



Efeitos do extrato de *Ginkgo biloba* (EGb 761) e da natação repetida sobre a memória, ansiedade e atividade motora de ratos

Cruz, J.G.P.^{1*}; Silva, A.C.²; Lima, D.D.³; Dal Magro, D.D.¹; Muller, D.F.⁴; Cruz, J.N.⁴

¹Departamento de Ciências Naturais. Universidade Regional de Blumenau; Blumenau, SC – Brasil.

²Departamento de Nutrição. Universidade Regional de Blumenau; Blumenau, SC – Brasil.

³Departamento de Farmácia. Universidade Comunitária da Região de Chapecó; Chapecó, SC – Brasil.

⁴Departamento de Medicina. Universidade Regional de Blumenau; Blumenau, SC – Brasil.

Recebido 11/02/2010 / Aceito 10/06/2010

RESUMO

O extrato de *Ginkgo biloba* (EGb 761) e exercícios físicos isoladamente são capazes de modificar as funções cognitivas e aliviar os sintomas de ansiedade. Contudo, estes tratamentos em conjunto devem ser caracterizados. Em nossa pesquisa, verificamos que a administração oral repetida do extrato (40 ou 80 mg/kg/dia) e o exercício de natação ao qual os ratos eram submetidos causaram aumento de entradas destes animais nos braços fechados do labirinto em cruz elevado e diminuição da imobilidade dos mesmos no campo aberto, sugerindo um aumento de suas atividades motoras. Além disso, o exercício de natação aumentou a exploração no campo aberto e o tratamento com EGb 761 cancelou este efeito, sugerindo a interação entre EGb 761 e exercício de natação, provavelmente com um mesmo substrato neurobiológico capaz de minimizar a atividade exploratória em ratos nadadores. Análises comportamentais sobre o teste de reconhecimento de objetos mostraram que, quando submetidos a exercício de natação e/ou tratamento com EGb 761 durante testes de 24 horas, os ratos nadadores levaram mais tempo explorando os novos objetos do que os familiares. Estes resultados mostram que o EGb 761 e os exercícios, ambos isolados ou em conjunto, têm um poderoso efeito sobre a memória de longo-prazo. Entretanto, o proposto efeito ansiolítico do EGb 761 e de exercícios de natação pode ser questionado.

Palavras-chave: Atividade motora. Campo aberto. *Ginkgo biloba*. Memória. Labirinto em cruz elevado. Reconhecimento de objetos.

INTRODUÇÃO

Os benefícios do exercício físico ou do tratamento com o extrato de *Ginkgo biloba* (EGb 761) sobre as funções cerebrais de animais de laboratório (especificamente roedores) e humanos foram descritos, respectivamente, por Winter et al. (2007) e Woelk et al. (2007). A atividade física regular e voluntária ou o tratamento com EGb 761, por reduzirem a ansiedade, causam mudanças comportamentais que resultam em um maior enfrentamento de situações aversivas. Este fato é importante, uma vez que possibilita um tempo de permanência maior nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (Ward et al., 2002; Duman et al., 2008). Entretanto, alguns estudos mostram que o treinamento físico ou tratamento com EGb 761 não reduzem a ansiedade em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado (Burghardt et al., 2004; Walesiuk et al., 2005). Estudos sobre memória e aprendizagem de ratos mostram que as atividades físicas, bem como o tratamento com EGb 761, facilitam a percepção de como encontrar a plataforma submersa no labirinto aquático (Wang et al., 2006; Alaei et al., 2008) e estimulam a memória durante o teste de reconhecimento de objetos (Walesiuk et al. 2005; Cruz et al., 2009). Dentro deste contexto, recentes estudos têm sugerido a possibilidade de se fazer uma relação entre a região basolateral da amígdala e os estados emocionais, de forma a modular atividades cognitivas relacionadas ao hipocampo. Sendo assim, drogas ansiolíticas dificultam as respostas comportamentais relacionadas à memória e aprendizagem (Packard, 2009). Apesar dos mencionados benefícios do treinamento físico ou do tratamento com EGb 761, a combinação destes procedimentos ainda é desconhecida. Neste sentido, nosso estudo procura demonstrar os efeitos do tratamento crônico com EGb 761 sobre a ansiedade, atividade motora e memória de ratos nadadores.

