

# Ácido valpróico e cicatrização em bexiga: estudo experimental em ratos

## Valproic acid and bladder healing: an experimental study in rats

MARIA DE LOURDES PESSOLE BIONDO-SIMÕES, ECBC-PR<sup>1</sup> ; MOACIR OLIVEIRA DALL'ANTONIA<sup>1</sup> ; MATHEUS PRINCE GOEHR, ACBC-PR<sup>1</sup> ; RACHEL BIONDO-SIMÕES, ACBC-PR<sup>2</sup> ; SÉRGIO OSSAMU IOSHII<sup>3</sup> ; ROGÉRIO RIBEIRO ROBES<sup>1</sup> .

### R E S U M O

**Objetivo:** reconhecer os efeitos do ácido valpróico (VPA), uma droga epigenética, no processo de cicatrização da bexiga, em ratos.

**Método:** vinte ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos: experimental (A), utilizando VPA (150mg/Kg/dia), e controle (B), tratados com cloreto de sódio 0,9% por gavagem. A cicatrização da bexiga foi analisada no terceiro e sétimo dia, estudando-se a reação inflamatória, síntese de colágeno, reepitelização e angiogênese. **Resultados:** a reação inflamatória no terceiro dia foi mínima e aguda em ambos os grupos. No sétimo dia, foi subaguda em ambos os grupos com intensidade moderada no grupo A e mínima no grupo B ( $p=0,0476$ ). A intensidade do colágeno III, marcada pela imuno-histoquímica, foi semelhante nos dois grupos, nos dois tempos estudados. A intensidade de colágeno I no terceiro dia foi semelhante nos dois grupos, e maior no sétimo dia no grupo experimental ( $p=0,0476$ ). A avaliação do colágeno pelo picrosiriusred mostrou que a presença de colágeno III foi semelhante em ambos os grupos ( $p=0,3312$ ) no terceiro dia, e maior no controle no sétimo dia ( $p=0,0015$ ). O colágeno I foi semelhante no terceiro dia ( $p=0,3100$ ), e maior no controle no sétimo dia ( $p=0,0015$ ). A contagem de vasos marcados pelo anti-SMA mostrou menos vasos no terceiro ( $p=0,0034$ ) e sétimo dia ( $p=0,0087$ ) no grupo experimental, confirmado pelo anti-CD34, no terceiro ( $p=0,0006$ ) e no sétimo dia ( $p=0,0072$ ). **Conclusão:** o VPA determinou alterações no processo de cicatrização da bexiga, em ratos, com menor densidade de colágeno e menor atividade angiogênica, mas sem comprometer a integridade do órgão.

**Palavras-chave:** Ácido Valproico. Cicatrização. Proliferação de Células. Bexiga Urinária. Epigênese Genética.

### INTRODUÇÃO

A capacidade autorregenerativa é intrínseca e universal aos seres vivos<sup>1</sup>. Como principal barreira estrutural aos agressores ambientais (físicos, químicos ou biológicos) temos a pele, tecido escamoso queratinizado pluristratificado dotado de vasta comunicação celular entre si e com o corpo. A perda da interação celular desencadeia a ativação imediata de eventos moleculares homeostáticos, buscando restaurar a integridade funcional<sup>2</sup>. Assim, inicia-se a cicatrização, processo complexo que envolve migração de células inflamatórias, síntese de tecido de granulação, deposição de colágeno e maturação, além de remodelação da ferida<sup>3</sup>.

Estudos recentes sobre o ácido valpróico (AVP), medicamento utilizado no tratamento da epilepsia e do transtorno bipolar, mostraram que ele é responsável pela redução de alguns tipos de câncer e seu potencial invasivo, classificado como epigenético. O mecanismo

de ação da epigenética está na mudança estrutural do DNA, resultando em mudanças na transcrição, tradução e replicação dos genes. Esse mecanismo inclui a alteração da metilação (hipermetilação ou hipometilação) de histonas e proteínas não histonas, remodelação da cromatina e alterações na expressão gênica por RNAs não codificantes (ncRNAs)<sup>4</sup>. No caso do AVP, ele atua como um inibidor seletivo de classe I das enzimas desacetilases de histonas (HDACs)<sup>5</sup>, responsáveis por remover o grupamento metil das histonas, saindo da fase S, completando a fase G2 e a divisão celular. Com a inibição das HDACs, especificamente HDAC1, HDAC2, HDAC4, com expressão aumentada no câncer de bexiga<sup>6</sup>, o DNA permanece hipermetilado, bloqueando o ciclo celular e prevenindo mitoses desordenadas<sup>7</sup>.

Estudos anteriores mostraram que o AVP interage com proteínas de migração e ligação celular, mas não na proliferação celular, por mecanismos como a proteína 53 (p53), diminuindo a atividade dessas

1 - Universidade Federal do Paraná, Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental - Curitiba - PR - Brasil 2 - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica - Departamento de Cirurgia - Curitiba - PR - Brasil 3 - Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia da UFPR - Curitiba - PR - Brasil

células<sup>8</sup>. Além disso, o AVP induz trombocitopenia, principalmente em mulheres, o que pode ser devido a uma maior supressão na formação de plaquetas na medula óssea ou porque favorece sua destruição periférica por anticorpos antiplaquetários<sup>9</sup>. O AVP também induz a redução da secreção do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), interferindo na angiogênese, bem como a diminuição da expressão e atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), reduzindo a formação de novos vasos<sup>10</sup>. O fibrinogênio também tem seus níveis alterados com o AVP, por reduzir os precursores de fibrina e aumentar a fibrinólise, facilitando a quebra do exsudato de fibrina e, assim, reduzindo a adesão celular<sup>10</sup>.

O tratamento do câncer utilizando a associação de quimioterapia e radioterapia com epigenética vem crescendo para diversos tipos de tumores, como bexiga<sup>11</sup> e próstata<sup>12</sup>. O tumor de bexiga é a quinta neoplasia mais frequente em homens e a décima segunda em mulheres. Em 2012, foram registrados 165.000 óbitos em todo o mundo por essa causa<sup>13</sup>. No Brasil, a estimativa de 2018 foi de 9.480 novos casos (6.690 em homens e 2.790 em mulheres). Em 2017, foram notificados 4.355 óbitos por câncer de bexiga (3.021 homens e 1.933 mulheres) no Brasil<sup>14</sup>.

Pacientes com tumor frequentemente recebem radioterapia e quimioterapia pré-operatórias, podendo estar associadas a uma epigenética no futuro, aumentando a taxa de recuperação e diminuição da resistência da população tumoral a determinadas drogas<sup>15,16</sup>. Muitos pacientes desse grupo serão submetidos a intervenções cirúrgicas, portanto é importante estudar a influência desses medicamentos no processo de cicatrização de feridas.

