



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

LUCAS GUILHERME LEITE DA SILVA

**ANÁLISE DO FLUXO, COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E ESTADO REDOX SALIVAR
DOS RATOS TRATADOS COM O ANTICONVULSIVANTE ÁCIDO VALPRÓICO**

Araçatuba - SP
2025

Lucas Guilherme Leite da Silva

**Análise do fluxo, composição bioquímica e estado redox salivar dos ratos
tratados com o anticonvulsivante ácido valpróico**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de
Odontologia, Campus de Araçatuba, para
obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Data da defesa: 20/08/2025

Banca Examinadora:

Prof. Ass. Dr. Antonio Hernandes Chaves-Neto
UNESP – Faculdade de Odontologia - Campus de Araçatuba

Profa. Ass. Dra. Aline Satie Takamiya
UNESP – Faculdade de Odontologia - Campus de Araçatuba

Discente de doutorado Me. Rayara Nogueira de Freitas
UNESP – Faculdade de Odontologia - Campus de Araçatuba

Prof. Assoc. Rogério de Castilho Jacinto
UNESP – Faculdade de Odontologia - Campus de Araçatuba

Discente de doutorado Me. Laura Cesário Oliveira
UNESP – Faculdade de Odontologia - Campus de Araçatuba

Dedico este trabalho a todos que me acompanharam nesta jornada.

Em especial, aos meus pais, Jânio e Cláudia, que sempre me apoiaram em todos os momentos; às minhas irmãs, Pâmela e Carol, que me ensinaram a sempre melhorar e buscar aprender mais; e ao meu sobrinho Davi, a quem procuro ensinar a trilhar o caminho que o leve a conquistar seus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, que me guia exatamente onde devo ir e me possibilitou a conquistar muito mais do que imaginei, trazendo conforto nas decisões tomadas a cada momento.

Aos meus pais **Jânio e Cláudia** que tanto investiram na minha felicidade, muitas vezes acima das próprias, e me ensinaram que posso ser melhor a cada dia.

Às minhas irmãs **Pâmela e Carol**, as quais me empenho a seguir seus passos e admiro tanto. Aos meus avós **Ivanir e José** que participaram da minha criação e toda minha família à qual me amparo em cada dificuldade.

Ao **Prof. Antonio** que tanto acreditou em mim e investiu seu tempo, dedicação e empenho a me orientar, dando fruto a este trabalho. Serei eternamente grato por tanto carinho.

À **Profa. Aline** que me lembra a todo momento a ser um profissional humanizado e sorrir mesmo na adversidade. Me sinto extremamente sortudo por conhecer uma mulher tão resiliente.

À Doutoranda **Rayara**, juntamente com todos os membros do grupo de pesquisa da bioquímica que deram vida a este trabalho, em que orgulhosamente posso chamá-los de amigos.

Aos meus amigos, que durante 6 anos compartilharam dores, felicidades, dificuldades e glória, os quais considero parte da minha família. Desejo todo sucesso do mundo a todos vocês.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba **Prof. Alberto** Carlos Botazzo Delbem e do vice-diretor **Prof. Luciano** Tavares Angelo Cintra.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº 2021/10656-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Por fim, a mim mesmo em que durante tortuosos momentos superei para conquistar o que acreditei merecer e ser capaz.

“A persistência é o caminho para o êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

SILVA, L. G. L. **Análise do fluxo, composição bioquímica e estado redox salivar dos ratos tratados com o anticonvulsivante ácido valpróico.** 2025. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

O objetivo desta pesquisa foi analisar os efeitos do uso crônico do anticonvulsivante ácido valproico (VPA) no fluxo, composição bioquímica e estado redox salivar de ratos. Vinte e quatro ratos Wistar (6 semanas de idade) foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (n=8/grupo): Controle (C), VPA100 (100 mg/kg) e VPA400 (400 mg/kg). VPA na forma de xarope (Depakene®, Abbott Laboratórios do Brasil, LTDA.) foi administrado via gavagem intragástrica por 21 dias consecutivos. O grupo C recebeu NaCl 0,9 % no volume equivalente à dose máxima de VPA. Após o tratamento, coletamos a saliva induzida por pilocarpina dos animais, que na sequência foram eutanasiados por exsanguinação para obtenção do plasma. Imediatamente após a coleta, foram determinados o fluxo, pH e capacidade tamponante salivar. Métodos espectrofotométricos foram usados para análises salivares da proteína total (PT), amilase (AMI), eletrólitos (cálcio, fosfato, cloreto, sódio e potássio), dano oxidativo lipídico (TBARS) e dano a proteínas por carbonilação (PC), e capacidade antioxidante total. Além disso, analisamos a aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) para avaliação de dano hepático. A análise estatística empregada foi o teste de análise de variância (One-Way ANOVA) seguido do teste post hoc de Tukey ($p < 0,05$). Ambas as doses de VPA não ocasionaram danos hepáticos. Da mesma forma, os tratamentos com VPA também não afetaram o fluxo, pH, capacidade tamponante e as concentrações de PT, cloreto, sódio e potássio salivares. Porém, a atividade da AMI foi maior nos grupos VPA100 e VPA400 em relação ao grupo C, enquanto as concentrações de cálcio e fosfato decaíram no grupo VPA400 em relação ao C. TBARS salivar foi maior no grupo VPA100 comparado aos grupos C e VPA400. Em contrapartida, PC salivar foi semelhante entre os grupos. VPA100 e VPA400 tiveram maiores valores de capacidade antioxidante total, ao despeito do aumento do dano oxidativo lipídico. Conclui-se que o tratamento crônico com VPA causa alterações na composição e estado redox salivar.

Palavras-chave: anticonvulsivantes; ácido valproico; saliva; estresse oxidativo; alfa-amilase; proteínas e peptídeos salivares.

