

Artículo de investigación

El ácido valproico tiene efecto neuroprotector en un modelo de estrés oxidativo agudo en ratas.

Valproic acid has neuroprotective effect in an acute model of oxidative stress in rats.

Loureiro NE., Garay JL., Hernández de G MM.

Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Decanato de Ciencias de la Salud. Unidad de Investigación en Fisiología. Laboratorio de Fisiología Celular. E-mail: loureiro@ucla.edu.ve

Resumen

El exceso de producción de radicales libres en el cerebro ha sido implicada como un factor común en la patogénesis de un gran número de procesos neurodegenerativos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, y en la isquemia/reperfusión cerebral. El ácido valproico (VPA) que tradicionalmente ha sido utilizado como fármaco antiepiléptico, actualmente se propone como agente neuroprotector, pero aún no está claro cual es su mecanismo de acción. En esta investigación se probó su efecto en un modelo de estrés oxidativo agudo en ratas Sprague Dawley para lo cual se usó el sulfato de hierro como agente inductor de daño y se cuantificó la peroxidación lipídica y proteínas carboniladas en corteza cerebral, demostrándose que bloqueó la formación de radicales libres. Los niveles de malondialdehído en la corteza cerebral que recibió la agresión oxidativa en el grupo de animales tratados con VPA fueron 57% inferiores en relación al grupo control que no recibió VPA, mientras que la cantidad de proteínas carboniladas fue un 65% inferior en la corteza cerebral de los animales experimentales en comparación al grupo control. Adicionalmente se encontró que el efecto antioxidante exhibido por el VPA, fue igual de significativo al presentado por la vitamina E.

Palabras clave: ácido valproico, radicales libres, corteza cerebral, neuroprotección.

Abstract

The excess of the free radical production at has been implied has a common factor in pathogenesis of a big number of neurodegenerative processes, including Alzheimer's and Parkinson's disease and in ischemia/reperfusion induced brain damage. Valproic Acid (VPA), which traditionally has been used as an antiepileptic drug, now is proposed as a neuroprotective agent, but is not clear it's mechanisms of action. In this paper, its effect was investigated in an acute oxidative stress model with Sprague Dawley rats, in which iron sulfate was used as injury and lipid peroxidation and carbonylated proteins were quantified at cerebral cortex, showing that it blocked formation of free radicals. Levels of MDA at cerebral cortex that received oxidative injury in the group of animals treated with VPA were 57% lower in comparison to control group, also the amount of carbonylated proteins was 65% lower in the cerebral cortex of experimental animals in contrast to control group. Furthermore, it was found that the antioxidant effect showed by the VPA, was equally significant than showed by vitamin E.

Key words: valproic acid, free radicals, cerebral cortex, neuroprotection.

Recibido: 15-01-2015.

Aceptado: 29-06-2015.

INTRODUCCIÓN

En condiciones normales las células producen pequeñas cantidades de radicales libres a nivel de las mitocondrias como producto del metabolismo del oxígeno molecular durante el transcurso de la fosforilación oxidativa, lo cual lleva a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), también denominados radicales libres derivados del oxígeno molecular. Los sistemas antioxidantes de la células están constituidos en primera línea por los drenadores de radicales libres tal como el tocoferol (vitamina E), la vitamina C, coenzima Q, carotenoides y flavonoides y en segunda línea los sistemas enzimáticos que metabolizan los radicales libres tales como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa y que con la ayuda del glutatión mantienen un balance fisiológico y una homeostasis REDOX. La falla de estos mecanismos, o la producción excesiva de oxidantes por encima de la capacidad amortiguadora de la célula, produce estrés oxidativo que ocasiona grandes daños en cualquier tipo celular [1].

El cerebro es especialmente susceptible a los ataques cometidos por ROS. Esto es porque el cerebro es el mayor metabolizador de oxígeno (20 % del consumo de cuerpo) y por otro lado tiene mecanismos protectores antioxidantes relativamente débiles. Adicionalmente tiene una gran cantidad de componentes estructurales que coadyuvan como son los ácidos grasos polinsaturados peroxidizables en la membranas celulares; altos niveles de hierro que actúan como agente prooxidante sobretudo en los procesos de defensa inmunológica y la presencia de sinapsis químicas formadoras de gran cantidad de ROS como la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica [2]. El exceso de producción de radicales libres en el cerebro ha sido implicado como un factor común en la patogénesis de un gran número de procesos neurodegenerativos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, y en la isquemia/reperfusión cerebral. Esta última, es uno de los procesos más frecuente de incapacidad y de mortalidad en todo el mundo (2). Las ROS

pueden dañar proteínas, ácidos nucleicos, y peroxidación de lípidos en las membranas celulares, conduciendo a la pérdida de integridad celular y del potencial de la membrana mitocondrial [3,4].

