

## Neuroprotección por ácido valproico y cambios en la expresión de Bcl-2 y caspasa-3 activada en ratas sometidas a isquemia/reperfusión

*María M. Hernández de G., José L. Garay F. y Nelson E. Loureiro.*

Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”. Decanato de Ciencias de la Salud. Unidad de Investigación en Fisiología. Laboratorio de Fisiología Celular. Barquisimeto, Venezuela

**Palabras clave:** estrés oxidativo; isquemia/reperfusión; ácido valproico; apoptosis; neuroprotección.

**Resumen.** El ácido valproico, que además de ser un conocido antiepiléptico, una serie de trabajos en los últimos años lo proponen como un agente neuroprotector. En éste trabajo se investigó primeramente, si el ácido valproico protege a las neuronas del daño producido por el estrés oxidativo inducido por la isquemia-reperfusión en el cerebro de ratas sanas sometidas a la oclusión transitoria de la arteria cerebral media derecha; en segundo lugar, se indagó si este fármaco induce cambios en la expresión de Bcl-2 y caspasa 3-activada como un posible mecanismo de acción sobre la muerte celular del tipo apoptótico. La evaluación neurológica de los animales que fueron sometidos a isquemia/reperfusión y recibieron ácido valproico fue mejor que los que no lo recibieron. Por otro lado, los niveles de malondialdehído en el hemisferio cerebral derecho en las ratas tratadas con ácido valproico fueron inferiores a los del mismo hemisferio del grupo control, mientras la cantidad de proteínas carboniladas se redujeron un 67% en comparación al grupo control. Además, se encontró por western blot, que en homogeneizados de tejido cerebral de los animales sometidos a isquemia/reperfusión y que recibieron ácido valproico, hubo un aumento significativo de la densidad de las bandas correspondientes a Bcl-2 y una disminución de caspasa 3-activada en comparación a los que no fueron tratados con este fármaco. Se concluye que el tratamiento con ácido valproico previno el déficit neurológico en ratas sanas sometidas a isquemia-reperfusión, bloqueando el efecto de los radicales libres sobre lípidos y proteínas de la corteza cerebral afectada y se sugiere que posiblemente este fármaco interviene en la muerte por apoptosis inducida durante este tipo de lesión, pudiendo ser una alternativa terapéutica en el tratamiento de la isquemia cerebral.

## Neuroprotective action of valproic acid accompanied of the modification on the expression of Bcl-2 and activated caspase-3 in the brain of rats submitted to ischemia/reperfusion.

*Invest Clin 2015; 56(4) 377-388*

**Key words:** oxidative stress; ischemia/reperfusion; valproic acid; apoptosis; neuroprotection.

**Abstract.** Valproic acid, apart from being known as an anti-epileptic drug, has been proposed in the past few years, as a neuroprotective agent. The purpose of this study was to investigate firstly, if valproic acid protects the neurons from the damage produced by oxidative stress induced by ischemia-reperfusion in the brain of healthy rats, under the transitory occlusion of the right middle cerebral artery. Secondly it was studied if this antiepileptic drug induces changes on the expression of Bcl-2 and activated caspase-3 as a possible mechanism of action on apoptosis. The neurological evaluation of the animals that were subject to ischemia-reperfusion and received valproic acid was better than the ones who didn't receive it. On another subject, the levels of malondialdehyde on the right cerebral hemisphere in the rats treated with valproic acid were below the levels of the control group in the same hemisphere, whereas the amount of carbonylated proteins was reduced by 67% compared to the control group. Besides, it was found by western blot, that in homogenized brain tissue of the animals under ischemia-reperfusion which received valproic acid, there was a rise on the density of the bands corresponding to Bcl-2, and a reduction of activated 3-capase in comparison to the ones who were not treated with the antiepileptic drug. It's concluded that the treatment with valproic acid prevented the neurological deficit in healthy rats under Ischemia-reperfusion, blocking the effect of free radicals on lipids and proteins of the affected brain cortex, and it is suggested that the same drug intervenes on apoptosis induced during this type of damage, being able to be a therapeutic alternative in the treatment of cerebral ischemia.

*Recibido: 12-01-2015 Aceptado: 17-07-2015*

## INTRODUCCIÓN

El déficit neurológico producido en el ictus o accidente cerebrovascular se debe en primera instancia a una disminución brusca del flujo sanguíneo cerebral. Es de esperar que el restablecimiento rápido del flujo de sangre al tejido hipóxico redujera o previniera el deterioro neurológico, sin embargo, paradójicamente esta acción resulta ser aún más perniciosa y capaz de exacerbar la muerte del tejido nervioso en los pacientes que sufren el proceso isquémico inicial. Las mitocondrias juegan un papel primordial en el proceso de reperfusión, produciendo una excesiva cantidad de especies reactivas de

oxígeno (ROS) dañando así componentes celulares, y desencadenando el inicio de la muerte celular (1).

