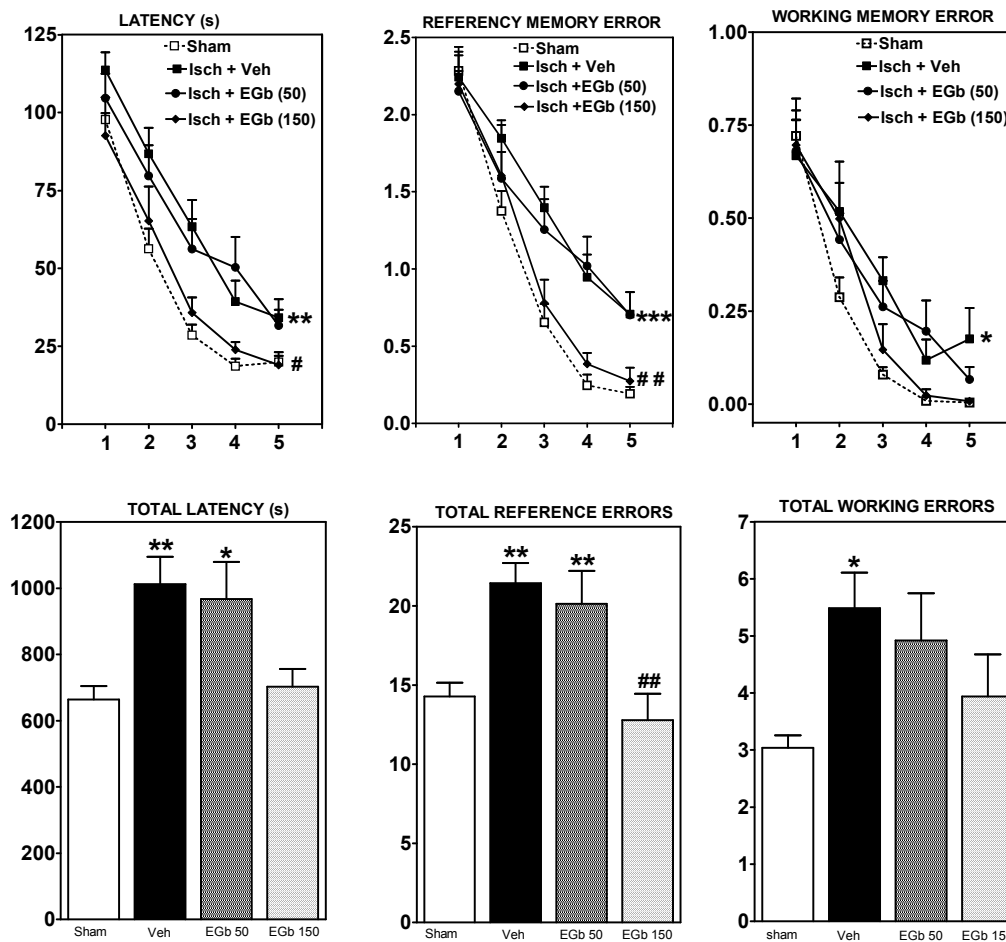


Figure 1. Effects of EGb 761 (50 and 150 mg/kg, p.o.) on acquisition performance. For each individual, the mean value obtained from three trials in each Session (day) expresses performance in terms of latency (left), number of reference memory errors (middle), and number of working memory errors (right panel). Acquisition performance was registered from day 23 to day 37 post-ischemia, and plotted as trial blocks (3 days/block, *upper panels*). Ischemia disrupted acquisition performance, an effect reverted by 150 mg/kg EGb 761. The total latency and total number of errors (mean  $\pm$  SEM) are represented in the *lower panels*.  $p^* < 0.01$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$  (Vehicle vs Sham);  $\#p < 0.05$ ;  $##p < 0.01$  (EGb vs Vehicle). Data are the group mean  $\pm$  SEM. Sample sizes: Sham = 24; Vehicle = 28; EGb (50) = 22; EGb (150) = 13.