Se ha postulado que el uso de dietas ricas en antioxidantes naturales tales como polifenoles, compuestos isoprenoides y vitaminas reducen los efectos deletéreos de las ROS [5]. Aparte de estas sustancias también se han identificado otras que tradicionalmente eran usadas como drogas en el tratamiento de diversas patologías y se ha descubierto que tiene acción bloqueadora de radicales libres y acción neuroprotectora como son: tempol, ebselen, carvedilol, IAC (bis(1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidiny)-decandiol), PPBP (4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine) y bromocriptina [6]. El ácido valproico (VPA) que tradicionalmente ha sido utilizado como fármaco antiepiléptico, como estabilizador del humor en los trastornos bipolares y en la migraña, actualmente se preconiza como agente neuroprotector [7,8]. Se han propuesto diferentes mecanismo de acción para explicar la acción neuroprotectora del VPA como: antagonista de canales para cationes, activador de factores de transcripción, modificación de la actividad de diferentes proteinaquinasas, inhibidor de la enzima histona deacetilasa y defensa antioxidante a través de diferentes maneras [9].

Aun no está clara la acción de este compuesto sobre las ROS, motivo por el cual decidimos probar su acción neuroprotectora como amortiguador ante el efecto de estrés oxidativo agudo, con la aplicación directa de sulfato de hierro, un generador de radicales libres, sobre la corteza cerebral de ratas Sprague Dawley.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se utilizaron 40 ratas Sprague Dawley hembras, con aproximadamente un peso de 250-300 g, divididas en cuatro grupos (n=10 para cada grupo): un grupo control y tres grupos experimentales. Los tres grupos

experimentales fueron organizados de la siguiente manera: el primer grupo experimental fue tratado con diazepam a una dosis de 8 mg/kg de peso cada 12 horas (i.p); un segundo grupo recibió tratamiento con vitamina E (Vit E) a una dosis de 100 mg/kg de peso cada 12 horas (i.p), y a un tercer grupo se les administró ácido valproico por vía intraperitoneal (i.p) a una dosis de 300 mg x kg de peso, repartidas en dos tomas cada 12 horas. Al grupo control se le administró por vía i.p un vehículo (solución fisiológica al 0,9%). El tratamiento para todos los grupos fue administrado durante las 24h previas a la administración del agente oxidante. Durante toda la fase de manipulación de los animales de experimentación se siguieron las normas establecidas en el Código de ética para la Vida de la República Bolivariana de Venezuela.

Aplicación del Agente Oxidante

Después de la última dosis de los tratamientos antes descritos, se procedió a anestesiarse las ratas con ketamina a una dosis de 70 mg/kg de peso y xylacina a 10mg/kg de peso por vía intraperitoneal. Anestesiados los animales, se indujo el estrés oxidativo agudo mediante la administración directa intracraneal de 2µg de sulfato de hierro (FeSO₄) a nivel de la región frontoparietal del hemisferio derecho, al que se accedió por una pequeña trepanación del hueso e introducción de una aguja calibre 27. Al hemisferio cerebral izquierdo no se le aplicó el oxidante por lo que sirvió como control para cada animal. Dos horas después de la administración del sulfato de hierro intracraneal, a las ratas se les aplicó eutanasia y se procedió a disecar el cerebro sobre hielo.

Preparación de las muestras

Cada hemisferio cerebral fue pesado y se adicionó 1 mL una solución tamponada fría de sacarosa 250 mM/ Tris-HCl 100 mM pH=7,4 por cada 100 mg de tejido. Para la homogeneización de cada uno de los hemisferios, se usó un homogenizador Potter Elvhjem colocado en hielo. Los

hemisferios derecho e izquierdo del cerebro de cada una de las ratas se procesaron y se homogenizaron por separado, colocándose luego las muestras en viales plásticos y guardadas a -80 °C hasta su procesamiento.