Autor correspondente: José Geraldo Pereira da Cruz - Departamento de Ciências Naturais - Universidade Regional de Blumenau - R. Antônio de Veiga, 140, CEP.89010-971 - Blumenau, SC, Brasil - e-mail: jgcruz@furb.br - tel./fax +55 (47) 33210233

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Os testes foram feitos com ratos machos da linhagem Wistar, de 3 meses de idade e procedentes do biotério central da Universidade Regional de Blumenau (SC). Os animais foram alimentados com ração padrão e água *ad libitum* e mantidos em gaiolas coletivas com 5 animais, a $21 \pm 1^\circ\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal de acordo com orientações institucionais.

Exercício de Natação

Os ratos foram divididos em 2 grupos, sendo um de ratos sedentários e outro de nadadores. Os ratos do grupo dos nadadores foram treinados para nadar por 30 minutos/dia, 5 dias por semana, durante 8 semanas. Este exercício corresponde a uma intensidade abaixo do limiar anaeróbico (Gobatto et al., 2001). O grupo dos sedentários foi manipulado exatamente da mesma forma como o grupo dos nadadores, em um mesmo período de tempo e sem realizar a natação, sendo colocados na água rasa e utilizados como controle.

Protocolo Experimental

Foi utilizada nos experimentos a solução comercial de extrato de *Ginkgo biloba*, denominada EGb 761 (Tebonin®, Nycomed Pharma Ltda., Jaguariúna, SP, Brasil). Ela é uma mistura de compostos ativos, incluindo substâncias flavanóides e terpenóides obtidas de folhas verdes de *Ginkgo biloba* (Kleijnen & Knipschild, 1992). Os ratos receberam tratamento crônico com salina ou EGb 761 (40 ou 80 mg/kg/dia por via oral) nos últimos 30 dias do treinamento de natação. Os animais foram divididos em 6 grupos para cada protocolo comportamental, estando assim distribuídos: controle + salina (0 mg/kg/dia de EGb 761; n = 10), controle + EGb 761 (40 mg/kg/dia; n = 10), controle + EGb 761 (80 mg/kg/dia; n = 10), exercício + salina (0 mg/kg/dia de EGb 761; n = 10), exercício + EGb 761 (40 mg/kg/dia; n = 10) e exercício + EGb 761 (80 mg/kg/dia; n = 10). Após 24 horas do último tratamento, os animais foram submetidos, individualmente, aos testes comportamentais em uma sala com isolamento acústico e iluminado por uma lâmpada vermelha (60 Watts) situada a 150 cm acima dos aparatos.

Teste do labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado é formado por dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços opostos, ambos do mesmo tamanho, e fechados com paredes laterais de 40 cm de altura. Os braços abertos e fechados, elevados 50 cm do solo, cruzavam-se perpendicularmente formando uma cruz, delimitada por uma área central de 10 x 10 cm. Cada animal foi exposto durante cinco minutos ao labirinto em cruz elevado (Pellow et al., 1985). Neste período, foram

observados o número de entradas e o tempo gasto em ambos os braços e no quadrante central.

Teste do campo aberto

O teste no campo aberto consistiu na mensuração das variáveis comportamentais dos indivíduos experimentais colocados em uma arena limitada por uma parede circular de 50 cm de altura e 280 cm de diâmetro (Walsh & Cummins, 1976). Para testar a atividade exploratória e locomotora, os animais foram colocados no campo aberto para livre exploração por 5 minutos. Neste momento, foram anotados os tempos de execução das seguintes categorias comportamentais: motilidade (movimentação voluntária), imobilidade (ficar imóvel), exploração (elevar os membros superiores, apoiado nos inferiores) e autolimpeza (passar os membros superiores sobre a cabeça).