ABSTRACT

SILVA, L. G. L. **Analysis of Salivary Flow, Biochemical Composition, and Redox Status in Rats Treated with the Anticonvulsant Valproic Acid.** 2025. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

The aim of this study was to analyze the effects of chronic use of the anticonvulsant valproic acid (VPA) on salivary flow, biochemical composition, and redox status in rats. Twenty-four Wistar rats (6 weeks old) were randomly divided into three groups (n = 8/group): Control (C), VPA100 (100 mg/kg), and VPA400 (400 mg/kg). VPA in syrup form (Depakene®, Abbott Laboratórios do Brasil, LTDA.) was administered via intragastric gavage for 21 consecutive days. The C group received 0.9% NaCl in a volume equivalent to the maximum dose of VPA. After treatment, pilocarpine-induced saliva was collected from the animals, which were then euthanized by exsanguination for plasma collection. Immediately after saliva collection, flow rate, pH, and buffering capacity were determined. Spectrophotometric methods were used for salivary analyses of total protein (TP), amylase (AMY), electrolytes (calcium, phosphate, chloride, sodium, and potassium), lipid oxidative damage (TBARS), protein carbonylation damage (PC), and total antioxidant capacity. Additionally, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were assessed to evaluate hepatic damage. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test ($p < 0.05$). Both doses of VPA did not cause hepatic damage. Similarly, VPA treatments did not affect salivary flow, pH, buffering capacity, or the concentrations of TP, chloride, sodium, and potassium. However, AMY activity was higher in both the VPA100 and VPA400 groups compared to the C group, while calcium and phosphate concentrations decreased in the VPA400 group compared to C. Salivary TBARS was higher in the VPA100 group compared to the C and VPA400 groups. Conversely, salivary PC levels were similar among the groups. Both VPA100 and VPA400 exhibited higher total antioxidant capacity despite the increase in lipid oxidative damage. It is concluded that chronic VPA treatment causes alterations in salivary composition and redox status.

Keywords: anticonvulsants; valproic acid; saliva; oxidative stress; alpha-amylase; salivary proteins and peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de ação de medicamentos anticonvulsivantes clinicamente aprovados.	16
Figura 2 – Determinação do Fluxo, pH e Capacidade tamponante salivar de ratos Wistar após tratamento com VPA	23
Figura 3 – Determinação da proteína total e da atividade da amilase na saliva de ratos Wistar.	25
Figura 4 – Determinação da concentração de cálcio, fosfato, cloreto, sódio e potássio na saliva de ratos Wistar.	26
Figura 5 – Determinação da concentração de TBARs, PC e FRAP na saliva de ratos Wistar.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação do tratamento crônico com VPA nas atividades 22
plasmáticas de ALT e AST, massa corpórea final, massa e índice
das glândulas salivares

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AST	Asparto aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
cAMP/PKA	Adenosina monofosfato/proteína quinase A
CAT	Capacidade antioxidante total
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DNPH	2,4- dinitrofenilhidrazina
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GSH	L-Glutationa
GABA	Ácido γ -aminobutírico
IM	Intra-muscular
IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
mAChR	Receptores colinérgicos muscarínicos
NMDA	N-metil-D- aspartato
PC	Dano a proteínas por carbonilação
TBARs	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VPA	Ácido Valpróico
VPA100	Ácido Valpróico 100mg/kg
VPA400	Ácido Valpróico 400mg/kg

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
mg/kg	Miligramas por Kilogramas
°C	Graus Celsius
m/v	Massa/Volume
mg/m ²	Miligramas por metro quadrado
m.c.	Massa corpórea
mL	Mililitros
g/mL	Gramas por mililitros
mol/mL	Mol por mililitros
U/L	Unidades por Litros
U	Unidade
Mg	Miligramas
Mmol/L	Milimol por litros
ϵ	Coeficiente de extinção molar
$\pm$	Mais ou menos
<	Menor que

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
3 METODOLOGIA	19
3.1 Animais e Protocolo Experimental	19
3.2 Controle de Massa Corpórea, Consumo Alimentar e Ingestão de Água	19
3.3 Controle da Saliva, Determinação do Fluxo Salivar, pH e Capacidade Tamponante	20
3.4 Eutanásia, Coleta das Glândulas Salivares e Armazenamento das Amostras	20
3.5 Análise Bioquímica Salivar	21
3.6 Determinação do Dano Oxidativo Proteico e Dano Oxidativo Lipídico	21
3.7 Análise da Capacidade Antioxidante Não Enzimática (CAT)	21
3.8 Forma de Análise dos Resultados	22
4 RESULTADOS	22
4.1 Efeitos do VPA na Massa Corpórea, Consumo Alimentar e Ingestão de Água de Ratos Wistar Machos	22
4.2 Efeito do Tratamento Crônico com VPA no Fluxo, pH e Capacidade Tamponante Salivar	23
4.3 Efeito do VPA na Concentração de Proteína Total e na Atividade da Amilase na Saliva de Ratos	24
4.4 Determinação dos Eletrólitos na Saliva de Ratos Tratados com VPA	26
4.5 Avaliação do Dano Oxidativo Lipídico, Dano Oxidativo Proteico e Capacidade Antioxidante Total Não-Enzimática em Ratos Tratados com o VPA	29
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
FINANCIAMENTO	46
ANEXO	47

1 INTRODUÇÃO

A crise epilética é conceitualmente definida pela ocorrência transitória excessiva de sinais no cérebro devido a uma hiperatividade neuronal sincrônica [Falco-Walter et al., 2017]. Para ocasionar a geração de crises são necessários: o desequilíbrio entre excitação e inibição do cérebro relacionado ao disparo neuronal e descargas excessivas de potencial de ação; o descontrole do potencial da membrana neuronal e a sincronização das células nervosas [Silva & Cabral, 2008]. Também caracterizada por crises recorrentes, que são episódios breves de movimento involuntário, que podem envolver uma parte do corpo (parcial) ou todo o corpo (generalizada) [WHO, 2019]. Cerca de 50 milhões de pessoas são afetadas no mundo todo pela epilepsia, das quais 80% vivem em países de baixa e média renda e maior índice em países em desenvolvimento (8,75/1000) comparados aos países desenvolvidos (5,18/1000) [Buainain et al., 2022]. No Brasil, a prevalência da epilepsia na população apresenta-se ao longo da vida de 9,2/1000 e de epilepsia ativa de 5,4/1000 pessoas [Noronha et al., 2007]; havendo ainda uma atenção maior a faixa etária infantil devido a maior incidência do quadro clínico, variando a prevalência entre 1,5 a 8/1000 em crianças de 7-15 anos [Sampaio et al., 2010].