Cuantificación de Peroxidación Lipídica

Para determinar peroxidación lipídica se cuantificaron los niveles de malondialdehído (MDA) a través del método de Ohkawa y cols. [10] se modificó la cantidad de muestra y reactivos pero se conservó las concentraciones originales. Se tomaron 25 µL de la muestra (hemisferio cerebral derecho y hemisferio cerebral izquierdo por separado) y se colocaron en un tubo de ensayo, luego se adicionó, dodecyl sulfato de sodio (SDS) al 0,8%, ácido acético al 20% y ácido tiobarbitúrico al 0,8%, todo para un volumen final de 1 mL. Seguidamente los tubos fueron colocados en baño termoregulado a 100°C durante 60 minutos. Luego, previo enfriamiento de los tubos, se agregaron a cada uno los siguientes reactivos: 1,25 mL de n-butanol-piridina (15:1 vol/vol) y se completó con agua destilada para un volumen final de 2,5 mL. Después de centrifugar estos tubos, se leyó la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro Spectronic 21D-Milton Roy a una longitud de onda de 532 nm. Para calcular la concentración molar, se usó una curva patrón empleando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) y se expresó en nmol/mg proteína.

Cuantificación de Proteínas Carboniladas

El método que se utilizó para la cuantificación de grupos carbonilos (aldehídos y cetonas) fue el reportado por Levine y cols [11]. De cada una de las muestras se tomó una cantidad del homogenizado equivalente a 1 mg de proteínas y se les añadió buffer sacarosa 250 mM/ Tris-HCl 100 mM pH=7,4 hasta completar un volumen final de 300 µL. Luego se procedió a precipitar las proteínas con ácido tricloroacético para una concentración final de 10%. Se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. A cada uno de los

precipitados se adicionó 500 μ L de 2,4-dinitrofenilhidracina seguido de agitación y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en oscuridad. Se volvieron a precipitar las proteínas con ácido tricloroacético al 20%, se agitó y se centrifugó a 12.000 rpm. Seguidamente se descartó el sobrenadante y se lavaron los precipitados 3 veces con 1 mL de una mezcla de etanol-acetato de etilo (1:1 vol/vol). Al precipitado final, se le agregó 600 μ L de guanidina 6 M en fosfato de potasio a 20 mM. Se procedió a leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 370 nm. La concentración del complejo coloreado se calculó mediante el empleo del coeficiente de extinción molar del complejo grupo carbonilo-2,4-DNP en nuestras condiciones de trabajo ($22.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Los valores obtenidos de proteína carboniladas o grupos carbonilos, se expresan en moles de grupos carbonilos por miligramo de proteínas totales.

Cuantificación de Proteínas Totales

Para cuantificar proteínas se usó el método Lowry y cols. [12]. Al homogenizar cada hemisferio cerebral, se colocaron 15 μ L de la muestra en un tubo de ensayo con 1185 μ L de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 M, para un volumen final de 1200 μ L y se dejó en reposo durante 24 h a temperatura ambiente, con el fin de digerir las proteínas antes de realizar la cuantificación de las proteínas totales, para la cual se usó 200 μ L de esta digestión previa agitación. Para la curva patrón se empleó albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Las lecturas en el espectrofotómetro se hicieron a 750 nm. La concentración de proteínas se expresó en mg/mL.

Análisis Estadístico de los Datos

Todos los datos obtenidos se expresan como el promedio \pm EE y se indica el número de animales utilizados por grupos experimentales. En algunos casos se presentan como porcentajes respecto al control. En el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza (ANOVA), y como test post – hoc la prueba de Bonferroni. Se usó el software estadístico GraphPad

Software, (San Diego, CA). Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como significativo.

RESULTADOS

A continuación se comparan los niveles de peroxidación lipídica y proteínas carboniladas en los hemisferios cerebrales de las ratas que fueron sometidas a tratamiento durante 24 horas con diazepam (agonista de receptor GABA A_1), vitamina E (barredor de radicales libres) y VPA, contra el grupo control que no recibió ningún tipo de principio activo. Todo esto previo a la aplicación de un generador de radicales libres (FeSO_4) en el hemisferio derecho de las ratas tratadas.