O objetivo deste trabalho foi analisar a ação do ácido valpróico no processo de cicatrização da bexiga em ratos.

## MÉTODOS

Os experimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e Uso de Animais para Fins Científicos e Didáticos, editadas pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), em 2013, e a Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal

do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR), em 22 de outubro de 2019, recebendo o nº 1.320, processo 23075.064161/2019-71. Para calcular o tamanho da amostra, foram utilizados dados de experimentos anteriores nesta linha de pesquisa para um erro alfa de até 0,05 (5%), poder amostral de 1 erro beta. Este cálculo fez parte do projeto avaliado pelo CEUA, com o objetivo de respeitar os 3 Rs.

Vinte ratos Wistar machos – *Rattus norvegicus* Albinus, Rodentia Mammalia –, de 120-140 dias de idade e pesando 462,3g ± 33,7g, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Paraná, foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos principais: experimental (A) e controle (B), que recebeu as soluções por gavagem oral. O jejum foi mantido por 3 horas antes das intervenções, sem restrição hídrica.

O grupo experimental foi tratado com solução de Ácido Valpróico na dose de 150mg/Kg, uma vez ao dia, iniciada três horas antes do procedimento e mantida até a data prevista para a eutanásia. O grupo controle foi tratado com solução salina isotônica 0,9% (NaCl), na mesma quantidade. Esses animais foram subdivididos em lotes de acordo com a data da eutanásia. Grupo A1 (n=5) e B1 (n=5) avaliados após três dias, A2 (n=5) e B2 (n=5) avaliados após sete dias.

Os animais foram mantidos no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura (20 ± 2°C) e umidade relativa não controlada. Os animais receberam padrão alimentar comercial para a espécie e água ad libitum. Foram mantidos em caixa de propileno, cinco em cada caixa, com higienização e trocas diárias.

A anestesia e a analgesia foram realizadas por um médico veterinário. O protocolo de anestesia foi iniciado com injeção intramuscular pré-anestésica de cloridrato de quetamina 50mg/kg combinado com cloridrato de xilazina 2mg/kg. A indução anestésica foi realizada por inalação com isoflurano a 1% e manutenção com a mesma droga a 1,5% sob máscara associada a oxigênio a 100%. A analgesia foi realizada por injeção intramuscular de cloridrato de tramadol 5mg/Kg no pós-operatório imediato e oito horas após a intervenção.

Após a anestesia, os animais foram identificados e submetidos à tricotomia ventral. Em

seguida, foram posicionados em mesa cirúrgica e foi feita a antisepsia com solução de iodopovidona. O procedimento cirúrgico iniciou com laparotomia mediana de 5cm e, em seguida, a bexiga urinária foi identificada. Foi realizada uma lesão de 0,5cm no fundo da bexiga. Com lupa cirúrgica, o órgão foi

suturado em quatro pontos com poliglactina 910 6-0 (Figura 1). A laparorrafia foi realizada em dois planos, primeiro o plano peritônio-músculo-aponeurótico, com quatro pontos de fio contínuo de poliglactina 910, e depois a pele, com quatro pontos contínuos de fio monofilamentar de náilon.



**Figura 1.** Confeção da lesão na bexiga à esquerda e da síntese completa do órgão, à direita.

Após a recuperação da anestesia, os animais foram recolocados em suas caixas originais até a data prevista para a avaliação.

A eutanásia foi realizada por médico veterinário, conforme protocolo descrito nas Diretrizes Práticas de Eutanásia do CONCEA, Resolução nº 37 do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação (Brasília/DF), em 15 de fevereiro de 2018.

Uma avaliação macroscópica ocorreu após a relaparotomia. Foi observada a integridade da bexiga, a presença de líquidos na cavidade abdominal, assim como a presença de aderências na linha de sutura e aspectos urinários. Em seguida, a bexiga foi ressecada, estendida em papel filtro e fixada em formol a 10% para avaliação do Patologista.

O material embebido em parafina foi bloqueado e submetido a cortes de 5 µm de espessura, que foram montados em lâminas e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) para avaliação do processo de cicatrização da ferida. Em cada lâmina foi realizada a análise patológica por meio da leitura de cinco campos.

Para a análise geral, o método de Vizzotto Junior e cols. foi usado<sup>17</sup>. Os critérios observados foram qualidade da reação inflamatória, intensidade da reação inflamatória, reepitelização e angiogênese, estudados no terceiro e sétimo dias. Os dados foram classificados em graves, moderados, leves ou ausentes e transformados em variáveis quantitativas por atribuição de índices aos achados histológicos, sendo: ausente, discreto, moderado e grave.

As análises de colágeno III e colágeno I foram realizadas por imuno-histoquímica e coloração com picrosirius-red F3BA.

A técnica de tissue array ou microarray foi utilizada para as avaliações imuno-histoquímicas com o método da estreptavidina-biotina-peroxidase. Resumidamente, os cortes foram desparafinizados, hidratados e mergulhados em tampão fosfato. Após recuperação antigênica com tampão citrato e bloqueio de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 0,3%, anticorpos monoclonais anticolágeno I, anticolágeno III, anti-CD34 e anti- $\alpha$ -actina de músculo liso (anti-SMA) foram aplicados em cada uma

das lâminas e incubados durante a noite. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão fosfato e um anticorpo secundário biotilado foi adicionado e incubado por 60 minutos. Após novo enxágue, foi aplicado o complexo estreptavidina-peroxidase e a reação imuno-histoquímica foi revelada com a aplicação de diaminobenzidina. Em seguida, utilizou-se hematoxilina para contracoloração dos cortes, após desidratação e diafanização.

Para as análises, 10 campos de cada corte histológico foram lidos sobre a linha da cicatriz e foi obtida uma média.

As lâminas histológicas foram coradas com Picrosirius-red F3BA e fotografadas, onde cada imagem foi capturada sob luz normal e polarizada. Dez campos por ferida foram selecionados para as leituras das lâminas em um microscópio óptico com aumento de 40x focalizado na linha da ferida. Na análise do picrosirius-red, as fibras colágenas mais espessas e birrefringentes são vermelho-alaranjadas (colágeno I), e as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringentes, apresentam coloração esverdeada (colágeno III). As micrografias foram capturadas por uma câmera Sony, CCD101. A análise das imagens foi realizada com o aplicativo Image-Plus® 4.5 for Windows® da mídia Cybernetics.