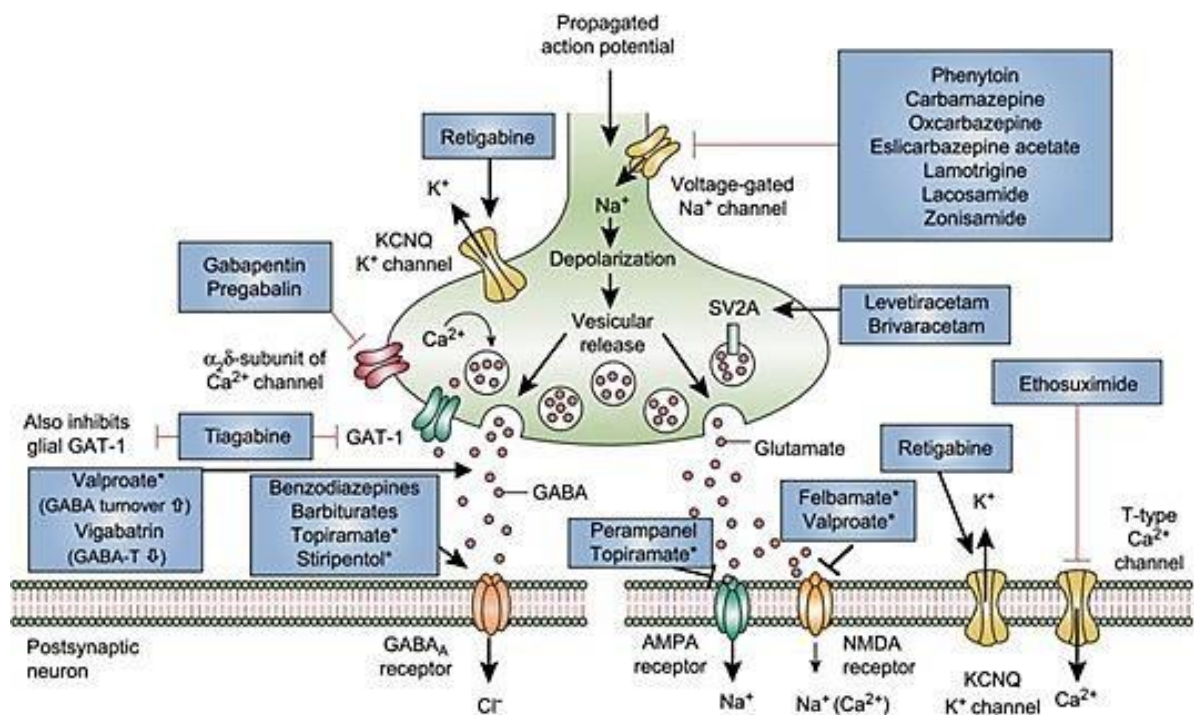
Os fármacos antiepiléticos são a base para o tratamento das crises epiléticas recorrentes [Cervenka & Kapla, 2016]. O ácido valpróico (VPA), é indicado como linha de frente no tratamento de convulsões generalizadas e síndromes epiléticas, além, da eficácia no tratamento de crises focais infantis [Tomson et al., 2016]. Além do mais, o VPA também é utilizado para como agente neuroprotetor em casos da doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose múltipla e desordem bipolar [Chateauvieux et al., 2010; Mishra et al., 2021].

Os efeitos colaterais mais significantes associados com o VPA são a teratogenicidade e a hepatotoxicidade (Mishra et al., 2021), além disso também é relatado hipotensão, taquicardia, alopecia, pele seca, náusea, dores abdominais, insuficiência hepática, amenorreia, cistite, anorexia, sonolência, dores de cabeça, ansiedade, agressividade, alucinações, e levam a maior preocupação durante o tratamento a longo prazo e politerapia [Balagura et al., 2019].

O mecanismo de ação não foi ainda consolidado, porém, evidências apontam em três principais mecanismos: a) o aumento da síntese e liberação do ácido

γ -aminobutírico (GABA), levando a potencialização da transmissão GABAérgica; b) redução da liberação de moléculas excitatórias, diminuindo a excitação neuronal através da ativação de receptores N-metil-D- aspartato (NMDA) de glutamato; e c) na atenuação do disparo neuronal de alta frequência devido ao bloqueio de canais iônicos dependentes de voltagem, como canais de sódio, cálcio e potássio [Romoli et al., 2019; Sills & Rogawski, 2020; Siniscalchi et al., 2013].

Figura 1. Mecanismo de ação de medicamentos anticonvulsivantes clinicamente aprovados.



Atualizado e modificado de Löscher e Schmidt [2012]. Os medicamentos marcados com asteriscos indicam que esses compostos agem por múltiplos mecanismos (nem todos os mecanismos mostrados aqui). GABA-T, GABA aminotransferase; GAT, GABA transportador; SV2A, glicoproteína 2A de vesícula sináptica; GABA, Ácido gama-aminobutírico; NMDA, N-metil-D-aspartato; AMPA, Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico; KCNQ uma família de canais de potássio dependentes de voltagem (também conhecidos como a família Kv7)

Fonte: [Löscher et al., 2016].

Metabolizado quase exclusivamente no fígado, estudos demonstraram que a administração crônica de VPA está associada à inibição da secreção vesicular e redução da síntese de proteínas plasmáticas, incluindo a albumina [Garanito et al.,

2009]. O estresse oxidativo cerebral durante o tratamento com o VPA foi mensurado e foi comprovado a redução de superóxido dismutase e da GSH, ambos marcadores de estresse oxidativo [Sarangi et al., 2016]. Evidências apontam que o VPA suprime o crescimento ósseo longitudinal, inibindo a formação da cartilagem e acelerando a ossificação da placa de crescimento [Wu et al., 2004]. Além do mais, houve uma diminuição da viabilidade das células-tronco mesenquimais derivadas da gengiva humana durante o tratamento com o VPA em um estudo mensurando suas proliferações, morfologia e diferenciação [Lee et al., 2018]. Apesar dos amplos efeitos colaterais, ainda não está claro os efeitos do VPA na função das glândulas salivares.