Peroxidación Lipídica

Al observar los niveles de MDA del hemisferio cerebral derecho (HD), (donde se aplicó el FeSO_4) de las ratas del grupo control ($78,22 \pm 22,12$ nmol/mg proteína), con respecto a los niveles obtenidos en el hemisferio cerebral izquierdo (HI) o contralateral ($36,55 \pm 18,02$ nmol/mg proteína) se aprecia valores de MDA significativamente menores en un 53%, lo que nos demuestra que el HI no sufrió de estrés oxidativo y sirve como un control en cada uno de los animales. (Gráfico 1).

También en el mismo gráfico, se puede observar que las ratas tratadas con diazepam, no presentaron diferencia significativa en los niveles de MDA en el HD ($72,81 \pm 13,10$ nmol/mg proteína), con respecto al hemisferio cerebral derecho del grupo control ($78,22 \pm 22,12$ nmol/mg proteína). El diazepam no inhibió la peroxidación lipídica en el cerebro afectado por el agente oxidante.

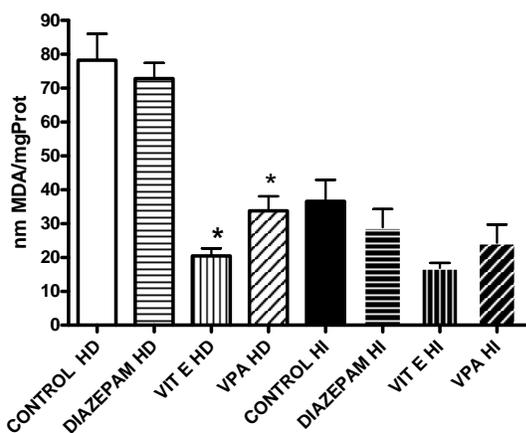
Al comparar los niveles de MDA en los hemisferios derechos de las ratas tratadas con Vit E con los controles, se observa una reducción de éstos en un 74%.

En el mismo gráfico, al comparar los niveles de MDA en el grupo de animales tratados con VPA ($33,74 \pm 12,10$ nmol/mg proteína) con el control ($78,22 \pm 22,12$ nmol/mg proteína) se puede observar que fueron menores en un 57%.

Por otro lado, al contrastar los niveles de MDA de los HD de las ratas tratadas con VPA ($33,74 \pm 12,10$ nmol/mg proteína) con respecto a los HD de las ratas tratadas con Vit E ($20,45 \pm 6,28$ nmol/mg proteína) no hubo diferencia significativa, considerándose por lo tanto similares los efectos.

Adicionalmente, puede apreciarse que no hay diferencias significativas en los valores de MDA en los hemisferios izquierdos en ninguna de las condiciones, ni tampoco hay diferencia de la concentración del mismo en relación con los hemisferios derechos de lo que recibieron tratamiento con Vit E y VPA.

Gráfico 1: Cantidad de MDA en cerebro de ratas sometidos a estrés oxidativo agudo. Los animales fueron tratados durante 24 horas con VPA (150mg/kg de peso ip c/12h), vitamina E (100mg/kg de peso ip), diazepam (8mg/kg de peso ip) o vehículo (solución fisiológica 0,9%). Después de la última dosis de tratamiento se sometieron a estrés oxidativo agudo mediante la administración de FeSO₄ intracraneal directamente en el hemisferio derecho, dos horas después fueron sacrificadas. Cada columna representa el promedio + EE de los hemisferios derecho e izquierdo de cada grupo por separado de 8 animales por grupo. La significancia indicada con (*) tuvo una $p < 0,001$ al comparar con sus respectivos controles.



Proteínas Carboniladas

El contenido de proteínas carboniladas es utilizado como un marcador de estrés oxidativo y se debe a la ruptura oxidativa de

las cadenas polipeptídicas y sus niveles dependen del grado de producción de radicales libres y de la eficacia de la eliminación de éstos por parte los mecanismos antioxidantes. El aumento de las proteínas carboniladas, representa comparativamente a la peroxidación lipídica, un grado mayor de daño funcional de la célula.

Los niveles de proteínas carboniladas del HD del grupo control ($0,034 \pm 0,003$ moles de grupos carbonilos/mg proteína), son significativamente mayores ($p < 0,001$) en relación a los niveles obtenidos en el HI del mismo grupo ($0,012 \pm 0,003$ moles de grupos carbonilos/mg. proteína), esta diferencia es de aproximadamente 3 veces. (Gráfico 2).