A área de cada campo lido foi de 142.901 quadrados micrômetros. Em cada uma foi calculada a porcentagem da área ocupada pelas fibras vermelha e amarela (colágeno I) e verde (colágeno III). Considerando que os demais tipos de colágenos constituem frações muito pequenas, para fins práticos apenas os colágenos I e III foram considerados como colágeno total da cicatriz. Dos dez campos lidos, obteve-se uma média, considerada para cada animal.

A leitura das seções tratadas por imunohistoquímica para reconhecimento dos colágenos I e III foi realizada por dois patologistas utilizando o método qualitativo, classificando-as em: ausente, mínima, moderada e intensa.

A análise da neovascularização foi realizada pela leitura de dez campos aleatórios dos cortes histológicos da bexiga tratada com anti-CD34 e anti-SMA, em uma área de 131.307,264  $\mu\text{m}^2$ , com ampliação de 10X, digitalizado com o Axio Scan.Z1 Digital Slide Scanner® (Zeiss, Alemanha). As lâminas virtuais foram avaliadas com o software Zeiss ZenLite® (Zeiss, Alemanha). Os

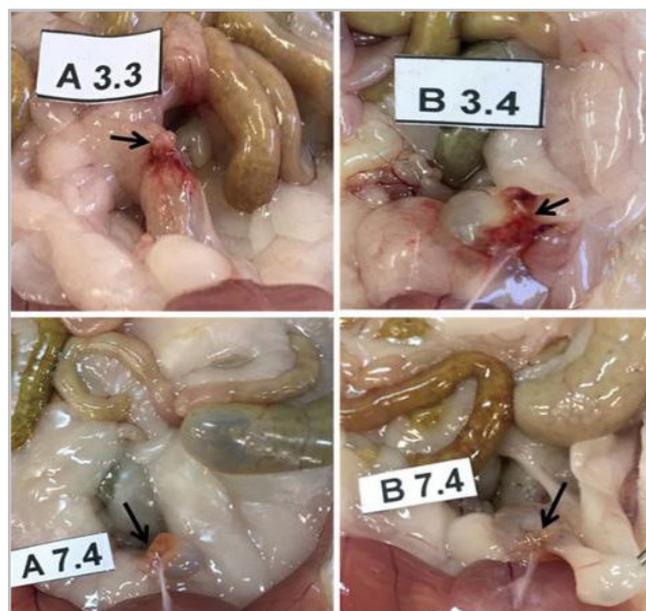
vasos marcados com anti-CD34 e anti-SMA foram contados. A partir da leitura dos dez campos, obteve-se a média para cada animal. A contagem foi realizada com a marcação anti-CD34 e então com o anti-SMA, para maior segurança na contagem, ou seja, contra-prova.

A análise estatística foi descritiva por meio de gráficos e tabelas. O teste não paramétrico utilizado foi o teste de Fisher para tabelas 2x2, Mann-Whitney e teste t de Student, dependendo de os dados terem distribuição normal ou não. O nível de rejeição para a hipótese nula foi de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Durante todo o experimento, não houve mortes.

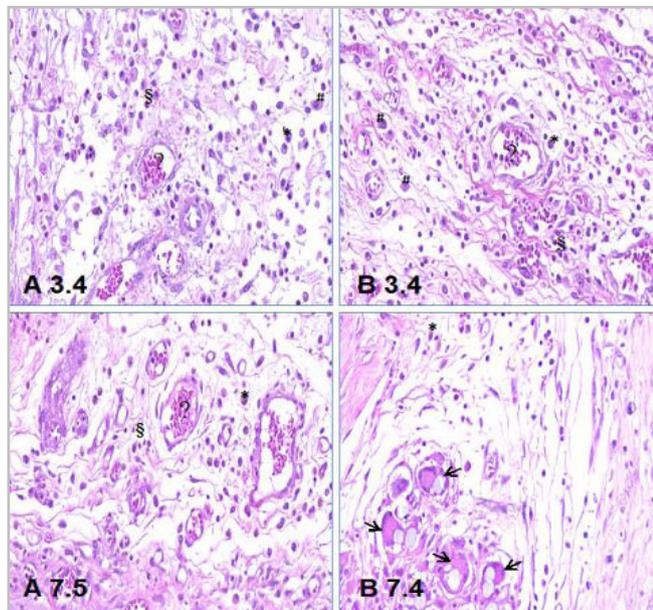
No terceiro e sétimo dias, em ambos os grupos a bexiga urinária estava intacta, não havia líquido na cavidade abdominal e a urina estava limpa e sem sangue. Aderências foram observadas nos dois tempos avaliados em ambos os grupos (Figura 2).



**Figura 2.** Aderências da linha de síntese da bexiga, observadas no terceiro e no sétimo dia. A 3.3: animal nº 3, do grupo A com 3 dias. B 3.4: animal nº 4, do grupo B com 3 dias. A 7.4: animal nº 4, do grupo A com 7 dias. B 7.4: animal nº 4, do grupo B com 7 dias.

O exame da mucosa mostrou que estava totalmente epitelizada no sétimo dia em todas as bexigas urinárias de todos os animais deste estudo.

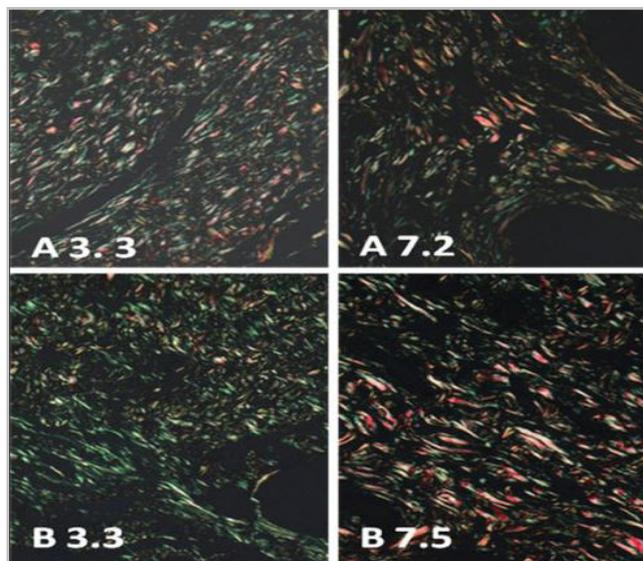
A reação inflamatória, avaliada pelo método de Vizzotto Junior e cols. no terceiro dia foi mínima (teste exato de Fisher,  $p=1.000$ ) e aguda (teste exato de Fisher,  $p=1.000$ ) em ambos os grupos. No sétimo dia, foi subaguda em ambos os grupos (teste exato de Fisher,  $p=1.000$ ) com intensidade moderada no grupo experimental e mínima no grupo controle (teste exato de Fisher,  $p=0,0476$ ) (Figura 3).