A saúde bucal dos pacientes com epilepsia está diretamente relacionada com os cuidados durante as crises epiléticas e as medicações utilizadas [Wang et al., 2019]. O controle inadequado do biofilme dentário destaca nas crianças epiléticas o déficit da higiene bucal e agravamento dos quadros de hiperplasia gengival, uma vez que as profundas bolsas periodontais formadas favorecem o crescimento de micro-organismos anaeróbicos, e acometendo em uma maior dificuldade durante a mastigação, fala, erupção dentária e problemas na estética [Yeung et al., 2019]. O número de dentes cariados, ausentes e a presença de halitose mostram-se os distúrbios bucais mais comuns nos pacientes epiléticos [Gurbuz et al., 2010].

A saliva, tanto em quantidade quanto em qualidade de sua composição, possui um importante papel para condição da saúde bucal [Llena-Puy, 2006]. Entre suas diversas funções se encontram a manutenção de uma mucosa bucal úmida [Dawes et al., 2015]. A capacidade de tamponamento da saliva regida pelos sistemas tampões de bicarbonato, fosfato e proteínas, neutralizam a redução do pH protegendo contra a cárie dentária [Gao et al., 2016]. As altas concentrações salivares de cálcio e fosfato, mantidas pelas proteínas salivares, contribuem para o processo de maturação e remineralização do esmalte dentário [Humphrey & Williamson, 2001]. Alterações na composição da saliva de pacientes epiléticos, em tratamento com VPA, foram demonstradas em estudo conduzido com um grupo de 15 pacientes (homens = 9, mulheres = 6) com idade entre 19-57 anos. Dentre os parâmetros estudados, amilase salivar e cistatina S foram alteradas pelo uso do medicamento, com aumento e redução desses parâmetros, respectivamente [Henskens et al., 1996]. Apesar da relevância do trabalho, deve-se ressaltar que as influências fisiológicas da idade e do

gênero na composição e no fluxo salivares, amplamente descritas na literatura, não foram consideradas no estudo.

Portanto, propomos investigar a hipótese de que o uso crônico do VPA utilizado para o tratamento de epilepsias causa disfunção das glândulas salivares de ratos Wistar. Os resultados obtidos contribuirão para o entendimento se os indivíduos que fazem uso crônico do ácido valpróico são mais vulneráveis a doença cárie e periodontal em função de possíveis disfunções glandulares causadas por esse anticonvulsivante. Caso a pesquisa confirme a nossa hipótese, os profissionais da saúde bucal deverão ficar atentos com as estratégias de prevenção da saúde bucal dos pacientes que fazem uso deste medicamento. A hipótese nula deste estudo foi que o ácido valpróico não afeta o fluxo, composição bioquímica e estado redox salivar de ratos.

2 OBJETIVOS

Analisar os possíveis efeitos do uso crônico do anticonvulsivante VPA no fluxo, composição bioquímica e estado redox salivar de ratos. Abordando como objetivos específicos os seguintes resultados:

- a) marcadores do dano hepático asparto aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT);
- b) massa corpórea final;
- c) massa e índice das glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais;
- d) fluxo, pH e capacidade tamponante salivar;
- e) concentração de proteína total e atividade da amilase salivar;
- f) concentração dos eletrólitos salivares cálcio, fosfato, sódio, potássio e cloreto;
- g) marcadores de danos oxidativo lipídico e proteico salivar;
- h) capacidade antioxidante total-não enzimática.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 24 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) pesando aproximadamente 200 gramas (6 semanas de idade) provenientes do biotério local. Os animais foram mantidos em caixas com maravalha em ambiente com temperatura de 22 ± 2 °C, ciclo de claro/escuro de 12 horas e umidade relativa do ar entre $55 \pm 10\%$. Água e ração comercial padrão (Neovia Nutrição e Saúde Animal LTDA, Paulínia, SP, Brasil) foram disponibilizadas à vontade durante a adaptação ao biotério (7 dias) e o período de tratamento. Pelo princípio de casualização, os animais foram distribuídos aleatoriamente (por sorteio) nos seguintes grupos ($n=8/\text{grupo}$): a) grupo controle, os animais foram tratados com solução salina NaCl 0,9% (m/v); b) grupo VPA100, os animais foram tratados com VPA 100 mg/kg; c) grupo VPA400, os animais foram tratados com VPA 400 mg/kg. O VPA foi administrado por gavagem intragástrica na forma de xarope (Depakene®, Abbott Laboratórios do Brasil, LTDA.) diariamente por 21 dias [Ezz et al., 2011; Noor et al., 2012; Akindede et al., 2015]. O grupo controle recebeu NaCl 0,9% (m/v) por gavagem intragástrica no mesmo volume equivalente à dose de 400 mg/kg. As doses de 100 mg/kg e 400 mg/kg equivalem aproximadamente à dose terapêutica inicial e a dose máxima diária em humanos, respectivamente [Depakene, 2021]. Para o cálculo das doses foi utilizado a fórmula para dose translacional baseada na superfície de área corpórea (mg/m^2) [Reagan-Shaw et al., 2008] a partir das informações fornecidas na bula do xarope [Depakene, 2021]. Essas doses também foram selecionadas com base nos resultados obtidos em diferentes estudos de toxicidade [Raza et al., 1996; Sveberg Røste et al., 2002; Hamza & El-Shenawy, 2017; Khan et al., 2011; Ourique et al., 2016a; Ourique et al., 2016b; Watanabe et al., 2019]. O protocolo experimental foi aprovado pela CEUA Local – UNESP (Processo FOA nº 0215-2021)

3.2 CONTROLE DE MASSA CORPÓREA, CONSUMO ALIMENTAR E INGESTÃO DE ÁGUA

Após a adaptação ao biotério, iniciou-se o controle da ingestão de água, ração e massa corpórea, os quais foram realizados duas vezes por semana no mesmo horário até a eutanásia dos animais.