Un gran número de investigaciones hasta ahora realizadas afirman que durante la isquemia se producen dos tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis. Al producirse una isquemia cerebral focal se distinguen claramente dos zonas: una zona central del infarto donde se observa muerte por necrosis, la cual se caracteriza por el fracaso fulminante por falta de energía celular con ruptura de las organelas intracelulares e inflamación. Esta zona central es la zona que recibe el mayor impacto del daño isquémico, es el sitio donde el estímulo excitotóxico es más intenso, explicando el predominio de la

muerte por necrosis de forma inmediata. Además de la zona central, se identifica una zona circundante a la zona central llamada penumbra, donde se produce muerte celular por apoptosis, que es considerada un tipo de muerte celular activa, por lo que requiere energía para producirse y sucede horas después de darse la reperfusión (2). Las primeras pruebas morfológicas de apoptosis neuronal postisquémica provienen de modelos animales donde se provocó una breve isquemia cerebral focal o generalizada (muy variable, entre 15 minutos a 2,5 h) seguido de la nueva perfusión (3,4,5). Como el ictus es una de las causas principales de muerte y generador de discapacidad en todo el mundo, es imperativo buscar estrategias de tratamiento que puedan reducir el tamaño del daño isquémico y evitar que las células entren en apoptosis, o en muerte celular programada, por lo que se han diseñado una serie de estrategias entre las cuales están las farmacológicas (6).

El ácido valproico (VPA) es más conocido como anticonvulsivante, pero además también se usa en la depresión, migraña y en la esquizofrenia (7). Por otro lado, se ha observado que este fármaco actúa como un agente neuroprotector (8) y hasta el momento se han propuesto diferentes mecanismos para explicar su acción neuroprotectora, que engloba algunos de corto plazo y otros de largo plazo (9).

Con este trabajo nos proponemos determinar si el VPA protege de la acción de los radicales libres en un modelo de isquemia/reperfusión cerebral por oclusión de la arteria cerebral media en ratas, indagando si participa previniendo la apoptosis, mecanismo este propuesto como el fenómeno tardío de la pérdida celular en los procesos de isquemia cerebral. Para estudiar la importancia del fenómeno de apoptosis se evaluó la expresión de los marcadores bien conocidos como las proteínas Bcl-2 y caspasa-3 activada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales y reactivos

Se señalan los materiales y reactivos específicos del estudio: sutura quirúrgica monofilamento de

nylon 3-0 (Ethilon®); ketamina (KetasetcIII Fort Dodge®); diazepam (Talema® de Biotech); xilacina (Rompúm®, Bayer); ácido valproico (Sigma);  $\alpha$ -tocoferol (Vivax Pharmaceuticals); sucrosa (Merck); tris HCl (Sigma); dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma); ácido acético al 20% (Merck); ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma); n-Butanol (Sigma); 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) (Sigma); 2,4-dinitrofenilhidrazina (Merck); ácido tricloroacético (Sigma); guanidina (Sigma); fosfato de potasio (M&B); acetato de etilo (Merck); Folin-Ciocalteu (QEEL. Sao Pablo. Brasil); albúmina sérica bovina (BSA), (Santa Cruz); anticuerpo primario anti-Bcl-2 de rata (Santa Cruz); anticuerpo primario anti-caspasa -3 activada de rata (Sigma); anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Chemicon); acrilamida (Promega).

### Diseño experimental

Se utilizaron en estos experimentos 25 ratas Sprague Dawley con un peso de 250-300 g, las cuales fueron divididas en dos grupos: un grupo experimental (n=13), y un grupo control (n=12). El grupo experimental recibió VPA a una dosis de 300 mg/Kg por vía intraperitoneal dividida a su vez en dos dosis administradas cada 12 horas. El grupo control fue tratado con vehículo (solución fisiológica al 0,9 %). El tratamiento se administró 24 horas antes de ser sometidas a la oclusión transitoria de la arteria cerebral media derecha (OTACMD), hasta 48 horas después de esta. Las ratas fueron colocadas en jaulas con comida y agua *ad libitum*, a una temperatura de 25 °C, con periodos alternos de luz y oscuridad de 12 horas. 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 (10).