**Figura 3.** Fotomicrografias de cortes histológicos da bexiga de animais dos dois grupos, demonstrando reação inflamatória - HE, 200X. A 3.4: animal nº 4, do grupo A com 3 dias. B 3.4: animal nº 4, do grupo B com 3 dias. A 7.5: animal nº 5, do grupo A com 7 dias. B 7.4: animal nº 4, do grupo B com 7 dias. § infiltrado inflamatório; # macrófagos; \* plasmócitos; ? congestão vascular; ? células gigantes de corpo estranho contendo fragmentos de fio.

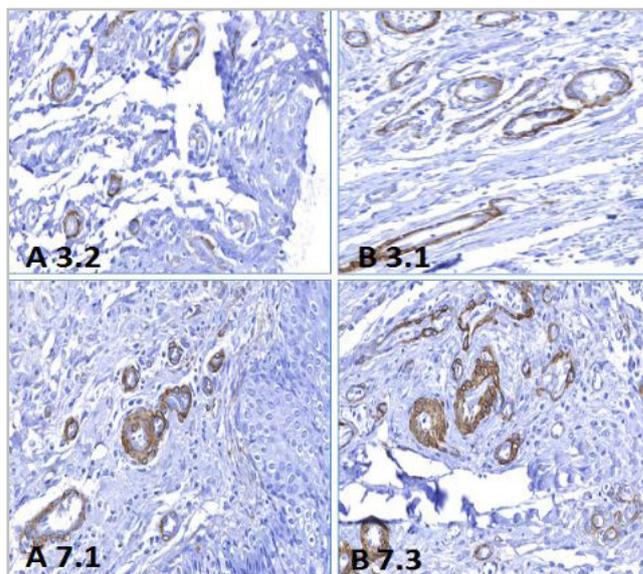
A intensidade do colágeno III marcada pela imunohistoquímica foi semelhante nos dois grupos nos dois tempos estudados, ausente ou mínima no terceiro dia ( $p=1.000$ ) e mínima ou moderada no sétimo dia ( $p=0,2222$ ). O Colágeno I estava ausente no terceiro dia em ambos os grupos, mas no sétimo dia, a quantidade moderada predominou no grupo experimental e foi mínima no grupo controle ( $p=0,0476$ ).

A avaliação pelo picosirius-red permitiu verificar que a presença de colágeno III foi semelhante em ambos os grupos ( $p=0,3312$ ) no terceiro dia, e maior no grupo controle no sétimo dia ( $p=0,0015$ ) (Tabela 1). O colágeno I apresentou similaridade no terceiro dia ( $p=0,3100$ ) e foi maior no grupo controle no sétimo dia ( $p=0,0015$ ) (Tabela 2 e Figura 4).



**Figura 4.** Fotomicrografias de cortes histológicos obtidos do terceiro e do sétimo dia, dos dois grupos. Picosirius red 400X. A 3.3: corte histológico de bexiga do animal de nº 3, do terceiro dia, do grupo A. B 3.3: corte histológico de bexiga do animal de nº 3, do terceiro dia, do grupo B. A 7.2: corte histológico de bexiga do animal de nº 2, do sétimo dia, do grupo A. B 7.5: corte histológico de bexiga do animal de nº 5, do sétimo dia, do grupo B. As fibras coradas em verde = colágeno III e as em laranja e vermelho = colágeno I.

A intensidade da angiogênese avaliada pela contagem de vasos marcados por anti-SMA mostrou menos vasos no terceiro dia (0,0034) e no sétimo dia ( $p=0,0087$ ), ambos no grupo tratado com AVP (Tabela 3 e Figura 5).



**Figura 5.** Fotomicrografias de cortes histológicos obtidos do terceiro e do sétimo dia, dos dois grupos. Imunoistoquímica, anti-SMA 200X. A 3.2: corte histológico de bexiga do animal de nº 2, do terceiro dia, do grupo A. B 3.1: corte histológico de bexiga do animal de nº 1, do terceiro dia, do grupo B. A 7.1: corte histológico de bexiga do animal de nº 1, do sétimo dia, do grupo A. B 7.3: corte histológico de bexiga do animal de nº 3, do sétimo dia, do grupo B.

**Tabela 1** - Percentual médio ocupado por colágeno III, utilizando Picosirius-red F3BA.

Animal	Área de colágeno III em três dias		Animal	Área de colágeno III em sete dias	
	Grupo A	Grupo B		Grupo A	Grupo B
1	63,95	62,91	1	50,28	65,62
2	75,63	53,00	2	38,10	68,12
3	60,36	61,45	3	39,95	72,35
4	55,77	42,11	4	51,09	79,29
5	49,37	70,74	5	64,66	70,01
Média	61,02	58,04	Média	48,82	80,01
DP	9,82	10,91	DP	10,63	5,21
% DP	15,09	19,28	% DP	21,77	9,60

Teste t de Student; 3º dia:  $p=0,3312$ ; 7º dia:  $p=0,0015$ ; DP: Desvio padrão.

**Tabela 2** - Porcentagem média ocupada por colágeno I, utilizando Picosirius-red F3BA.

Animal	Área de colágeno I em três dias		Animal	Área de colágeno I aos sete dias	
	Grupo A	Grupo B		Grupo A	Grupo B
1	36,05	37,09	1	34,38	49,72
2	24,38	47,00	2	31,87	61,90
3	39,64	38,55	3	27,65	60,05
4	44,22	57,89	4	20,71	48,91
05	50,63	29,26	5	29,99	35,34
Média	38,98	41,96	Média	28,92	51,18
DP	9,82	12h40	DP	5,21	10,63
%DP	20,13	28,96	%DP	18,15	20,77

Teste t de Student; 3º dia:  $p=0,3100$ ; 7º dia:  $p=0,0015$ ; DP: Desvio padrão.

**Tabela 3** - Média de vasos contados em 10 campos para cada animal, marcado pelo anti-SMA e a média dos dois grupos, nos dois tempos estudados.

Animal	Grupo			
	A3	B3	A7	B7
1	10,4	14,5	12,7	17,2
2	11,4	13,6	15,9	22,7
3	11,1	14,9	16,5	20,9
4	12,5	14,7	17,5	18,0
5	10,4	11,7	15,9	18,9
Média	16/11	13,88	15,7	19,54
DP	0,87	1,32	1,80	2,24
%DP	7,79	9,51	11,46	11,46
Máximo	12h50	14,90	17h50	22,70
Mínimo	10h40	11h70	12h70	17,20

Teste t de Student; 3º dia:  $p=0,0034$ ; 7º dia:  $p=0,0087$ .