Teste de reconhecimento de objetos

Quando os roedores são apresentados a objetos familiares e novos, eles passam a maior parte do tempo explorando o novo objeto. Este comportamento típico tem sido utilizado para desenhar um paradigma comportamental conhecido como tarefa de reconhecimento de objetos (Ennaceur & Delacour, 1988). O teste de reconhecimento de objetos foi realizado em uma caixa de madeira circular com 280 cm de diâmetro e 50 cm de altura. Todos os animais foram habituados ao ambiente durante 4 dias, tendo 5 minutos por dia para livre exploração do aparato na ausência de objetos. Os objetos feitos de vidro foram fixados à arena com fita adesiva. Após tratamento crônico com salina ou EGb 761, os animais foram colocados na arena, contendo dois objetos idênticos (A e B), para livre exploração por 5 minutos. O teste foi repetido 2 horas depois para avaliar a memória de curta duração (MCD) e 24 horas depois do treino para testar a memória de longa duração (MLD). Nos testes, um dos objetos foi substituído por outro (C, para MCD ou D, para MLD) e o rato foi colocado na arena por mais 5 minutos. As posições dos objetos (familiar e novo) foram randomizadas e a arena foi limpa entre um teste e outro. A Exploração ocorreu quando os animais cheiravam ou tocavam o objeto com o nariz ou as patas dianteiras. O tempo gasto explorando cada objeto foi marcado por um observador que desconhecia o tratamento recebido pelo animal e foi expresso em total de tempo de exploração computado em segundos, permitindo determinar a razão de discriminação estabelecida a partir da proporção de tempo de exploração do objeto novo em relação ao objeto familiar ($t_{\text{novo}}/t_{\text{novo}} + t_{\text{familiar}}$).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e submetidos à análise de variância (ANOVA tests), em que foram comparados os grupos de sedentários com os de nadadores submetidos aos diferentes tratamentos com salina ou EGb 761, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls. Um nível de significância menor do que 5% foi utilizado em todas as análises comportamentais realizadas individualmente ($p < 0,05$).

RESULTADOS

No teste de labirinto em cruz elevado, a análise de variância revelou significativas diferenças em relação ao tempo de permanência no quadrante central ($F_{5,55} = 4.414$; $p = 0,021$) entre o grupo de ratos que realizaram exercício de natação e foram tratados cronicamente com EGb 761 (40 ou 80 mg/kg/dia) e os demais, mas não mostrou diferenças significativas no que se refere ao tempo de permanência

dos animais nos braços abertos ($F_{5,55} = 1.140$; $p = 0,3512$) e fechados ($F_{5,55} = 0.7957$; $p = 0,5577$; Figura 1A). A análise de variância também mostrou diferenças significativas quanto ao número de entradas nos braços fechados entre os ratos nadadores tratados com EGb 761 ($F_{5,55} = 6.295$; $p = 0,001$) em relação aos animais controles ou nadadores tratados com veículo, mas não mostrou diferenças no que se refere ao número de entradas nos braços abertos ($F_{5,55} = 1.713$; $p = 0,1474$; Figura 1B).