### Oclusión transitoria de la arteria cerebral media.

La oclusión de la arteria cerebral media derecha (OTACMD) se realizó sin craneotomía, según el modelo propuesto por Longa y col. (11). Las ratas

fueron anestesiadas con ketamina a una dosis de 70 mg/Kg de peso y xylacina a una dosis de 10 mg/Kg de peso por vía intraperitoneal. Posteriormente se realizó una incisión en la región cervical lateral derecha, se disecó y se identificó la arteria carótida común derecha con su bifurcación, se aisló la arteria y luego se procedió a realizar una pequeña incisión en la arteria carótida común inmediatamente por debajo de la bifurcación, y se introdujo un monofilamento de nylon 3-0 siliconado a través de la misma, dirigiendo el nylon hacia la arteria carótida interna, hasta aproximadamente 17 mm desde la bifurcación y se dejó durante 45 minutos. Luego, se retiró el nylon para reperfundir.

### **Evaluación neurológica**

Veinticuatro horas y cuarenta y ocho horas después de la OTACMD se procedió a realizar la evaluación neurológica, siguiendo parámetros ya reportados por otros autores, donde se evaluó la marcha, la simetría en la extensión de los cuatro miembros delanteros y traseros, los movimientos de trepar y la sensibilidad corporal del lado contralateral del hemisferio isquémico y la ptosis palpebral del mismo lado de la lesión (12). Esta escala de evaluación ascendente va del 0 al 24, considerando un mayor puntaje como menor daño neurológico y viceversa. Las ratas que no mostraron ninguno de los signos de daño neurológico señalados anteriormente fueron apartadas de las siguientes fases de este trabajo.

### **Obtención del homogenado de los hemisferios cerebrales.**

Luego de haber cumplido los tiempos experimentales, los respectivos tratamientos y la evaluación neurológica, los animales fueron sacrificados y se extrajeron ambos hemisferios cerebrales. A cada uno de los hemisferios se le adicionó una solución tampón de sucrosa 250 mM Tris-HCl 100 mM pH=7,4 a 4 °C, en una proporción de 1 mL por cada 100 mg de tejido. Se homogenizó cada uno de los hemisferios por separado en un

homogeneizador Potter Elvehjem (Wheathon, USA) a razón de 4 veces por 60 segundos con descansos de 5 minutos, mantenido siempre en hielo. Al finalizar, el homogenado se colocó en viales plásticos y fue almacenado a -20 °C hasta el momento de su uso.

### **Cuantificación de peroxidación lipídica**

Para determinar peroxidación lipídica se cuantificó los niveles de malondialdehído (MDA) usando el método de Ohkawa y col. (13) modificado, reduciendo las cantidades de reactivos y muestra a una cuarta parte de los volúmenes originalmente considerados, manteniendo las concentraciones de los reactivos. Se tomaron 25 µL del homogenado (hemisferio cerebral derecho y hemisferio cerebral izquierdo por separado) y se colocaron en un tubo de ensayo, luego se le adicionó, 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 de María a 100 °C durante 60 minutos. Sucesivamente y previo enfriamiento de los tubos, se agregó a cada uno los siguientes reactivos: n-butanol-piridina (15:1 vol/vol) y se completó con agua destilada en cantidad suficiente para un volumen final de 2,5 mL y se agitó vigorosamente. Seguidamente, se centrifugaron los tubos a 4.000 rpm durante 10 minutos se leyó la absorbancia al sobrenadante en un espectrofotómetro (Spectronic 21D-Milton Roy, USA) 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 fue el reportado por Levine y col. (14). De cada una de las muestras se tomó una cantidad del homogenado equivalente a 1 mg de proteínas y se les añadió buffer sucrosa 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 a

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 le adicionaron 500  $\mu$ L de 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNP) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en oscuridad, agitando los tubos cada 10-15 minutos. Al terminar este período, se precipitaron nuevamente las proteínas con 500  $\mu$ L de ácido tricloroacético al 20%, se agitó fuertemente y se sometió a centrifugación a 12.000 rpm por 5 minutos; se descartó el sobrenadante y se lavaron 3 veces los precipitados con 1 mL de una mezcla de etanol-acetato de etilo (1:1 vol/vol), seguido de sucesivos periodos de descanso y centrifugaciones respectivas. Al precipitado resultante del último lavado, se adicionó guanidina 6 M en fosfato de potasio a 20 mM para un volumen final de 600  $\mu$ L. Se procedió a leer la absorbancia en un espectrofotómetro (Spectronic 21D-Milton Roy, USA) a una longitud de onda de 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 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>). 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 la normalización por cantidad de proteínas se requirió usar el método Lowry y col. (15). Del homogenado se colocaron 15  $\mu$ L en un tubo de ensayo con hidróxido de sodio al 0,1M, para un volumen final de 1200  $\mu$ L dejándose en reposo durante 24h a temperatura ambiente. Para la cuantificación se usaron, previa agitación, 200  $\mu$ L de esta solución. La curva patrón se realizó empleando albúmina sérica bovina como estándar. Las lecturas en el espectrofotómetro (Spectronic 21D-Milton Roy, USA) se hicieron a 750 nm. La concentración de proteínas se expresó en mg/mL.