A contagem de vasos marcados pelo anti-CD34 em dez campos confirmou menor número de vasos no

grupo tratado, tanto no terceiro dia ( $p = 0,0006$ ) quanto no sétimo ( $p=0,0072$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4** - Média de vasos contados em 10 campos para cada animal, marcado pelo anti-CD34 e a média dos dois grupos, nos dois tempos estudados.

Animal	Grupo			
	A3	B3	A7	B7
1	11,1	16	15,9	17,1
2	13,2	14,4	15,6	19,9
3	10,2	13,5	18	18,3
4	12	14,7	16,4	20,4
5	11,2	14,9	17,6	19,8
Média	11,54	14,7	16,7	19,1
DP	1,13	0,90	1,05	1,37
%DP	9,76	6,14	6,31	7,15
Máximo	13,2	16	18	20,4
Mínimo	10,2	13,5	15,6	17,1

Teste t de Student; 3º dia:  $p=0,0006$ ; 7º dia:  $p=0,0072$ .

## DISCUSSÃO

O valproato de sódio é convertido em ácido valpróico após a ingestão e ionizado no trato gastrointestinal em sua forma ativa. Seu metabolismo compreende três vias de oxidação em humanos, gluconidação,  $\beta$  oxidação mitocondrial e enzimas da família p450 (CYP2C9, CYP2A6 e CYP2B6)<sup>7</sup>, que ocorrem em nível hepático, sua administração podendo gerar hepatotoxicidade. A farmacodinâmica do mecanismo de ação compreende aumento dos níveis de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) no sistema nervoso (SN), bloqueio de canais iônicos voltagem-dependentes no SN e inibição classe I do grupo HDACs<sup>18</sup>.

O ácido valpróico foi escolhido como droga experimental devido ao potencial de inibição de várias HDACs, especialmente 1, 2 e 4. Estas são divididas em 4 classes, com ações específicas de sinalização intracelular e diferentes padrões bioquímicos. A classe I inclui HDACs 1, 2, 3 e 8; na classe IIa há HDACs 4, 5, 7 e 9; HDAC 6 e 10 estão na classe IIb; e HDAC 11 está na classe IV. Na bexiga urinária, as HDACs das classes I e IIa são as de maior atividade<sup>19</sup>.

As HDACs 1 e 2 são encontradas principalmente no núcleo da célula. São essenciais para a transcrição de proteínas como SIN3A, NuRD e CoREST, ligadas

a promotores de DNA, que produzem silenciamento genético específico<sup>19</sup>. Além disso, essa classe é essencial para a proliferação e sobrevivência celular ao reprimir proteínas inibidoras do complexo CDK, como p21WAF1/CIP1 e p57KIP2. Assim, regula a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular<sup>16</sup>. Como a classe IIa, representada pelas HDACs 4, tem sua atividade restrita ao tecido local em que está inserida, requer interação conjunta com a classe I, pois a substituição da tirosina no sítio catalítico da classe IIa reduz sua ação enzimática<sup>19</sup>.

A cicatrização de feridas inclui as vias wnt<sup>20</sup>, quinase reguladora de sinal extracelular (ERK)<sup>21</sup> e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-quinase-Akt-mTOR)<sup>22</sup>, todas vias com erros frequentes em neoplasias humanas<sup>23</sup>. Wnt provou ser um regulador da organogênese e homeostase basal, enquanto ERK e PI3-Kinase/Akt estão envolvidos no processo de epitelização<sup>23</sup>. Com a administração terapêutica do AVP, ambas as vias de sinalização foram alteradas, revelando assim um possível alvo para tratamento futuro. Na fase de proliferação celular, o AVP interage com a via da  $\beta$ -catenina, moléculas que, em altas concentrações, induzem o aumento das mitoses, a regulação da multiplicação das células mesenquimais, a motilidade e a hiperplasia celular das cicatrizes<sup>23</sup>. Além disso, a  $\beta$ -catenina interage na transformação do fator de necrose tumoral- $\beta$ 1 (TNF- $\beta$ 1),

aumentando seus níveis que participam da indução da diferenciação dos miofibroblastos<sup>23</sup>. O aumento dos níveis de  $\beta$ -catenina ocorre pela interação direta do AVP na proteína Ras, mostrando um alvo viável na cicatrização<sup>24</sup>.

Além disso, os inibidores de HDACs podem diminuir a hipóxia<sup>25</sup> e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), induzindo a angiogênese<sup>26-27</sup>. A formação de novos vasos compreende proliferação endotelial, migração e organização de redes estruturais que formam o tubo vascular, ambas as fases moduladas pela geração de óxido nítrico (NO)<sup>28</sup>. In vitro, o AVP demonstrou inibir a proteína endotelial óxido nítrico sintase (eNOS), diminuindo diretamente os níveis de NO<sup>29-30</sup>.

Com a redução da síntese de NO, pela diminuição da guanilato-mono fosfato ciclase plasmática (cGMP) pelo AVP e a redução da eNOS, o VEGF permanece baixo, comprometendo a angiogênese<sup>29</sup>. O valproato interage inibindo diretamente a angiogênese nas células endoteliais, reduzindo a taxa de mitose dessas células e seu crescimento<sup>33</sup>. Sabe-se também que a diminuição da angiogênese no urotélio pode ser causada pela ação do AVP aumentando a expressão da trombospondina-1 (TSP1)<sup>34</sup>.

TSP1 é inibidora natural da angiogênese presente em células tumorais, como no câncer de bexiga. A diminuição da expressão de TSP está diretamente ligada à capacidade de induzir novos vasos, o que é necessário para a expansão clonal de células cancerígenas e metástases. Além disso, há interação da TSP1 com a expressão de VEGF, molécula responsável pelo crescimento endotelial<sup>35</sup>. A ação antiangiogênica da TSP1 é mediada no receptor CD36 nas células endoteliais, iniciando assim uma cascata de apoptose<sup>36</sup>. A continuação desta linha de pesquisa está focada no reconhecimento dos efeitos da angiogênese.

A presença de colágeno III, que é mais fibrilar, quando analisada pela imunomarcção, foi mínima no dia 3 em ambos os grupos e permaneceu semelhante no dia 7 ( $p=0,2222$ ). Quando analisado pelo picrosirius-red sob luz polarizada, houve confirmação para o terceiro dia ( $p=0,3312$ ), mas no sétimo dia, observou-se maior densidade no grupo controle ( $p=0,0015$ ).