3.3 COLETA DA SALIVA, DETERMINAÇÃO DO FLUXO SALIVAR, PH E CAPACIDADE TAMPONANTE

Após o período experimental, os animais foram anestesiados utilizando a associação de anestésicos com cloridrato de xilazina (10 mg/kg m.c., IM) e cloridrato de cetamina (75 mg/kg m.c., IM) e o fluxo salivar foi estimulado pelo nitrato de pilocarpina diluído em NaCl 0,9% (5 mg/kg m.c., intraperitoneal). A coleta de saliva foi realizada de acordo com o método descrito por [Elias et al., 2006]. Os animais foram colocados em suporte inclinado e a saliva coletada foi acumulada em frascos béquer de 10 mL pré-pesados mantidos em gelo, por 10 minutos contados a partir da primeira gota de saliva. O volume de saliva foi calculado pela diferença de peso dos frascos cheios e vazios, considerando a densidade da saliva igual a 1 g/mL. O pH e a capacidade tampão da saliva foram avaliados na saliva fresca imediatamente após a coleta. O pH salivar foi medido nas amostras de saliva com um eletrodo específico conectado a um medidor de pH, previamente calibrado. A capacidade tampão da saliva foi calculada pelo método titulométrico, de acordo com o volume de ácido láctico (0,1 mol/L) utilizado para reduzir o pH salivar até 4 ou menos. O resultado foi expresso como volume de saliva dividido pelo volume de ácido láctico [Picco et al. 2012]. Na sequência as amostras foram fracionadas e armazenadas em freezer a -80 °C até o momento das análises.

3.4 EUTANÁSIA, COLETA DAS GLÂNDULAS SALIVARES E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Imediatamente após a coleta da saliva, os animais foram eutanasiados por meio da exsanguinação por punção cardíaca. Caso fosse necessário, realizou-se a complementação da anestesia. O sangue obtido da punção cardíaca foi processado para obtenção do plasma, que foi armazenado em freezer -80 °C. Na sequência, as glândulas salivares foram imediatamente removidas, limpas de tecido aderente, secas e pesadas. O uso do índice das glândulas salivares foi usado como índice de massa relativa (relação órgão/peso corporal) [Dos Santos et al., 2022]. Na intenção de se avaliar possíveis danos hepáticos ocasionadas pelo VPA, foram determinadas as atividades plasmáticas das enzimas AST e ALT utilizando kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). Os valores foram expressos como U/L.

3.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA SALIVAR

A concentração de proteína total foi determinada usando o método de Hartree-Lowry [Hartree, 1972], usando albumina de soro bovino como padrão. A atividade de amilase foi determinada pela reação de cor do amido-iodo conforme descrito anteriormente em detalhes [Nagy et al., 2001] utilizando kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). Uma unidade (U) de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 10 mg de amido em 30 minutos de reação nas condições do ensaio descrito. Kits colorimétricos comerciais foram usados para quantificar cálcio, fósforo e cloreto (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil) seguindo as recomendações dos fabricantes para cada teste. O sódio e o potássio foram determinados por analisador de eletrólitos íon seletivo (9180, Electrolyte Analyzer, Roche®). Os valores de eletrólitos foram expressos em mmol/L.

3.6 DETERMINAÇÃO DO DANO OXIDATIVO PROTEICO E DANO OXIDATIVO LIPIDICO

A concentração da proteína carbonilada foi quantificada usando o método alcalino 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH) [Mesquita et al., 2014]. O conteúdo de carbonil foi calculado, usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{450} = 22.308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) [Buege & Aust, 1978]. A quantidade de aldeídos formados foi calculada pelo coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.7 ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL NÃO-ENZIMÁTICA (CAT)

A capacidade antioxidante total foi determinada espectrofotometricamente por meio da FRAP, conforme descrito anteriormente por Benzie e Strain [Benzie & Strain, 1996]. Os resultados foram calculados utilizando uma curva padrão com diferentes concentrações de soluções de FeSO_4 .

3.8 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Todos os dados foram analisados em duplicata. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Inicialmente, os dados foram analisados em termos de

normalidade, por meio do teste estatístico de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram submetidos ao teste de análise de variância (One-Way ANOVA) seguido do teste *post hoc* de Tukey. Para todas as análises, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA, EUA)

4. RESULTADOS

4.1. EFEITOS DO VPA NA MASSA CORPÓREA, CONSUMO ALIMENTAR E INGESTÃO DE ÁGUA DE RATOS WISTAR MACHOS

Ambos os protocolos experimentais de VPA não causaram danos hepáticos, uma vez que as atividades da AST e ALT foram semelhantes em relação ao controle (Tabela 1). Os tratamentos crônicos com VPA também não alteraram a massa corpórea final, além da ingestão de ração e água. A massa e o índice das glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais foram semelhantes entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação do tratamento crônico com VPA nas atividades plasmáticas de ALT e AST, massa corpórea final, massa e índice das glândulas salivares

Parâmetros	Controle	VPA100	VPA400
ALT (U/L)	76,61 ± 6,42	74,72 ± 7,50	68,97 ± 6,73
AST (U/L)	156,9 ± 10,93	145,2 ± 22,37	135,5 ± 15,76
Massa corporal inicial (g)	207,5 ± 9,06	211,0 ± 19,15	208,3 ± 12,99
Massa corporal final (g)	366,3 ± 8,37	370,8 ± 19,18	350,3 ± 25,04
Ingestão de ração (g/semana/grupo)	781,5 ± 47,38	741,0 ± 164,0	613,0 ± 39,60
Ingestão de água (L/semana/grupo)	1,60 ± 0,04	1,68 ± 0,31	1,38 ± 0,66
Massas das glândulas parótidas (mg)	300,0 ± 21,06	314,5 ± 37,34	295,5 ± 10,95
Massas das glândulas submandibulares (mg)	239,7 ± 9,88	254,3 ± 20,96	236,9 ± 25,75
Massas das glândulas sublinguais (mg)	44,33 ± 3,68	42,21 ± 2,16	41,71 ± 6,47
Índice das glândulas parótidas	0,834 ± 0,06	0,853 ± 0,08	0,830 ± 0,07