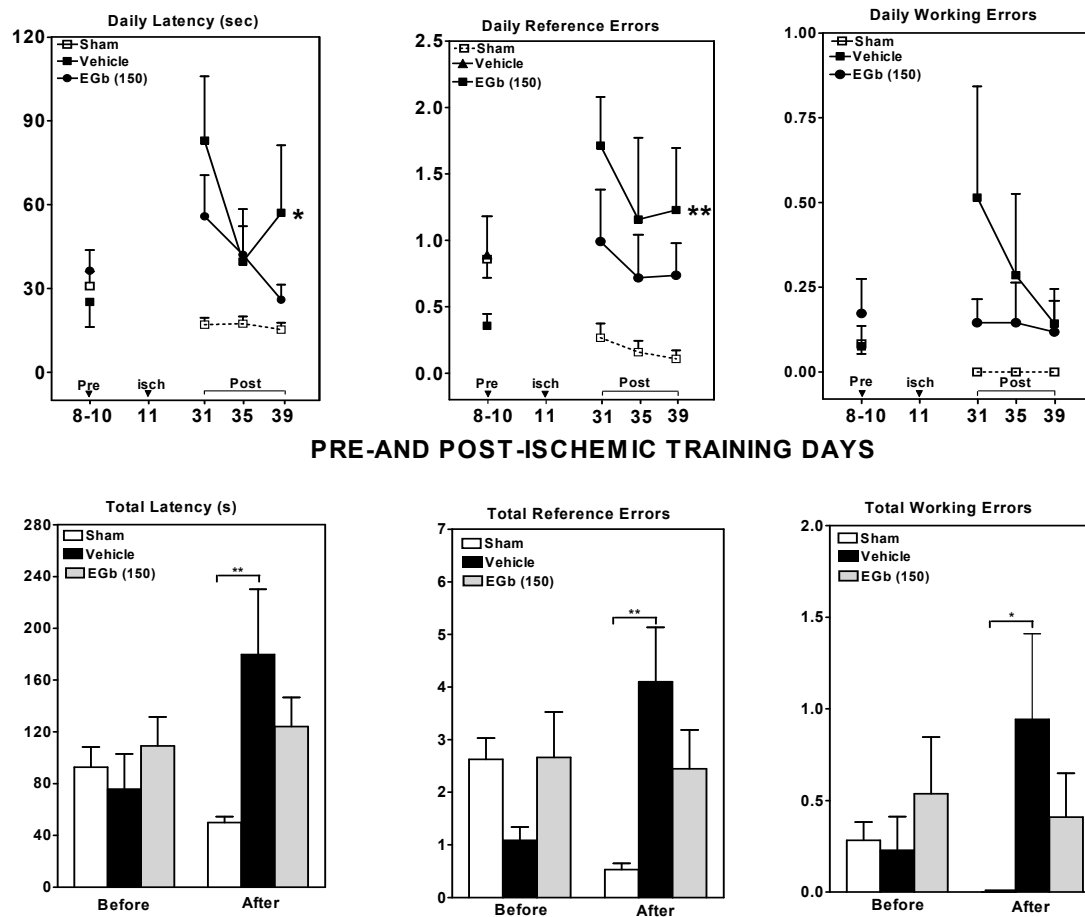


Figure 2. The effect of EGb 761 (150 mg/kg, p.o.) on ischemia-induced retention impairment. Ischemia was induced after 10 days of training (on day 11), and retention performance was assessed on days 31, 35 and 39 post-ischemia. Pre-ischemic, asymptotic performance is given as the mean for the last three days of training (days 8-10). For each individual, the mean value obtained from three trials in each Session (day) expresses the retention performance in terms of latency (left), number of reference memory errors (middle), and number of working memory errors (right panel). Retention of cognition was disrupted by TGCI as measured by all three parameters; this effect was not significantly altered by EGb 761. The total latency and total number of errors (mean  $\pm$  SEM), summed ( $\Sigma$ ) over the last 3 days of training (Pre) and the entire retention period (Post), are represented in the *lower panels*. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (Vehicle vs Sham). Values are the group mean  $\pm$  SEM. Sample sizes: Sham = 12; Vehicle = 7; EGb (150) = 11.

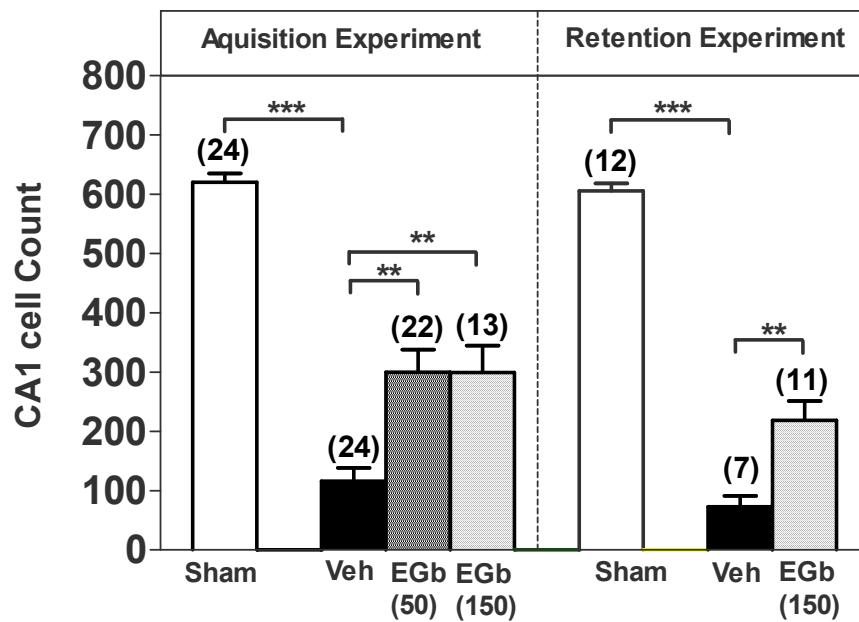


Figure 3. Effect of EGb 761 on ischemia-induced, hippocampal pyramidal CA1 cell loss. Cells were counted along a transect 1.35 mm in length. Histological analysis was performed one day after the end of behavioral testing. Values are the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ . Sample sizes are indicated in parentheses (4 brains from vehicle-treated rats in the acquisition experiment were lost during histological processing. The respective behavioral data have been excluded from the correlation analysis).