Las muestras de los hemisferios derechos de las ratas tratadas con diazepam mostraron niveles similares a los controles: $0,033 \pm 0,003$ moles de grupos carbonilos/mg proteína contra $0,034 \pm 0,003$ moles de grupos carbonilos/mg proteína, respectivamente.

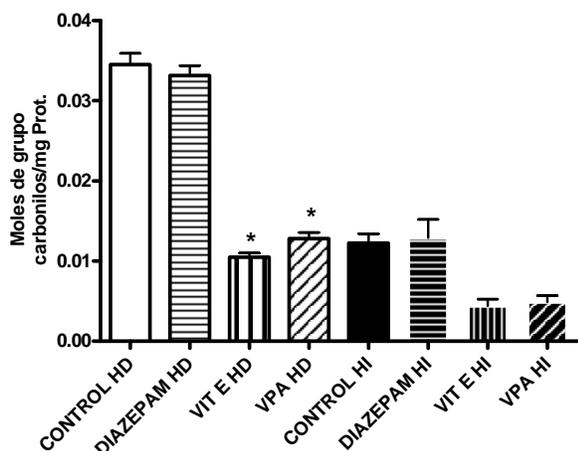
Los HD del grupo de ratas tratadas con Vit E presentaron una reducción significativa en los niveles de proteínas carboniladas ($0,01 \pm 0,001$ moles de grupos carbonilos/mg proteína) al compararlas con los HD del grupo control ($0,034 \pm 0,003$ moles de grupos carbonilos/mg proteína), siendo aproximadamente un 71%.

En el mismo Gráfico 2 se puede observar, que el tratamiento por sólo 24 horas con VPA, disminuyó los niveles de proteínas carboniladas en un 65% en el hemisferio cerebral derecho ($0,012 \pm 0,002$ moles de grupos carbonilos/mg proteína) con respecto al hemisferio cerebral derecho del grupo control ($0,034 \pm 0,003$ moles de grupos carbonilos/mg proteína).

Si se comparan los niveles de proteínas carboniladas de los HD de las ratas tratadas con VPA ($0,012 \pm 0,002$ moles de grupos carbonilos/mg proteína) con respecto a los HD de las ratas tratadas con Vit E ($0,01 \pm 0,001$ moles de grupos carbonilos/mg proteína), se puede apreciar que ambos grupos exhibieron resultados similares. Al observar los niveles de grupos carbonilos en

los HI de las ratas tratadas con VPA ($0,004 \pm 0,002$ moles de grupos carbonilos/mg proteína) y Vit E ($0,004 \pm 0,002$ moles de grupo carbonilos/mg proteína) con los presentados por los HI de las ratas controles ($0,012 \pm 0,003$ moles de grupos carbonilos/mg proteína) y las tratadas con diazepam ($0,012 \pm 0,006$ moles de grupos carbonilos/mg proteína), se puede observar, aun cuando la diferencia no fue significativa, una tendencia a que la Vit E y el VPA a reducir la oxidación de las proteínas.

Gráfico 2: Cantidad de proteínas carboniladas en cerebro de ratas sometidos a estrés oxidativo agudo. Los animales fueron tratados durante 24 horas con VPA (150mg/kg de peso ip c/12h), vitamina E (100mg/kg de peso ip), diazepam (8mg/kg de peso ip) o vehículo (solución fisiológica 0,9%), Después de la última dosis de tratamiento se sometieron a estrés oxidativo agudo mediante la administración de FeSO₄ intracraneal directamente en el hemisferio derecho, dos horas después fueron sacrificadas. Cada columna representa el promedio + EE de los hemisferios derecho e izquierdo de cada grupo por separado de 8 animales por grupo. La significancia indicada con (*) tuvo una $p < 0,001$ al comparar con sus respectivos controles.



DISCUSIÓN

La acción del VPA como neuroprotector ha sido cuestionado en algunos estudios que

describen toxicidad por aumento, justamente, de estrés oxidativo, ya sea a nivel hepático [13], corteza cerebral y cerebelar (*in vitro* e *in vivo*) de ratas [14]. Sin embargo, se preconiza mayoritariamente su efecto neuroprotector, para lo que ya se delinean diferentes mecanismos [9].