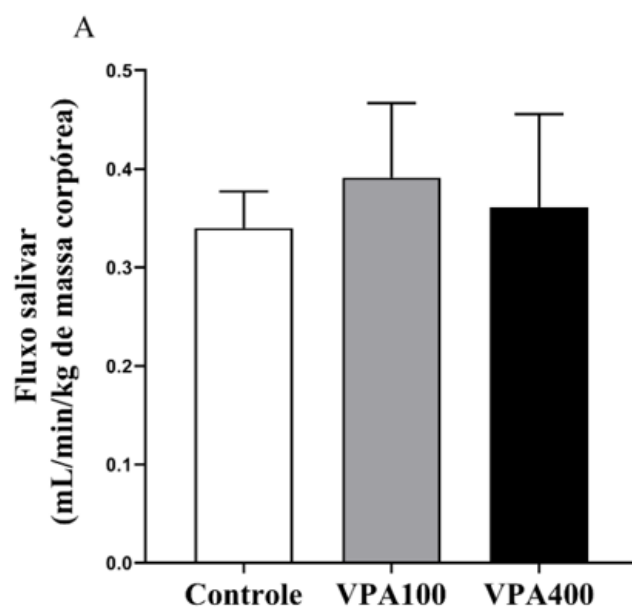
Índice das glândulas submandibulares	0,658 ± 0,02	0,697 ± 0,06	0,636 ± 0,06
Índice das glândulas sublinguais	0,120 ± 0,01	0,115 ± 0,01	0,112 ± 0,02

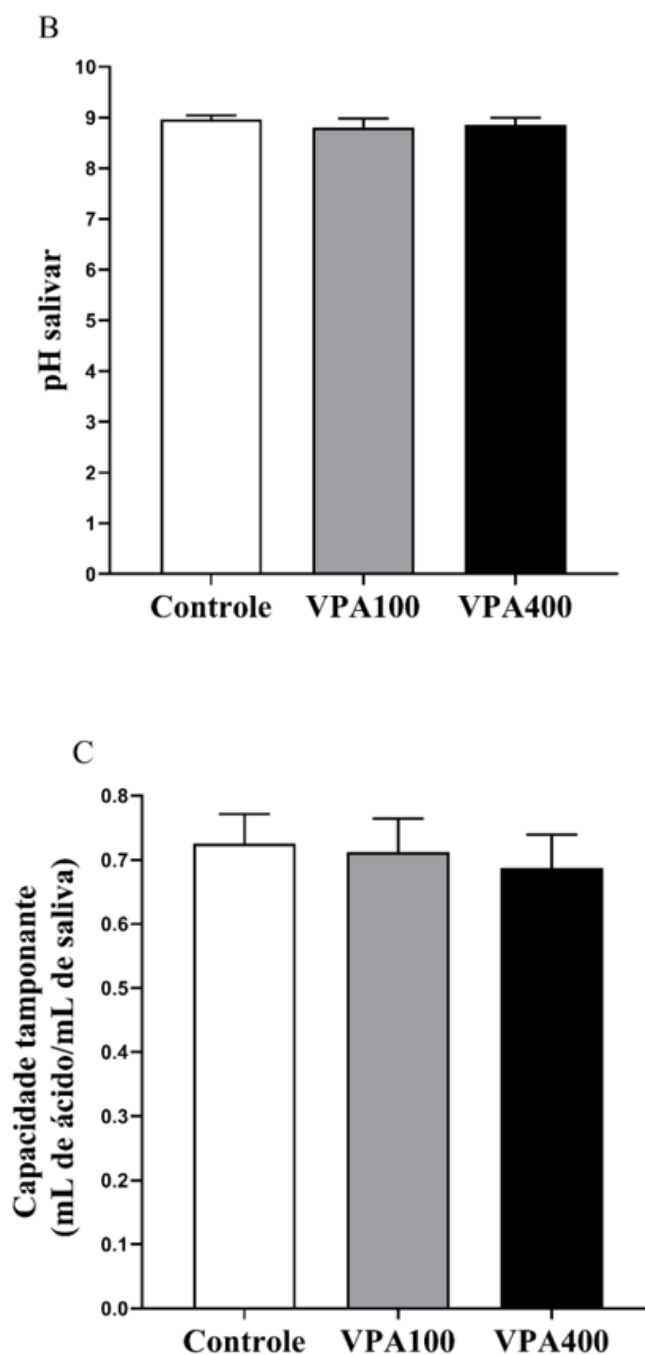
Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. A análise estatística empregada foi o teste de análise de variância (One-Way ANOVA) seguido do teste post hoc de Tukey ($p < 0,05$).

4.2. EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM VPA NO FLUXO, PH E CAPACIDADE TAMPONANTE SALIVAR

Ambos os tratamentos de VPA não exerceram efeitos anticolinérgico, uma vez que não constatamos alterações estatisticamente significantes nos parâmetros fluxo (Fig. 1A), pH (Fig. 1B) e capacidade tamponante salivar (Fig. 1C) entre os grupos experimentais e controle.

Figura 2. Determinação do Fluxo (A), pH (B) e Capacidade tamponante salivar (C) de ratos Wistar após tratamento com VPA