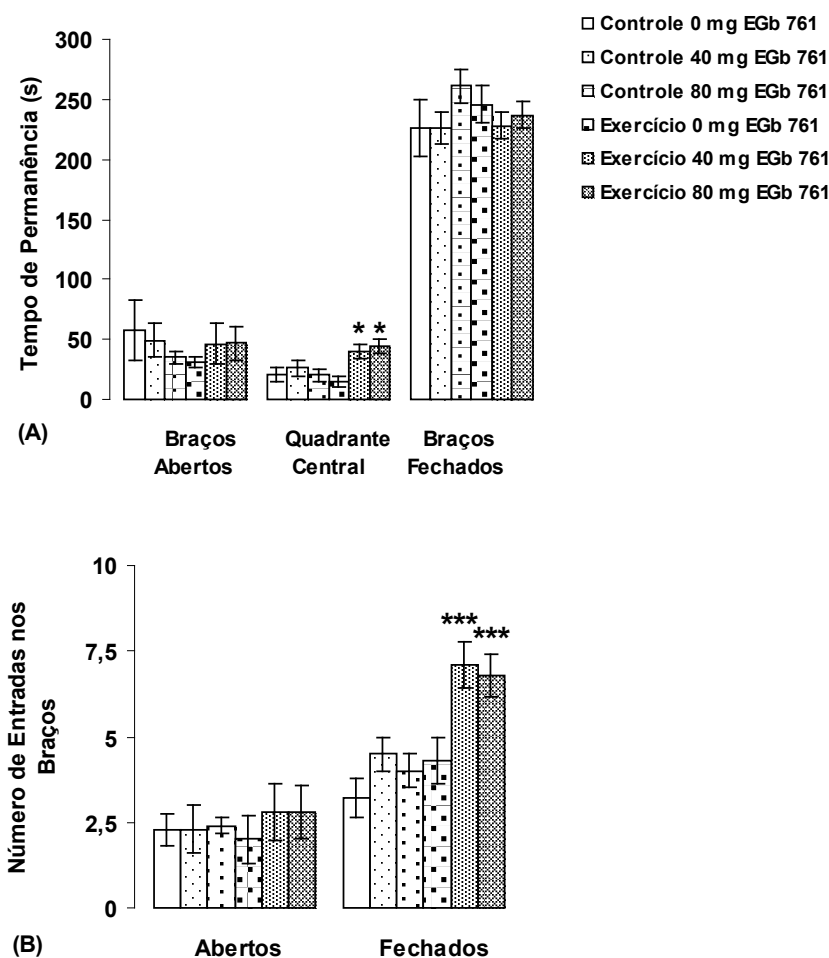


Figura 1. Respostas comportamentais no labirinto em cruz elevado de ratos controles submetidos ao exercício de natação após tratamento crônico com EGb 761. (A) Tempo de permanência nos braços abertos, fechados e no quadrante central. (B) Número de entradas nos braços abertos e fechados. As linhas verticais representam o erro padrão da média; as barras representam a média dos grupos de camundongos ($n = 10$; * $p = 0,021$; *** $p = 0,001$; teste de Newman-Keuls).

No teste de campo aberto, a análise de variância sobre os ratos nadadores tratados cronicamente com EGb 761 mostrou aumento significativo quanto ao tempo de motilidade ($F_{5,55} = 14.164$; $p = 0,01$) e redução no que se refere ao tempo de imobilidade ($F_{5,55} = 6.997$; $p = 0,01$), dados muito mais relevantes do que os apresentados pelos demais grupos experimentais (Figura 2A). A análise de variância também mostrou diferenças significativas quanto ao tempo de exploração de ratos nadadores tratados com salina ($F_{5,55} = 8.575$; $p = 0,001$), mas não mostrou diferenças em relação ao tempo de autolimpeza ($F_{5,55} = 1.878$; $p = 0,1138$) quando relacionados aos diferentes tipos

de tratamentos estabelecidos para os ratos controle e que realizaram exercício de natação (Figura 2B).

No teste de reconhecimento de objetos, a análise de variância mostrou diferenças significativas quanto à razão de discriminação 24 horas após o pré-teste ($F_{5,55} = 4.392$; $p = 0,02$). Os ratos controles e nadadores tratados com EGb 761 (40 ou 80 mg/kg/dia) ou nadadores tratados com salina, quando comparados ao grupo controle tratado com salina (Figura 3), apresentaram diferenças na razão de discriminação para o teste realizado 24 horas (memória à longo prazo), mas não após 2 horas ($F_{5,55} = 1.894$; $p > 0,05$; memória à curto prazo), quando comparados ao grupo

controle tratados com salina (Figura 3). O teste de Newman-Keuls mostrou não haver diferenças significativas entre

os ratos controles e/ou nadadores tratados com EGb 761 ($p > 0,05$).