A síntese de colágeno I, quando analisada por imunomarcção, neste estudo indicou evolução

favorável aos sete dias de experimento no grupo tratado com ácido valpróico ( $p=0,0476$ ). No entanto, esse valor ficou muito próximo do limite para rejeição da hipótese nula e, como o tamanho da amostra foi pequeno, não se pode afirmar com certeza. Na aplicação tópica in vivo, Lee e cols. observaram aumento dos níveis de  $\alpha$ -actina do músculo liso ( $\alpha$ -SMA), colágeno I e III na ferida, diminuindo a distância entre as bordas da cicatriz mais rapidamente<sup>37</sup>. O aumento de colágeno também foi observado por Huang e cols. estudando a interação de AVP e placas ateroscleróticas<sup>37</sup>. Para melhor percepção dos resultados, optou-se pelo uso da coloração com picrosirius-red e exame sob luz polarizada. No terceiro dia, havia colágeno I em pequena quantidade em ambos os grupos ( $p=0,3100$ ). No entanto, passou a existir em maior densidade no grupo controle no sétimo dia ( $p=0,0015$ ).

Em cultura de células, a redução na deposição de colágeno pode ser explicada pela supressão das moléculas de adesão celular  $\alpha$  e  $\beta$  integrinas, que são necessárias para a adesão e deposição celular. É assim que o AVP atua na redução da metástase no câncer de bexiga, regulando negativamente as proteínas da superfície celular, bem como diminuindo as proteínas de adesão, diminuindo até mesmo a motilidade celular. Também pode ser usado como adjuvante em terapias oncológicas<sup>14</sup>.

Além disso, em cultura, Humphrey e cols. observaram redução do colágeno após tratamento com AVP, mostrando diminuição do pró-colágeno I após 24 horas de imersão<sup>38</sup>. Isso também foi observado por Fuller e cols. com cultura de fibroblastos dérmicos, com redução de 28% em relação ao controle após 24 horas<sup>39</sup>. A mesma redução de colágeno foi observada nos estudos de Rishikof e cols., pela diminuição da síntese de mRNA em fibroblastos pulmonares com o tratamento de 24 horas<sup>40</sup>.

Estudando a cultura da bexiga com AVP, Hodges e cols. demonstraram diminuição da expressão do gene do colágeno em células musculares, com redução da expressão do mRNA dos colágenos tipos I e III<sup>41</sup>. Além disso, os estudos de Rombouts e cols. e Mann e cols. demonstraram o potencial antifibrogênico do valproato pela hiperacetilação das histonas 3 e 4<sup>42-43</sup>.

Pensando na migração celular, a administração de AVP gera diminuição da adesão celular, principalmente das células tumorais, bem como modificação das integrinas da superfície celular, proteínas necessárias para a invasão metastática do tumor<sup>20</sup>. No câncer de bexiga, houve redução significativa da proliferação celular entre G0 e G1, diminuição da ativação da via Akt-mTOR e inibição do crescimento celular<sup>16</sup>. Além disso, houve a confirmação de maior reação inflamatória com o uso da droga, pela ação do AVP alterando a expressão da proteína p21, aumento da proteína p27, redução de reguladores do ciclo celular, como ciclina B e CDK1, além da interleucina 6 (IL-6) e TNF<sup>44-45</sup>. Vale ressaltar que, neste estudo, a análise da reação inflamatória foi semelhante nos dois grupos no terceiro dia. No entanto, no dia 7, foi moderada no grupo experimental e mínima no grupo controle ( $p=0,0476$ ). Esse nível de significância está muito próximo do limite adotado, e o pequeno tamanho da amostra não permite afirmar com certeza que há maior intensidade no grupo experimental. Em ambos os grupos, foi aguda no terceiro dia e subaguda no sétimo.

O silenciamento gênico também foi demonstrado após o tratamento com AVP, pela metilação das ilhas de nucleotídeos citosina-fosfatoguanina (CpG) presentes no sítio promotor de genes codificadores de proteínas, inativando essas células. Além disso, essas alterações podem ser herdadas após a replicação do DNA, alterando a estrutura da cromatina das novas cópias, mantendo o padrão de silenciamento, como demonstrado em certos tipos de câncer e fibrose<sup>43</sup>, além da possibilidade de restaurar a função correta dos genes no tratamento de casos de fibrose hepática<sup>42</sup>. Neste estudo, a análise da reepitelização da mucosa não mostrou diferenças significativas nos dois tempos estudados.

Havia menos vasos no grupo tratado com AVP. De acordo com Michaelis e cols., este efeito pode ser atribuído à atividade direta do AVP nas células endoteliais. Esses autores observaram inibição da proliferação, migração e formação de tubos de células endoteliais<sup>33</sup>. Engl e cols. observaram AVP inibindo a angiogênese in vivo usando o ensaio de membrana corioalantóica de frango e em tampão matrigel de camundongo<sup>46</sup>.

Para Cinati e cols., a inibição da angiogênese pode ser indireta, pois o tratamento de células de neuroblastoma com ácido valpróico 1mM causou aumento da expressão das moléculas antiangiogênicas trombospondina-1 e activina A<sup>47</sup>. Além disso, Zgouras e cols. mostraram que o tratamento com AVP da linhagem celular de adenocarcinoma de cólon Caco-2 causou redução significativa na secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), bem como regulação negativa do mRNA de VEGF e expressão de proteínas<sup>48</sup>.

A síntese da matriz intersticial e de proteínas fibrosas como o colágeno é dependente da oferta de oxigênio, o que explicaria a menor densidade de colágeno nas bexigas dos animais do grupo tratado com AVP.

Em uma análise resumida, a reação inflamatória foi muito semelhante nos dois grupos. A marcação do colágeno pelo imunomarcador apresentou pequena quantidade, sendo a maior no grupo experimento de colágeno tipo I no sétimo dia, em análise qualitativa. No entanto, a análise do picosirius-red, de viés quantitativo, permitiu o reconhecimento de maior densidade de colágeno tipo III e colágeno tipo I no sétimo dia no grupo controle. Deve-se considerar que um aumento no tamanho da amostra pode dar maior confiança aos resultados. Ainda é importante analisar a interferência do AVP na angiogênese, o que foi feito paralelamente a este estudo por outro pesquisador do mesmo grupo.

No entanto, embora o AVP possa diminuir a intensidade do processo de cicatrização, deve-se admitir que não o faz de forma a levar a riscos. Não foi observada deiscência da síntese da bexiga, órgão íntegro e protegido por aderências, além da urina límpida e de aspecto normal. Isso nos permite pensar que, quando o AVP é utilizado para auxiliar no tratamento de neoplasias e é necessária a intervenção cirúrgica, ela pode ser feita com segurança.