En esta investigación hemos querido dilucidar cuál es el mecanismo de acción a través del cual el VPA actúa protegiendo las células neuronales de los efectos deletéreos de los radicales libres, que juegan un papel central en la excitotoxicidad que sucede en los trastornos neurodegenerativos y en el proceso de isquemia/reperfusión, considerados entre los mayores desafíos de las neurociencias. La excitotoxicidad es el fenómeno central de la muerte neuronal y se dispara en los procesos hipóxicos/isquémicas y esta mediada por la acción del sistema glutamatérgico [15]. El aumento de actividad de este sistema incrementa la formación de radicales libres y estos a su vez actuando por diferentes vías inducen a una mayor liberación de glutamato, convirtiéndose en un círculo vicioso de destrucción masiva neuronal. Una de las formas propuestas para romper este círculo es a través del sistema GABAérgico. Su activación inhibe la cascada excitotóxica y por ende la formación de radicales libres; en este sentido existe un gran número de publicaciones donde se reporta el uso de agonistas GABAérgicos [16] en la prevención de los daños celulares, por otro lado, este hecho explicaría la acción del VPA como neuroprotector, ya que este incrementa los niveles de GABA [17]. Partiendo de estas premisas quisimos ver si en este modelo de estrés oxidativo agudo, donde se aplica directamente un agente capaz de generar grandes cantidades de radicales libres, el VPA conseguiría disminuir la peroxidación lipídica y la formación de proteínas carboniladas, como señal de la inactivación de los radicales libres. A pesar de observar que el VPA bloqueó el efecto del FeSO₄, no creemos, sin embargo, que sea por la vía del aumento de la acción del sistema GABAérgico ya que el diazepam, no produjo ningún efecto. Este resultado se podría correlacionar indirectamente con el

uso de los antiepilépticos potenciadores de GABA (topiramato y vigabatrina) que no ofrecen neuroprotección a ratones sometidos a isquemia-reperfusión [18], por lo que se puede sugerir que la acción neuroprotectora del VPA en los procesos de isquemia-reperfusión, no se produce mediante la potenciación de la acción inhibitoria GABAérgica sobre la vía excitatoria y citotóxica del glutamato. Nuestro resultado es similar a las investigaciones realizadas por Wang y cols. [19], quienes demostraron que el VPA tuvo un efecto neuroprotector contra el estrés oxidativo *in vitro*, donde este antiepiléptico clásico inhibió, en forma significativa el daño oxidativo a lípidos y proteínas en cultivos primarios de células cerebrocorticales de ratas, las cuales fueron sometidas también a un estrés oxidativo agudo (durante 90 minutos) con cloruro férrico (FeCl_3). No obstante, se podría considerar en ese estudio que el mecanismo de acción del VPA sería a largo plazo, preparando el tejido nervioso para enfrentar una injuria, ya que el tratamiento se hizo por 7 días. En esos experimentos bien podrían considerarse que el VPA activaría mecanismos a largo plazo como los que se han propuestos en muchos otros estudios y ya aparecen descritos: inhibición de la apoptosis, activación de factores de transcripción, expresión génica, modificación de la actividad de diferentes proteinaquinasas e inhibición de la enzima histona deacetilasa [9]. No creemos que el efecto observado en nuestros resultados sea a través de estas vías ya que el tratamiento apenas fue de 24 horas y activar esos mecanismos requiere mucho más tiempo. El efecto antioxidante exhibido por el VPA, que fue igual de significativo al presentado por la vitamina E en este modelo de estrés oxidativo agudo, nos hace pensar que actúa como un drenador o tamponador de radicales libres. La vitamina E ejerce su acción antioxidante a través de su sitio activo que se localiza en el grupo $-\text{OH}$ en la posición 6 del anillo cromano, la cual es capaz de neutralizar radicales libres, sobre todo endoperóxidos y el radical alcóxi al donarle un electrón y evitan de ésta manera