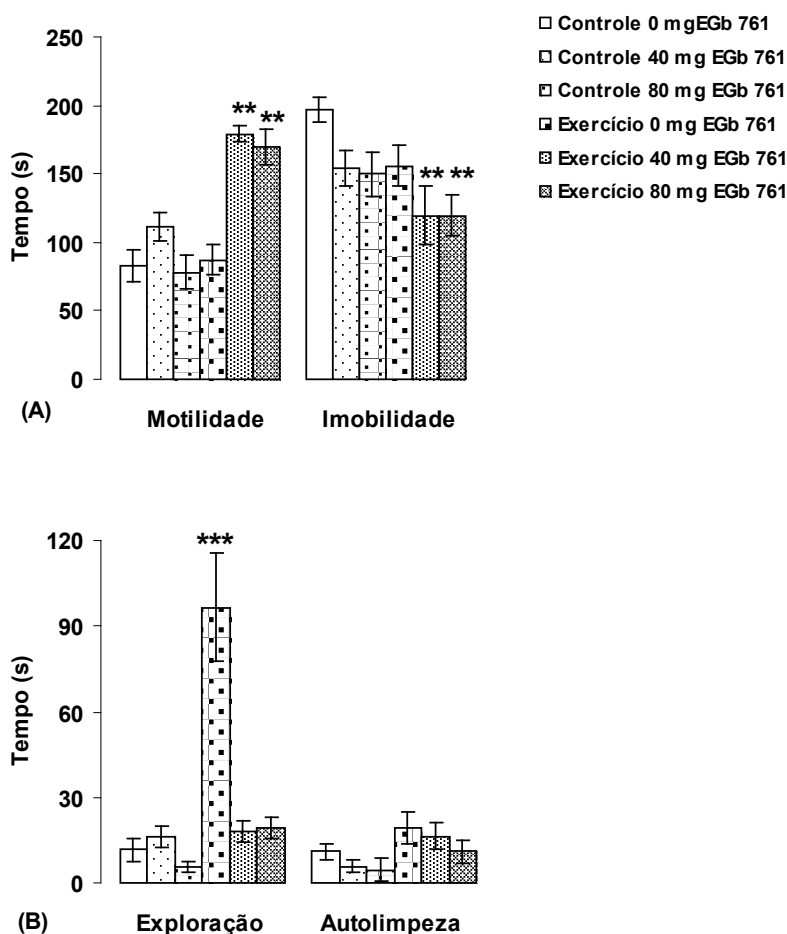


Figura 2. Respostas comportamentais no campo aberto de ratos controles submetidos ao exercício de natação após tratamento crônico com EGb 761. (A) Tempo de motilidade e imobilidade. (B) Tempo de exploração e autolimpeza. As linhas verticais representam o erro padrão da média; as barras representam a média dos grupos de camundongos ($n = 10$; ** $p = 0,01$; *** $p = 0,001$; teste de Newman-Keuls).

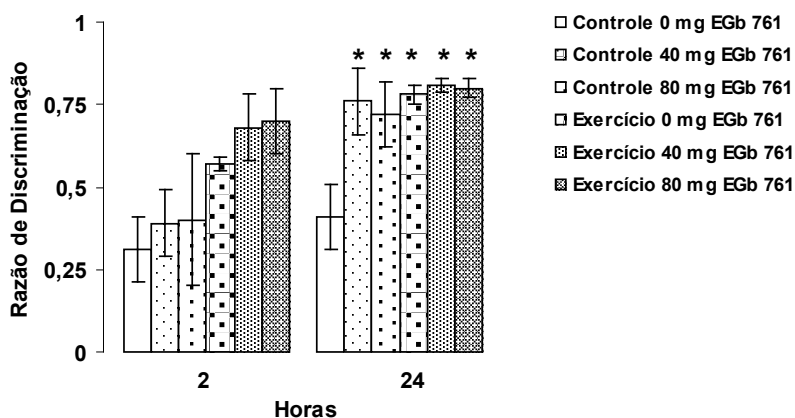


Figura 3. Razão de discriminação (tnovo/tnovo + tfamiliar) no teste de reconhecimento de objetos de ratos controles e submetidos ao exercício de natação após tratamento crônico com EGb 761. As linhas verticais representam o erro padrão da média; as barras representam a média dos grupos de camundongos ($n = 10$; * $p = 0,02$; teste de Newman-Keuls).