### Electroforesis y Western Blot.

A fin de determinar si había modificación en la expresión de las proteínas Bcl-2 y Caspasa-3 activada en el proceso de daño neuronal producido por la isquemia/reperfusión, y relacionarlas a su vez con el posible efecto neuroprotector del VPA se usó la técnica de inmunodetección (Western blot) siguiendo básicamente el protocolo usado por Loureiro y col. (16). Las muestras de los hemisferios cerebrales homogenizadas se diluyeron en solución tamponadora de SDS hasta alcanzar una concentración final de proteínas de 5  $\mu$ g/mL. Las muestras fueron corridas en gel de poliacrilamida al 12% en una cantidad aproximada de 100  $\mu$ g de proteína por pozo, paralelamente en cada uno de los geles, se corrió un marcador de peso molecular. La electroforesis se llevó a cabo con una solución de corrida (14,4 g de glicina, 3 g Tris base, SDS 1 g para 1 L en agua pentadestilada) a 80 V y a temperatura ambiente, durante 90 minutos. La transferencia se realizó a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) a 80 V durante 4 horas en solución de transferencia (14,4 g de glicina, 3 g Tris base, 1 mL de SDS 10 % y 200 mL de metanol para 1 L en agua pentadestilada) fría. A las transferencias obtenidas se realizó el proceso de bloqueo con TTBS (solución tamponadora de Tris Tween 20: 50 mM Tris base, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> y Tween 20 al 0,05 %) más 5 % de leche descremada por 5 horas en agitación leve. Luego se lavaron las membranas con TTBS y seguidamente se colocó el anticuerpo primario a la dilución de 1:500 para Bcl-2 y 1: 2000 para caspasa-3 activada (Santa Cruz), en TTBS + BSA 1 % en incubación durante dos horas en agitación constante a temperatura ambiente. Tras lavar las membranas con TTBS por 3 veces, se procedió a incubarlas con anticuerpo secundario (Chemicon) anti-IgG conjugado con peroxidasa de rábano y dilución 1:4000 en TTBS + BSA 1% por una hora, a temperatura ambiente y en agitación constante. Finalmente, se lavaron las membranas con TTBS por 3 veces y se procedió a detectar la unión del anticuerpo mediante quimioluminiscencia

en película Kodak y revelado con HC-110 (Kodak). La densidad de las bandas fue cuantificada con el programa ImageJ (desarrollado por Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Las densidades se reportaron como porcentaje en relación al promedio de las densidades obtenidas de las muestras control y fueron analizadas estadísticamente.

### **Análisis estadístico de los datos**

Todos los datos obtenidos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar indicando el número de animales utilizados. El análisis estadístico se realizó empleando 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**

### **Evaluación neurológica**

Como se puede observar en la Fig. 1 las ratas control, con OTACMD sin tratamiento, tuvieron un déficit neurológico significativamente mayor en comparación a las ratas con tratamiento con VPA, tanto a las 24 horas como las 48 horas de iniciado el proceso de isquemia/reperfusión.

### **Peroxidación lipídica**

En el grupo de ratas control, se observó que los niveles de MDA en el hemisferio cerebral izquierdo (HI) es decir, el que no fue sometido a la isquemia/reperfusión, los niveles obtenidos fueron 61% inferiores a los del hemisferio cerebral derecho (HD), lo cual significa que el HI no presentó estrés oxidativo, sirviendo así, también como un control dentro del mismo grupo (Fig. 2). En la misma

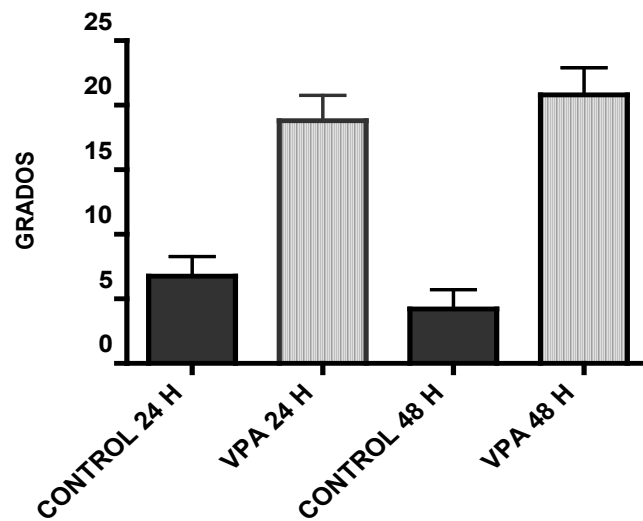
figura también se observa que el tratamiento con VPA redujo los niveles de MDA en un 43% en el HD con respecto al HD del grupo control. No hubo diferencias significativas entre los niveles de MDA del HD del grupo que recibió VPA y el HI no isquémico del grupo control.