la propagación del proceso de la oxidación a los lípidos o peroxidación lipídica [20]. El VPA presenta una estructura química muy diferente a la vitamina E, sin embargo, también disminuyó los niveles de peroxidación lipídica y proteínas carboniladas en el cerebro de ratas sometido a estrés oxidativo agudo con la misma eficiencia. Es posible que el VPA tenga una acción antioxidante directa, para lo cual debe donar electrones a una especie radical y neutralizarlo. Hasta ahora no se conoce si el VPA tiene este tipo de acción antioxidante. Se podría sugerir además un mecanismo antioxidante indirecto, probablemente potenciando la actividad de enzimas antioxidantes, como la catalasa en la corteza prefrontal del cerebro, como fue ya descrito con el uso del litio y el VPA en ratas sometidas a estrés oxidativo [21]. Para aclarar si el VPA tiene efecto antioxidante directo, es importante estudiar en futuras investigaciones la estructura química del VPA como neutralizador o barrador directo de radicales libres. De ser éste su mecanismo de acción neuroprotectora, esclarecería la protección rápida exhibida por el VPA tanto en los lípidos, como en las proteínas.

CONCLUSIÓN

En base a los resultados obtenidos en esta investigación, se concluye que el VPA bloquea los efectos oxidativos de los radicales libres sobre los lípidos de membrana y proteínas, de una forma similar a la acción de la vitamina E, por lo que se deduce que el efecto neuroprotector de este antiepiléptico es directo actuando como un drenador o tamponador de radicales libres.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo quieren expresar un profundo agradecimiento al personal técnico, los TSU William López y Elis Mosquera pertenecientes a la Unidad de Investigación en Fisiología del Decanato de

Ciencias de la Salud, de la Universidad Centrocidental "Lisandro Alvarado".

BIBLIOGRAFÍA

[1] Popa-Wagner A, Mitran S, Sivanesan S, Chang E, Buga AM. ROS and brain diseases: the good, the bad, and the ugly. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 963520. doi: 10.1155.

[2] Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006; 97:1634-1658.

[3] Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78:547-581.

[4] Harman AW, Maxwell MJ. An evaluation of the role of calcium in cell injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35:129-144.

[5] Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *J Control Release* 2006; 113: 189-207.

[6] Pandya RS, Mao L, Zhou H, Zhou S, Zeng J, Popp AJ, Wang X. Central nervous system agents for ischemic stroke: neuroprotection mechanisms. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2011; 11(2):81-97.

[7] Qian YR, Lee MJ, Hwang S, Kook JH, Kim JK, Bae CS. Neuroprotection by valproic Acid in mouse models of permanent and transient focal cerebral ischemia. *Korean J Physiol Pharmacol* 2010; 14(6):435-440.

[8] Chiossi L, Negro A, Capi M, Lionetto L, Martelletti P. Sodium channel antagonists for the treatment of migraine. *Expert Opin Pharmacoth* 2014; 15(12):1697-706.

[9] Monti B, Polazzi E, Contestabile A. Biochemical, molecular and epigenetic

mechanisms of valproic acid neuroprotection. *Curr Mol Pharmacol* 2009; 2(1):95-109.

[10] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2):351-358.

[11] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186:464-478.

[12] Lowry, O. H., Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951. 193(1):265-275.

[13] Chang TK, Abbott FS. Oxidative stress as a mechanism of valproic acid-associated hepatotoxicity. *Drug Metab Rev* 2006; 38(4):627-639.

[14] Chaudhary S, Parvez S. An in vitro approach to assess the neurotoxicity of valproic acid-induced oxidative stress in cerebellum and cerebral cortex of young rats. *Neuroscience* 2012; 225:258-268.

[15] Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 1990; 13:171-182.

[16] De Keyser J, Sulter G, Luiten PG. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? *Trends Neurosci* 1999; 22(12):535-540.

[17] Löscher W, Schmidt D. Increase of human plasma GABA by sodium valproate. *Epilepsia* 1980; 21(6):611-615.

[18] Madden K, Clark W, Lessov N. Failure of ischemic neuroprotection by potentiators of gamma-aminobutyric acid. *Clin Med Res* 2003; 1(2):119-124.

[19] Wang JF, Azzam JE, Young LT. Valproate inhibits oxidative damage to lipid

and protein in primary cultured rat cerebrocortical cells. *Neuroscience* 2003; 116(2):485-489.

[20] Bjørneboe A, Bjørneboe GE, Drevon CA. Absorption, transport and distribution of vitamin E. *J Nut* 1990; 120(3):233-242.

[21] Frey BN, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, et al. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci* 2006; 31(5):326-332.