DISCUSSÃO

Muitas mudanças comportamentais que ocorreram após atividade física ou tratamento com EGb 761 foram estudadas em modelos animais de ansiedade (Ward et al., 2002; Ang et al., 2006; Clark et al., 2008; Duman et al., 2008; Mallet et al., 2009). Apesar dos mencionados benefícios do treinamento físico ou do tratamento com EGb 761, a implicação da combinação destes procedimentos ainda é desconhecida. Nossos experimentos indicam que ratos sedentários e/ou nadadores submetidos ao tratamento crônico com EGb 761 não apresentam diferenças estatisticamente significativas quanto ao tempo e ao número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, parâmetros relacionados ao grau de ansiedade (Pellow et al., 1985). Estas observações se opõem aos efeitos ansiolíticos do exercício físico voluntário e do tratamento com EGb 761 obtidos por outros pesquisadores (Ward et al., 2002; Duman et al., 2008). Os mesmos resultados foram obtidos anteriormente através de ratos submetidos ao exercício físico ou tratamento com EGb 761 (Burghardt et al., 2004; Walesiuk et al., 2005). Nestes experimentos, o exercício de natação ou tratamento crônico com EGb 761 não foram capazes de reduzir o estresse basal responsável pela ansiedade. Coletivamente, as pesquisas indicam que os mecanismos relacionados ao antiestresse nas respostas ansiolítica da atividade física e/ou tratamento com EGb 761 apresentam uma forma diferente na mediação de suas ações em relação aos clássicos ansiolíticos e antidepressivos (Porsolt et al., 1990; Woelk et al., 2007). Estes resultados sugerem a possibilidade de o exercício físico ou EGb 761 produzirem diferentes efeitos sobre os índices de ansiedade no labirinto em cruz elevado de acordo com o tipo de protocolo experimental que os animais forem submetidos.

Apesar de o tratamento com EGb 761 (40 ou 80 mg/kg/dia) não induzir efeitos ansiolíticos, nossos resultados mostram um aumento em relação ao tempo de permanência no quadrante central e ao número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado nos ratos nadadores tratados cronicamente com EGb 761, indicando um aumento no conflito/avaliação de risco e na atividade motora (Figura 1). A existência da plataforma central no labirinto é a oportunidade de escolha que este aparelho oferece entre as áreas protegidas e desprotegidas. Esta plataforma central tem sido frequentemente associada à tomada de decisão ou conflito aproximação/esquiva, que seriam indicativos do conflito associado à situação e à avaliação de risco (Rodgers et al., 1997). Os testes realizados no campo aberto reforçam os resultados obtidos no labirinto em cruz elevado, indicando um aumento na atividade motora. Os ratos nadadores tratados com EGb 761 aumentam o tempo de movimentação espontânea com a conseqüente diminuição do tempo de imobilidade (Figura 2A). O teste do campo aberto também mostrou um aumento quanto ao tempo de exploração dos ratos nadadores tratados com salina, sendo este efeito bloqueado pelo tratamento crônico com EGb 761 (Figura 2B). Este fato sugere um compartilhamento de mecanismos neurais comuns, ao menos parciais, decorrentes da ativação de mecanismos responsáveis pelos processos neurobiológicos

básicos que aumentam a atividade exploratória e a movimentação espontânea. Apesar dos mencionados efeitos comportamentais do treinamento físico e do tratamento com EGb 761, a neuroquímica na combinação destes procedimentos ainda é desconhecida.