### **Niveles de proteínas carboniladas:**

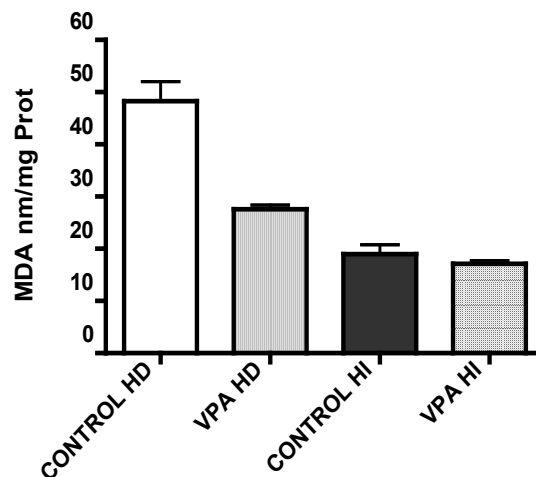
Los niveles de proteínas carboniladas en el hemisferio cerebral izquierdo (HI), es decir el que no sufrió la isquemia/reperfusión se mostraron significativamente menores (2,4 veces menos) en comparación al HD de las ratas del grupo control, corroborando nuevamente lo antes dicho con respecto a los resultados de peroxidación lipídica, que en el HI no tuvo estrés oxidativo, sirviendo así como control dentro del mismo grupo (Fig. 3). En la misma figura se puede observar que el tratamiento con VPA, disminuyó los niveles de Proteínas Carboniladas en un 67% en el HD con respecto al mismo hemisferio del grupo control. Esto indica que el VPA fue capaz de inhibir la oxidación de las proteínas inducida por el estrés oxidativo producido por la isquemia transitoria y reperfusión en el HD de las ratas (3 veces menos que el grupo control).

**Expresión de Bcl-2:** Al observar las Figs. 4-A y 4-B se puede apreciar que el VPA aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) la expresión de la proteína Bcl-2 en el HD con isquemia transitoria en relación a los controles que sólo habían sido tratados con solución fisiológica.

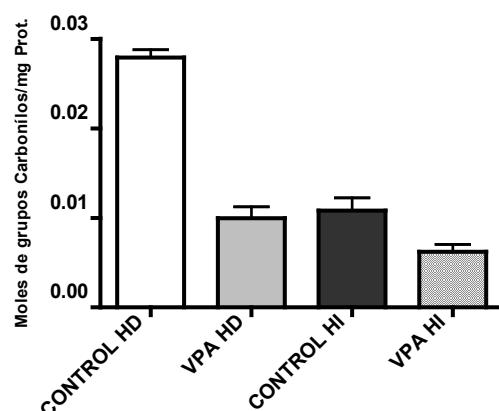
**Caspasa-3 activada:** En las Figs. 5-A y 5-B se observa que el VPA disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) la activación de la caspasa-3 al compararla con el control. Al tomar en cuenta que la activación de esta proteína representa el último eslabón río abajo, irreversible en la cascada de señalización para la apoptosis dependiente de caspasa, se puede deducir que el VPA podría alterar la muerte celular por apoptosis en el cerebro de las ratas tratadas y sometidas a isquemia transitoria.