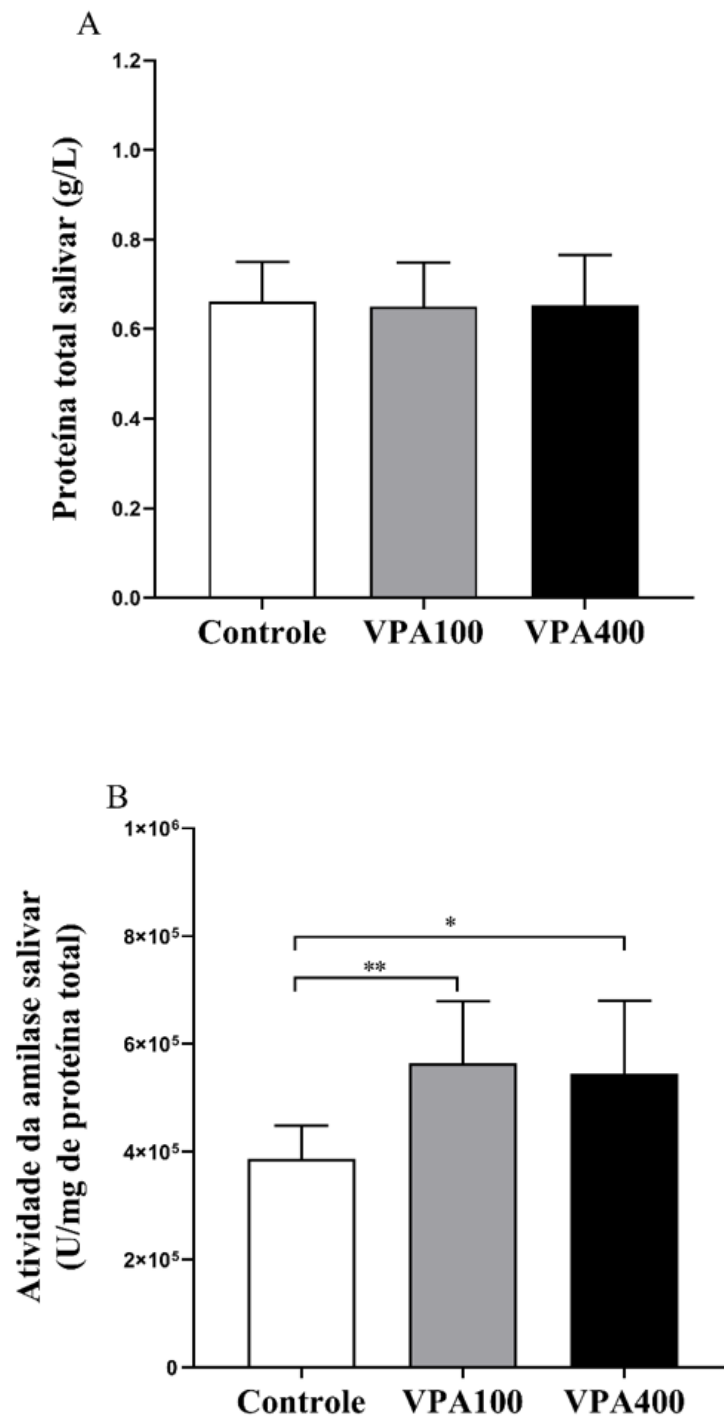


Fonte: elaborado pelo autor (2022)

4.3. EFEITO DO VPA NA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL E NA ATIVIDADE DA AMILASE NA SALIVA DE RATOS

O tratamento crônico com o VPA não afetou as concentrações de proteína total nos grupos tratados VPA100 e VPA400 (Fig. 2A). Todavia, houve uma maior atividade da amilase em ambos os protocolos experimentais VPA100 ($p < 0,05$) e VPA400 ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle (Fig. 2B).

Figura 3. Determinação da proteína total (A) e da atividade da amilase (B) na saliva de ratos Wistar.

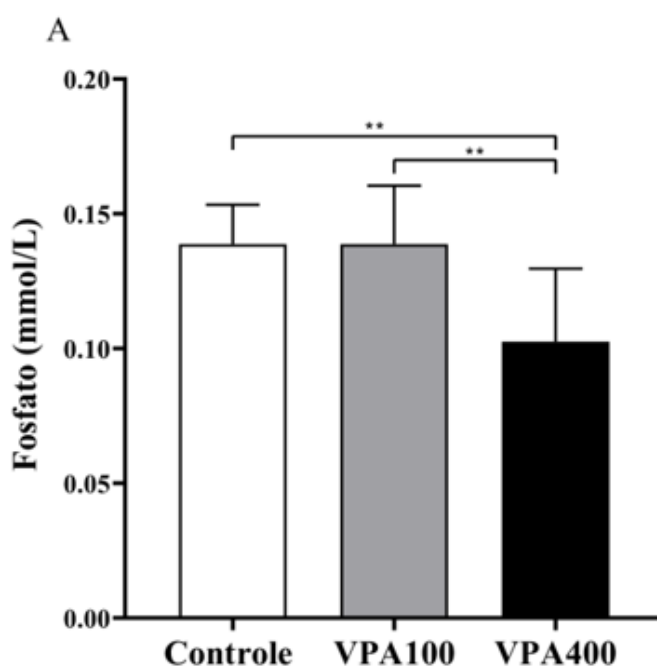


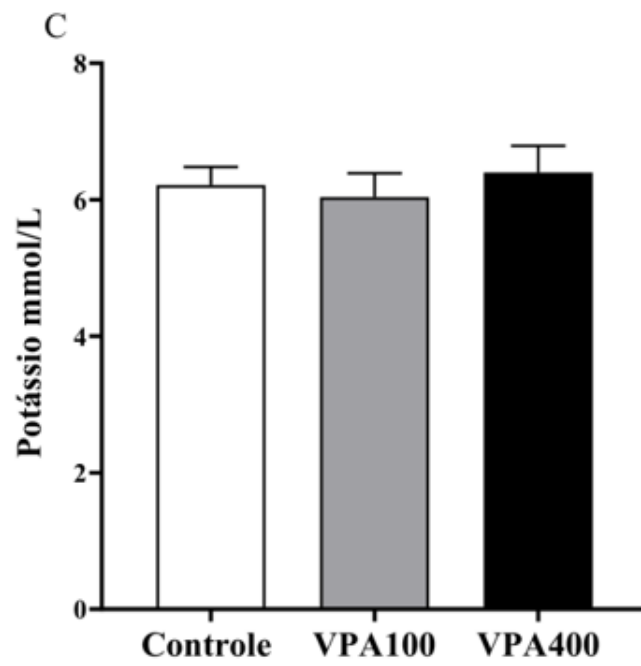
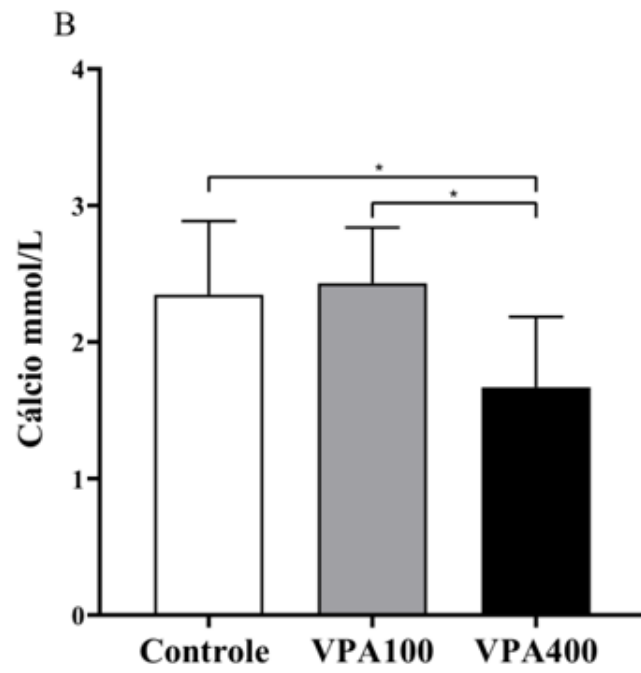
Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