Algumas pesquisas sugerem que a dopamina seria um dos neurotransmissores responsáveis pelas modificações na atividade motora. Blecharz-Klin et al. (2009) mostraram um aumento da atividade motora de ratos idosos tratados cronicamente com EGb 761, que apresentaram elevação nos níveis de dopamina no estriado e hipocampo. Também foi mostrado que o tratamento crônico com EGb 761 é capaz de elevar as concentrações de dopamina no córtex pré-frontal de ratos (Yoshitake et al., 2010). Assim, o aumento na atividade motora de ratos nadadores tratados cronicamente com EGb 761 sugere modificações na atividade dopaminérgica. Outro neurotransmissor envolvido nas respostas comportamentais no tratamento crônico com EGb 761 é a serotonina (5-HT). O tratamento crônico com EGb 761 aumenta as concentrações de 5-HT no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos, estruturas envolvidas com a memória e flexibilidade comportamental (Blecharz-Klin et al., 2009), possivelmente em conseqüência da inibição da enzima monoamina oxidase (Rojas et al., 2004).

Nossos resultados também mostram que o exercício de natação e/ou tratamento crônico com EGb 761 modificam de forma significativa a memória de ratos submetidos ao teste de reconhecimento de objetos. Ratos sedentários tratados com EGb 761 ou nadadores tratados com salina ou EGb 761 aumentam a razão de discriminação 24 horas após o pré-teste, sugerindo um aumento na memória a longo prazo (Figura 3). Estes resultados estão de acordo com os obtidos em outros estudos. A atividade física ou EGb 761 melhora a memória no teste de reconhecimento de objetos (Walesiuk et al. 2005; Cruz et al., 2009), possivelmente através do aumento na atividade do sistema colinérgico (Taylor, 1986; Ang et al., 2006). Entretanto, segundo análise estatística, não há diferenças significativas entre os ratos nadadores tratados com salina ou EGb 761, mostrando que o exercício físico não causa nenhum benefício na aquisição de informações em ratos tratados com EGb 761, mas com efeitos semelhantes sobre a memória a longo prazo. Isso pode se dever, em parte, ao fato de estes animais já possuírem uma memória normal. Existe um consenso de que a memória dos indivíduos normais, incluindo crianças, adultos e animais experimentais, funciona o tempo todo ao máximo de sua capacidade possível, de acordo com a modulação das vias nervosas (Izquierdo, 2003).

Apesar de alguns estudos terem mostrado resultados promissores no que diz respeito aos efeitos ansiolíticos quando os animais são expostos à atividade física ou tratamento com EGb 761 (Ward et al., 2002; Duman et al., 2008), nossos dados sugerem que estes efeitos não podem ser generalizados. Entretanto, ratos nadadores tratados cronicamente com EGb 761 aumentam a atividade motora, o conflito/avaliação de risco e melhoram os processos cognitivos. Estes resultados levantam questões sobre os efeitos da combinação entre atividade física e tratamento crônico com EGb 761 na neuroquímica do cérebro e suas aplicações clínicas.

ABSTRACT

Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and repeated swimming on memory, anxiety and motor activity of rats

Either ingestion of a *Ginkgo biloba* proprietary extract (EGb 761) or physical exercise can enhance cognitive functioning and alleviate symptoms of anxiety; however, their combined effects have yet to be characterized. Rats subjected to repeated oral administration of the extract (40 or 80 mg/kg/day) and swimming exercise exhibited an increased number of closed-arm entries in the elevated plus-maze and decreased immobility in the open field, suggesting an increase in motor activity. In addition, the exercise of swimming increased the exploration of the open field and chronic treatment with EGb 761 could cancel this effect; this indicates interaction between EGb 761 and swimming exercise, which may show a common neurobiological substrate, capable of reducing exploratory activity in swimming rats. Analysis of behavior in the object-recognition test showed that rats subjected to swimming exercise and/or treatment with EGb 761, during tests of 24 hours, spent more time exploring novel objects than familiar ones. These results show that EGb 761 and/or physical exercise have powerful effects on long-term memory. However, the proposed anxiolytic characteristics of EGb 76 and swimming exercise may be questioned.
Keywords: *Ginkgo biloba*. Memory. Motor activity. Elevated plus-maze. Object recognition. Open field.

REFERÊNCIAS

Alaei H, Moloudi R, Sarkaki AR. Effects of treadmill running on mid-term memory and swim speed in the rat with Morris water maze test. *J Bodyw Mov Ther.* 2008; 12:72-5.