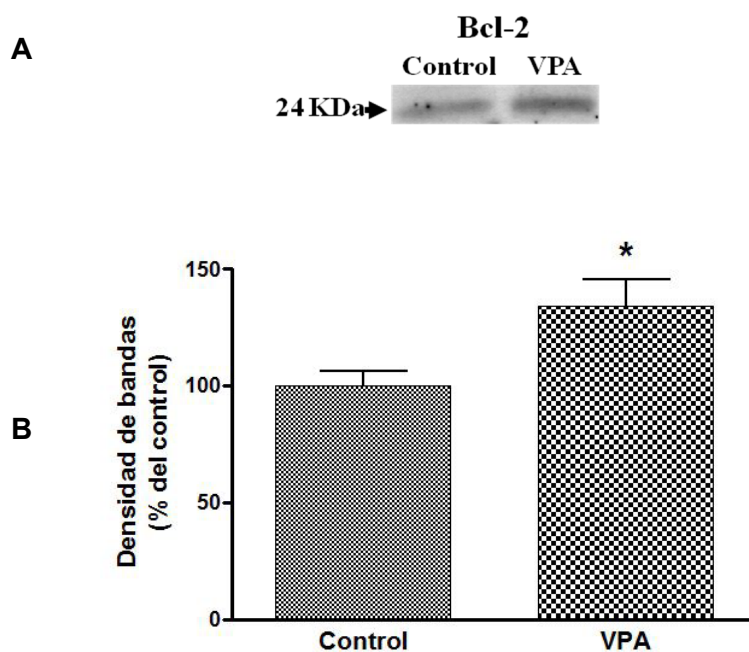
**Fig. 1.** Evaluación neurológica de ratas sometidas a isquemia/reperfusión cerebral. Escala de evaluación Neurológica según García y col. (12): esta escala de evaluación ascendente va de 0 a 24, correspondiendo el menor puntaje a mayor daño neurológico y viceversa. Cada columna representa el promedio  $\pm$  EE de 12 animales para el grupo control y 13 animales para el grupo experimental, evaluados a las 24 y 48 horas después de la OTACM. El tratamiento se administró desde las 24 horas antes de la OTACMD, hasta 48 horas después de la misma. (\*)  $p < 0,001$  al comparar con sus respectivos controles.



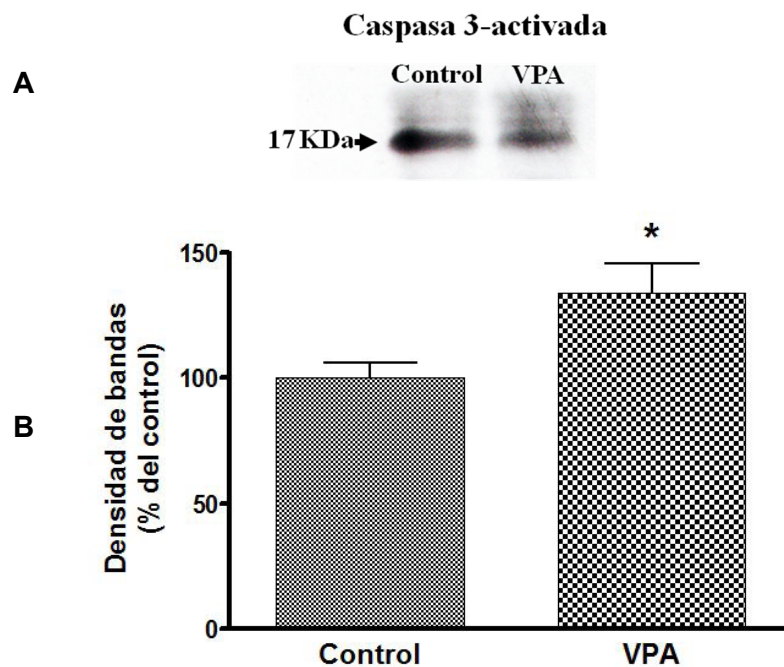
**Fig. 2.** Niveles de MDA en cerebro de ratas sometidas a isquemia/reperfusión. Ratas tratadas con VPA (150 mg/Kg de peso ip c/12h) o vehículo (solución fisiológica 0,9%), 24 horas antes de la OTACMD y sacrificadas 48 horas después de esta. Cada columna representa el promedio  $\pm$  EE de los hemisferios de cada grupo conformado por 9 animales. (\*)  $p < 0,001$  al comparar con sus respectivos controles.



**Fig. 3.** Niveles de proteínas carboniladas en cerebro de ratas sometidas a isquemia/reperfusión. Ratas tratadas con VPA (150mg/Kg de peso ip c/12h) o vehículo (solución fisiológica 0,9%), 24 horas antes de la OTACMD y sacrificadas 48 horas después de esta. Cada columna representa el promedio  $\pm$  EE de los hemisferios de cada grupo conformado por 9 animales. (\*)  $p < 0,001$  al comparar con sus respectivos controles.



**Fig. 4.** Resultados del Western blot para Bcl-2 en cerebro de ratas sometidas a isquemia/reperfusión. **A**-Imagen representativa de las bandas obtenidas del homogenado de HD del grupo control comparado con el HD del grupo tratado con VPA. **B**-Gráfico de la densidad de bandas normalizada en porcentaje en relación al control. El promedio  $\pm$  EE es el resultado de tres experimentos (\* $p < 0,05$ ).