## **CONCLUSÃO**

O AVP determinou alterações no processo de cicatrização da bexiga em ratos, com menor densidade de colágeno e menor atividade angiogênica, mas sem comprometer a integridade do órgão.

## ABSTRACT

**Purpose:** to recognize the effects of valproic acid (VPA), an epigenetic drug, on the bladder healing process, in rats. **Method:** twenty male Wistar rats were divided in two groups: experimental (A), treated with VPA (150mg/Kg/day), and control (B) with 0.9% sodium chloridrate. Healing was analyzed on the third and seventh days, evaluating the inflammatory reaction, collagen synthesis and angiogenesis. **Results:** inflammatory reaction on the third day was minimal and acute in both groups. On the seventh day, it was subacute in both groups, moderate intensity in group A and minimal in group B ( $p=0.0476$ ). Collagen III intensity, marked by immunohistochemistry, was similar in both groups. Collagen I intensity on the third day was similar in both groups, but on the seventh day it was higher in experimental than control ( $p=0.0476$ ). Collagen evaluation by picrosiriusred allowed to verify that the presence of collagen III was similar in both groups ( $p=0.3312$ ) on the third day, and it was higher in control on the seventh day ( $p=0.0015$ ). Collagen I showed similarity on the third day ( $p=0.3100$ ), and it was higher in control on the seventh day ( $p=0.0015$ ). Vessel marked with anti-SMA counting showed fewer vessels on the third ( $p=0.0034$ ) and seventh day ( $p=0.0087$ ) in experimental group. The lower intensity of angiogenesis was confirmed with anti-CD34, on the third day ( $p=0,0006$ ) and on the seventh day ( $p=0,0072$ ). **Conclusion:** VPA determined alterations in the bladder healing process, in rats, with lower collagen density and less angiogenic activity, but without compromising the integrity of the organ.

**Keywords:** Valproic Acid. Wound Healing. Epigenesis, Genetic. Cell Proliferation. Urinary Bladder.

## REFERÊNCIAS

- Witte MB, Barbul A. General principles of lawound healing. Surg Clin North Am. 1997;77(3):509-28. doi: 10.1016/s0039-6109(05)70566-1.
- Ortonne JP, Clévy JP. Physiologie de la cicatrisation cutanée. Ver Prat 1994;44(13):1733-4. doi: 10.1016/S0000-0000(08)48530-3.
- Biondo-Simões MLP, Pante ML, Macedo VL, Garcia RF, Boell P, Moraes THC. O hormônio de crescimento e a concentração de colágeno na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. Acta Cir. Bras. 2000;15(3):78-82. doi: 10.1590/S0102-86502000000700017.
- Löscher, W. Basic pharmacology of valproate. Mol Diag Ther. 2012;29(16):669–94. doi: 10.2165/00023210-200216100-00003.
- Nowacka-Zawisza M, Wiśnik E. DNA methylation and histone modifications as epigenetic regulation in prostate cancer (Review). Oncol Rep. 2017;38(5):2587-96. doi: 10.3892/or.2017.5972.
- Ocker M. Deacetylase inhibitors - focus on non-histone targets and effects. World J Biol Chem. 2010;1(5):55-61. doi: 10.4331/wjbc.v1.i5.55.
- Xu XS, Wang L, Abrams J, Wang G. Histone deacetylases (HDACs) in XPC gene silencing and bladder cancer. J Hematol Oncol. 2011;4(1):17. doi: 10.1186/1756-8722-4-17
- Heers H, Stanislaw J, Harrelson J, Lee MW. Valproic acid as an adjunctive therapeutic agent for the treatment of breast cancer. Eur J Pharmacol. 2018; 835:61-74. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.07.057.
- Nasreddine W, Beydoun A. Valproate-induced thrombocytopenia: a prospective monotherapy study. Epilepsia. 2008;49(3):438-45. doi: 10.1111/j.1528167.2007.01429.x.
- Cassidy MR, Sherburne AC, Heydrick SJ, Stucchi AF. Combined intraoperative administration of a histone deacetylase inhibitor and a neurokinin-1 receptor antagonist synergistically reduces intra-abdominal adhesion formation in a rat model. Surgery. 2015;157(3):581-9. doi: 10.1016/j.surg.2014.09.031.
- Monteiro-Reis S, Lobo J, Henrique R, Jerónimo C. Epigenetic mechanisms influencing epithelial to mesenchymal transition in bladder cancer. Int J Mol Sci. 2019;20(2):297. doi: 10.3390/ijms20020297.
- Nowacka-Zawisza M, Wiśnik E. DNA methylation and histone modifications as epigenetic regulation in prostate cancer (Review). Oncol Rep. 2017;38(5):2587-96. doi: 10.3892/or.2017.5972.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015;136:E359–86. doi: 10.1002/ijc.29210.
- Instituto Nacional do Câncer. Síntese e Resultados da Incidência de Câncer no Brasil [acesso em 16 set 2019]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>.
- Juengel E, Meyer dos Santos S, Schneider T, Makarevic J, Hudak L, Bartsch G, et al. HDAC