Ang ET, Dawe GS, Wong PT, Moochhala S, Ng YK. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Res.* 2006;1113:186-93.

Blecharz-Klin K, Peiechal A, Joniec I, Pyrzanowska J. Pharmacological and biochemical effects of *Ginkgo biloba* extract on learning, memory consolidation and motor activity. *Acta Neurobiol Exp.* 2009; 69:217-31.

Burghardt PR, Fulk LJ, Hand GA, Wilson MA. The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. *Brain Res.* 2004;1019:84-96.

Clark PJ, Brzezinska WJ, Thomas MW, Ryzhenko NA, Toshkov SA, Rhodes JS. Intact neurogenesis is required for benefits of exercise on spatial memory but not motor performance or contextual fear conditioning in C57BL/6J mice. *Neuroscience* 2008; 155:1048-58.

Cruz JGP, Dal Magro DD, Cruz JN, Roecker R. Efeitos da administração aguda de etanol sobre a aprendizagem no reconhecimento de objetos em camundongos nadadores. *Rev Eletr Farm.* 2009;6:123-38.

Duman CH, Schlesinger L, Russel DS, Duman RS. Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. *Brain Res.* 2008;1199:148-58.

Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I: Behavioral data. *Behav Brain Res.* 1988;31:47-59.

Gobatto CA, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001;130:21-7.

Izquierdo I. Questões sobre memória. São Leopoldo: Editora Unisinos; 2003.

Kleijnen J, Knipschild P. *Ginkgo biloba*. *Lancet* 1992;340:1136-9.

Mallet PE, Moore CA, Collie MT, Satvat E. Regional distribution of *Ginkgo biloba*-induced c-Fos immunoreactivity. *Phytomedicine* 2009;16:361-8.

Packard MG. Anxiety, cognition, and habit: a multiple memory systems perspective. *Brain Res.* 2009;1293:121-8.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985; 14:149-67.

Porsolt RD, Martin P, Lenègre A, Fromage S, Drieu K. Effects of an extract of *Ginkgo biloba* (EGb 761) on learned helplessness and other models of stress in rodents. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990;36:963-71.

Rodgers RJ, Cao GJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res.* 1997;30:289-304.

Rojas P, Rojas C, Ebadi M, Monstes S, monroy-Noyola A, Serrano-Garcia N. EGb 761 pretreatment reduces monoamine oxidase activity in mouse corpus striatum during 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity. *Neurochem Res.* 2004;29:1417-23.

Taylor JE. Neuromediator binding to receptors in the rat brain. The effect of chronic administration of *Ginkgo biloba* extract. *Presse Med.* 1986;15:1491-3.

Walesiuk A, Trofimiuk E, Braszko JJ. *Ginkgo biloba* extract diminishes stress-induced memory deficits in rats. *Pharmacol Rep.* 2005;57:176-87.

Walsh RN, Cummins RA. The open-field test: a critical review. *Psychol Bull.* 1976; 83:482-504.

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;148:147-53.

Ward CP, Redd K, Williams BM, Caler JR, Luo Y, McCoy JG. *Ginkgo biloba* extract: cognitive enhancer of antistress buffer. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002;72:913-22.

Winter B, Breitenstein C, Mooren FC, Voelker K, Fobker M, Lechtermann A, Krueger K, Fromme A, Korsukewitz C, Floel A, Knecht S. High impact running improves learning. *Neurobiol Learn Mem.* 2007;87:597-609.

Woelk H, Arnoldt KH, Kieser M, Hoerr R. *Ginkgo biloba* special extract EGb 761® in generalized anxiety disorder and adjustment disorder with anxious mood: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Psychiatric Res.* 2007;41:472-80.

Yoshitake T, Yoshitake S, Kehr J. The *Ginkgo biloba* extract EGb 761® and its main constituent flavonoids and ginkgolides increase extracellular dopamine levels in the rat prefrontal cortex. *Br J Pharmacol.* 2010;159:659-68.