**Fig. 5.** Resultados del western blot para Caspasa-3 activada en cerebro de ratas sometidas a isquemia/reperfusión. **A**-Imagen representativa de las bandas obtenidas del homogenado de HD del grupo control comparado con el HD del grupo tratado con VPA. **B**-Gráfico de la densidad de bandas normalizada en porcentaje en relación al control. El promedio  $\pm$  EE es el resultado de tres experimentos (\* $p < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

En la isquemia-reperfusión cerebral ocurren una serie de eventos fisiopatológicos que llevan finalmente al daño y muerte celular, involucrando múltiples mecanismos interrelacionados tales como: el desbalance de los gradientes iónicos, aumento de glutamato extracelular (excitotoxicidad), sobreactivación de los receptores de NMDA, aumento en las concentraciones de calcio intracelular, sobrecarga mitocondrial, estrés oxidativo y nitrosativo, activación de enzimas catabólicas y muerte celular por necrosis y/o por apoptosis. Los radicales libres juegan un papel fundamental en el mecanismo de excitotoxicidad dentro del proceso isquémico así como también en distintos procesos neurodegenerativos (17). Considerando los múltiples pasos en la cascada de señalización de los eventos que llevan a la neurotoxicidad inducida

por la isquemia-reperfusión, las investigaciones se han orientado hacia la búsqueda de sustancias o drogas que puedan modificar o revertir los procesos involucrados a fin de disminuir el daño neuronal resultante entre estas sustancias está el litio y el VPA. Aquí se investigó, en primer lugar si el VPA protege a las células del daño producido por el estrés oxidativo inducido por la isquemia-reperfusión en el cerebro de ratas sanas sometidas a la oclusión transitoria de la arteria cerebral media derecha. En segundo lugar se investigó a través de cuáles mecanismos este fármaco antiepiléptico protege de la muerte celular.

Se consiguió observar que el VPA disminuyó significativamente el daño neurológico en las ratas con isquemia-reperfusión al compararlas con las controles. También, se realizó una evaluación neurológica suplementar siguiendo el protocolo de Bederson y col. (18) y arrojaron resultados iguales (no se muestran). Estos resultados evidencian

un efecto neuroprotector del VPA contra el daño neuronal inducido por la isquemia-reperfusión. Un resultado similar fue obtenido anteriormente en ratas sometidas a isquemia-reperfusión a través de la OTACM y tratadas con VPA inmediatamente después del evento isquémico (19). Estos mismos autores habían obtenido en estudios anteriores iguales resultados con el litio, quedando en evidencia que ambas sustancias ejercen un efecto neuroprotector en la isquemia reperusión (20). En este sentido pareciera que el VPA actúa inhibiendo canales para cationes de forma no selectiva según han sugerido otros investigadores (21).

Resultados de nuestro laboratorio muestran que el VPA actúa directamente como un bloqueador o tamponador de radicales libres (trabajo en publicación) lo que explica su protección inmediata contra un agente generador de estos radicales aplicado de forma aguda. Sin embargo, es posible que el mecanismo de acción neuroprotector del VPA en la isquemia-reperfusión se realice a través de diferentes puntos clave de las distintas cascadas de señalización que llevan a la neurotoxicidad inducida por el proceso de isquemia-reperfusión: como se puede ver el daño neurológico se incrementa luego de las 24 horas, sin embargo el VPA produjo (a pesar de no ser significativo), un efecto protector aún mayor en las 48 hora posteriores a la oclusión y reperusión de la arteria cerebral media. Esto nos sugirió que el mecanismo de acción del VPA no deba ser solamente inmediato si no también incluir otros a más largo plazo por lo que quisimos determinar si este fármaco actuaba como un inhibidor de la apoptosis celular.

En base a lo anteriormente expuesto, indagamos específicamente sobre la participación de las proteínas Bcl-2 y la caspasa-3 activada en el proceso de isquemia/reperfusión y el papel del VPA sobre ellas. Observamos que este fármaco aumentó la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y por otro lado disminuyó la expresión de la proteína proapoptótica caspasa-3 activada, lo que sugeriría, una acción protectora en la muerte inducida en el cerebro de ratas sanas sometidas a isquemia-reperfusión. En este sentido, ya se había demostrado que la sobreexpresión del Bcl-2 suprimía completamente la

peroxidación lipídica en células cultivadas sometidas a estrés oxidativo, reportándose así una acción antioxidante de esta proteína (22), adicionalmente, también fueron reportado estos mismos efectos del Bcl-2 en cultivos celulares de células PC12 (23). En relación a la disminución observada en la expresión de la caspasa-3 activada por parte del VPA, resultados similares se obtuvieron en un modelo de asfixia por paro cardíaco inducido en ratas (24). Otros autores han señalado que las drogas que bloquean las caspasas y aumentan la acción de la Bcl-2 protege de esta forma las neuronas contra el daño isquémico (25).