- inhibition suppresses bladder cancer cell adhesion to collagen under flow conditions. *Exp Biol Med* (Maywood). 2013;238(11):1297-1304. doi: 10.1177/1535370213498975.
16. Juengel E, Najafi R, Rutz J, Maxeiner S, Makarevic J, Roos F, et al. HDAC inhibition as a treatment concept to combat temsirolimus-resistant bladder cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8(66):110016-28. doi: 10.18632/oncotarget.22454.
  17. Vizzotto Jr AO, Noronha L, Scheffel DLH, Campos ACL. Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. *J Bras Patol Med Lab* 2003;39(2):143-9. doi: 10.1590/S1676-24442003000200009.
  18. Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:479364. doi: 10.1155/2010/479364.
  19. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J*. 2001;17(20):6969-78. doi: 10.1093/emboj/20.24.6969.
  20. Giannopoulou AF, Velentzas AD, Konstantakou EG, Avgeris M, Katarachia AS, Papandreou NC, et al. Revisiting histone deacetylases in human tumorigenesis: the paradigm of urothelial bladder cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6):1291. doi: 10.3390/ijms20061291.
  21. Labus MB, Stirk CM, Thompson WD, Melvin WT. Expression of Wnt genes in early wound healing. *Wound Repair Regen*. 1998;6(1):58-64. doi: 10.1046/j.1524-475x.1998.60109.x.
  22. Weber TJ, Shankaran H, Wiley HS, Opresko LK, Chrisler WB, Quesenberry RD. Basic fibroblast growth factor regulates persistent ERK oscillations in premalignant but not malignant JB6 cells. *J Invest Dermatol*. 2010;130(5):1444-56. doi: 10.1038/jid.2009.383.
  23. Kawasaki K, Smith RS Jr, Hsieh CM, Sun J, Chao J, Liao JK. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol Cell Biol*. 2003;23(16):5726-37. doi: 10.1128/mcb.23.16.5726-5737.2003.
  24. Squarize CH, Castilho RM, Bugge TH, Gutkind JS. Accelerated Wound Healing by mTOR Activation in Genetically Defined Mouse Models. *PLoS ONE*. 2010;5(5):e10643. doi: 10.1371/journal.pone.0010643.
  25. Jung GA, Yoon JY, Moon BS, Yang DH, Kim HY, Lee SH, et al. Valproic acid induces differentiation and inhibition of proliferation in neural progenitor cells via the beta-catenin-Ras-ERK-p21Cip/WAF1 pathway. *BMC Cell Biol*. 2008;9:66. doi: 10.1186/1471-2121-9-66.
  26. Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, et al. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med*. 2001;7(4):437-43. doi: 10.1038/86507.
  27. Deroanne CF, Bonjean K, Servotte S, Devy L, Colige A, Clause N, et al. Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene*. 2002;21(3):427-36. doi: 10.1038/sj.onc.1205108.
  28. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399(6736):601-5. doi: 10.1038/21224.
  29. Rössig L, Li H, Fisslthaler B, Urbich C, Fleming I, Förstermann U, et al. Inhibitors of histone deacetylation downregulate the expression of endothelial nitric oxide synthase and compromise endothelial cell function in vasorelaxation and angiogenesis. *Circ Res*. 2002;91(9):837-44. doi: 10.1161/01.res.0000037983.07158.b1.
  30. Lee SH, Zahoor M, Hwang JK, Min do S, Choi KY. Valproic acid induces cutaneous wound healing in vivo and enhances keratinocyte motility. *PLoS One*. 2012;7(11):e48791. doi: 10.1371/journal.pone.0048791.
  31. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999;399(6736):597-601. doi: 10.1038/21218.
  32. Papapetropoulos A, García-Cardeña G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1997;100(12):3131-9. doi: 10.1172/JCI119868.

33. Michaelis M, Michaelis UR, Fleming I, Suhan T, Cinatl J, Blaheta RA, et al. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol Pharmacol.* 2004;65(3):520-7. doi: 10.1124/mol.65.3.520.
34. Byler TK, Leocadio D, Shapiro O, Bratslavsky G, Stodgell CJ, Wood RW, et al. Valproic acid decreases urothelial cancer cell proliferation and induces thrombospondin-1 expression. *BMC Urol.* 2012;12:21. doi:10.1186/1471-2490-12-21.
35. Ioachim E, Michael MC, Salmas M, Damala K, Tsanou E, Michael MM, et al. Thrombospondin-1 expression in urothelial carcinoma: prognostic significance and association with p53 alterations, tumour angiogenesis and extracellular matrix components. *BMC Cancer.* 2006;6:140. doi: 10.1186/1471-2407-6-140.
36. Dawson DW, Volpert OV, Pearce SF, Schneider AJ, Silverstein RL, Henkin J, et al. Three distinct D-amino acid substitutions confer potent antiangiogenic activity on an inactive peptide derived from a thrombospondin-1 type 1 repeat. *Mol Pharmacol.* 1999;55(2):332-8. doi: 10.1124/mol.55.2.332.
37. Huang A, Young TL, Dang VT, Shi Y, McAlpine CS, Werstuck GH. 4-phenylbutyrate and valproate treatment attenuates the progression of atherosclerosis and stabilizes existing plaques. *Atherosclerosis.* 2017;266:103-12. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.09.034.
38. Humphrey EL, Morris GE, Fuller HR. Valproate reduces collagen and osteonectin in cultured bone cells. *Epilepsy Res.* 2013;106(3):446-50. doi:10.1016/j.eplepsyres.2013.06.011.
39. Fuller HR, Man NT, Lam le T, Shamanin VA, Androphy EJ, Morris GE. Valproate and bone loss: iTRAQ proteomics show that valproate reduces collagens and osteonectin in SMA cells. *J. Proteome Res.* 2010;9(4):4228-323. doi: 10.1021/pr1005263.
40. Rishikof DC, Ricupero DA, Liu H, Goldstein RH. Phenylbutyrate decreases type I collagen production in human lung fibroblasts. *J. Cell Biochem.* 2004;91(4):740-8. doi: 10.1002/jcb.10742.
41. Hodges SJ, Yoo JJ, Mishra N, Atala A. The effect of epigenetic therapy on congenital neurogenic bladders. *Urology.* 2010;75(4):868-72. doi 10.1016/j.urology.2009.11.022.
42. Niki T, Rombouts K, De Bleser P, De Smet K, Rogiers V, Schuppan D, et al. A histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, suppresses myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture. *Hepatology.* 1999;29(3):858-67. doi: 10.1002/hep.510290328.
43. Mann DA, Mann J. Epigenetic regulation of hepatic stellate cell activation. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23(1):S108-S111. doi: 10.1111/j.1440-1746.2007.05295.x.
44. Delgado FG, Cardenas P, Castellanos JE. Valproic acid downregulates cytokine expression in human macrophages infected with dengue virus. *Diseases.* 2018;6(3):59. doi: 10.3390/diseases6030059.
45. Villar-Garea A, Esteller M. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer.* 2004;112(2):171-8. doi: 10.1002/ijc.20372.
46. Engl T, Natsheh I, Muller I, Beecken WD, Jonas D, Blaheta RA. Valproic acid induces expression of neutrophil chemoattractants of the CXC chemokine family in endothelial cells. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2004;42(10):568-74. doi: 10.5414/cpp42568.
47. Cinatl J, Jr Cinatl J, Scholz M, Driever PH, Henrich D, Kabickova H, et al. Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs.* 1996;7(7):766-73. doi: 10.1097/00001813-199609000-00008.
48. Zgouras D, Becker U, Loitsch S, Stein J. Modulation of angiogenesis-related protein synthesis by valproic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;316(3):693-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.02.105.

Recebido em: 20/06/2022

Aceito para publicação em: 10/08/2022

Conflito de interesses: não.

Fonte de financiamento: nenhuma.

#### Endereço para correspondência:

Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões

E-mail: malubiondo@gmail.com