Creemos que el efecto neuroprotector mostrado por el VPA, se realice a través de un mecanismo a corto plazo y otro a largo plazo. El mecanismo a corto plazo podría darse a través de una acción antioxidante directa en la que ejerce un bloqueo de los radicales libres, ya que su acción protectora es evidente durante las primeras 24 horas. Para confirmar el mecanismo a largo plazo, éste estudio debe ampliarse de forma a incluir el análisis del marcadores morfológicos del efecto antiapoptótico que podría ejercer el VPA así como determinar si realmente el aumento de Bcl-2 se acompaña de una caída de la expresión de BAX. De esta forma se reafirmaría lo que han preconizado otros autores de que en el efecto neuroprotector a largo plazo del VPA estaría involucrado la modificación de expresión de proteínas (9,26), explicando así nuestros hallazgos. Creemos de esta manera que el VPA tendría una acción protectora en la muerte neuronal del tipo necrótica al bloquear los radicales libres, así como, en la muerte de tipo apoptótica observada en la región de penumbra al alterar la expresión de proteínas involucradas en este mecanismo de muerte celular, ambos tipos observados en los procesos de isquemia/reperfusión cerebral.

## 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 Centroccidental "Lisandro Alvarado".

## REFERENCIAS

1. **Sanderson TH, Reynolds CA, Kumar R, Przyklenk K, Hüttemann M.** Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Mol Neurobiol* 2013 Feb; 47(1):9-23.
2. **Ferrer I, Planas AM.** Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62(4):329-339.
3. **Charriaut-arlangue C, Margaill I, Represa A, Popovici T, Plotkine M, Ben-Ari Y.** Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1996; 16:186-194.
4. **Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, Dixon EP, Little SP.** Global ischemia activates nuclear factor-kappaB in forebrain neurons of rats. *Stroke* 1997; 28, 1073-1081.
5. **Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Murakami K, Kawase M, Chan PH.** Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18(11):1239-1247.
6. **Sahota P, Savitz SI.** Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery. *Neurotherapeutics* 2011;8 (3): 434-451.
7. **Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M.** Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol* 2010; Vol 2010 article ID 479364.
8. **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.
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. **Código de Ética para la Vida de la República Bolivariana de Venezuela.** <http://www.coordinv.ciencs.ucv.ve/investigacion/coordinv/index/CONCIENCIA/codigoe.pdf>.
11. **Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R.** Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989;20(1):84-91.
12. **Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ.** Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1995;26(4):627-634
13. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95(2):351-358.
14. **Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER.** Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-478.
15. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farral AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1981;193(1):265-275.
16. **Loureiro-Dos-Santos NE, Reis RA, Kubrusly RC, de Almeida OM, Gardino PF, de Mello MC, de Mello FG.** Inhibition of choline acetyltransferase by excitatory amino acids as a possible mechanism for cholinergic dysfunction in the central nervous system. *J Neurochem* 2001;77(4):1136-1144.
17. **Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP.** Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008 ;55(3):310-318.
18. **Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H.** Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986 ;17(3):472-476.
19. **Ren M, Leng Y, Jeong M, Leeds PR, Chuang DM.** Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction. *J Neurochem* 2004;89(6):1358-1367.

- 
20. **Ren M, Senatorov VV, Chen RW, Chuang DM.** Post insult treatment with lithium reduces brain damage and facilitates neurological recovery in a rat ischemia/reperfusion model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 ;100(10):6210-6215.
  21. **Brunello N.** Mood stabilizers: protecting the mood...protecting the brain. *J Affect Diss* 2004; 79 (Suppl 1):S15-20.
  22. **Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ.** Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993 22;75(2):241-251.
  23. **Tyurina YY, Tyurin VA, Carta G, Quinn PJ, Schor NF, Kagan VE.** Direct evidence for antioxidant effect of Bcl-2 in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Arch Biochem Biophys* 1997 15;344(2):413-423.
  24. **Lee JH, Kim K, Jo YH, Lee SH, Kang C, Kim J, Park CJ, Kim MA, Lee MJ, Rhee JE.** Effect of valproic acid on survival and neurologic outcomes in an asphyxial cardiac arrest model of rats. *Resuscitation* 2013; 84(10):1443-1449.
  25. **Barber PA, Demchuk AM, Hirt L, Buchan AM.** Biochemistry of ischemic stroke. *Adv Neurol* 2003; 92:151-164.
  26. **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.