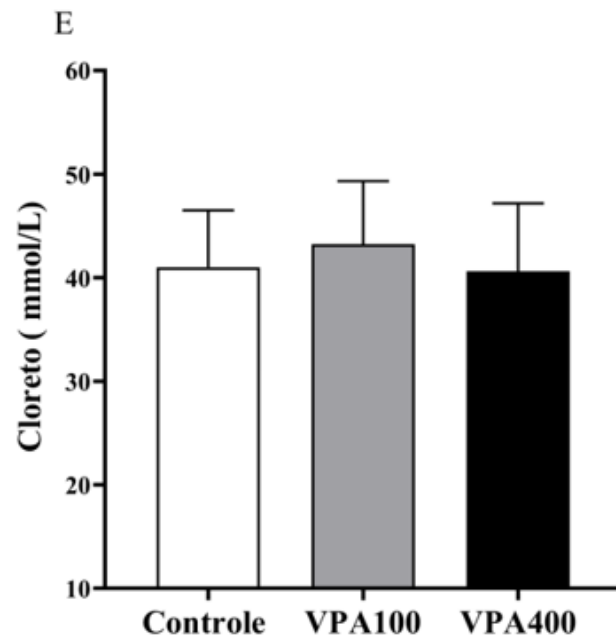
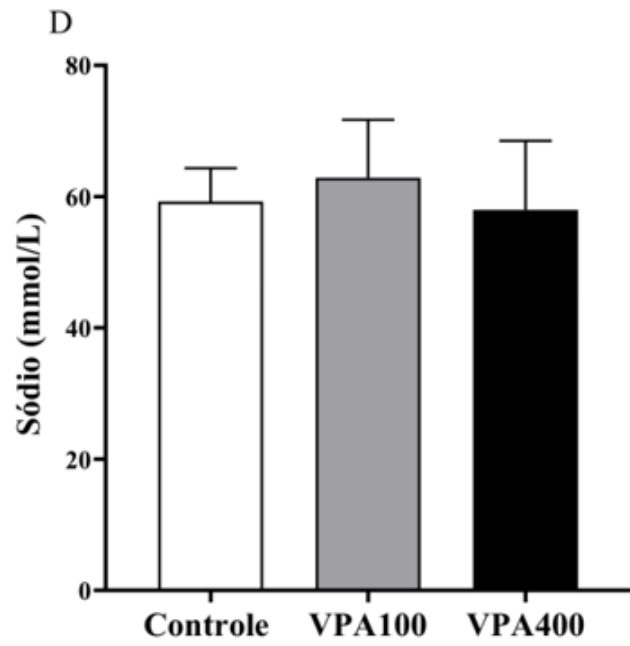
4.4. DETERMINAÇÃO DOS ELETRÓLITOS NA SALIVA DE RATOS TRATADOS COM VPA

O grupo VPA400 ($p < 0,05$) apresentou uma redução nos eletrólitos cálcio e fosfato em relação ao grupo C e ao grupo VPA100 (Fig. 3A e B), enquanto as concentrações de cloreto, sódio, potássio mostrando valores semelhantes entre os grupos (Fig. 3C, 3D e 3E).

Figura 4. Determinação da concentração de cálcio (A), fosfato (B), cloreto (C), sódio (D) e potássio (E) na saliva de ratos Wistar.





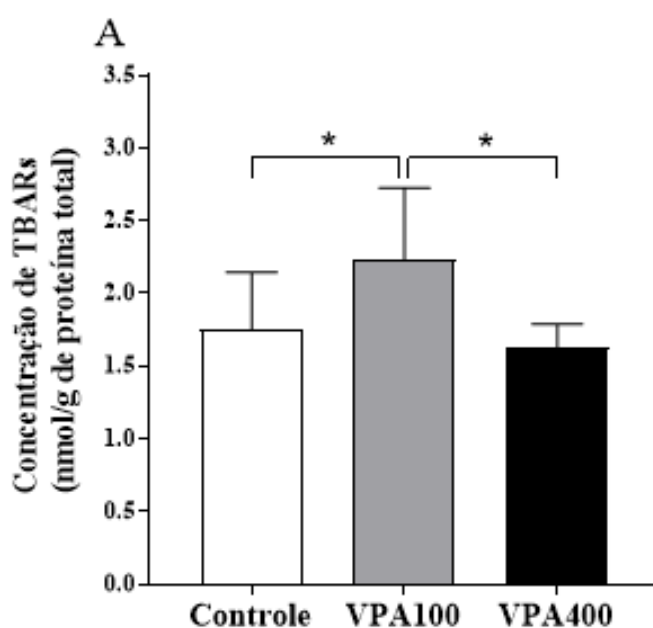


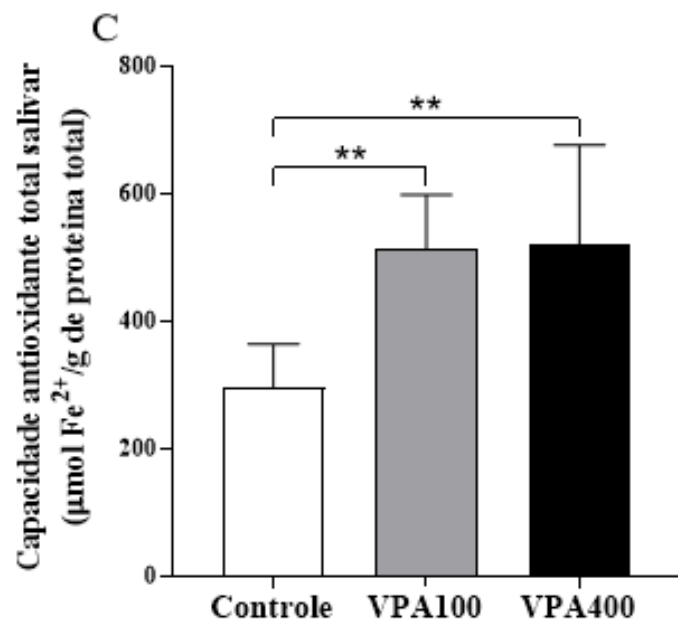
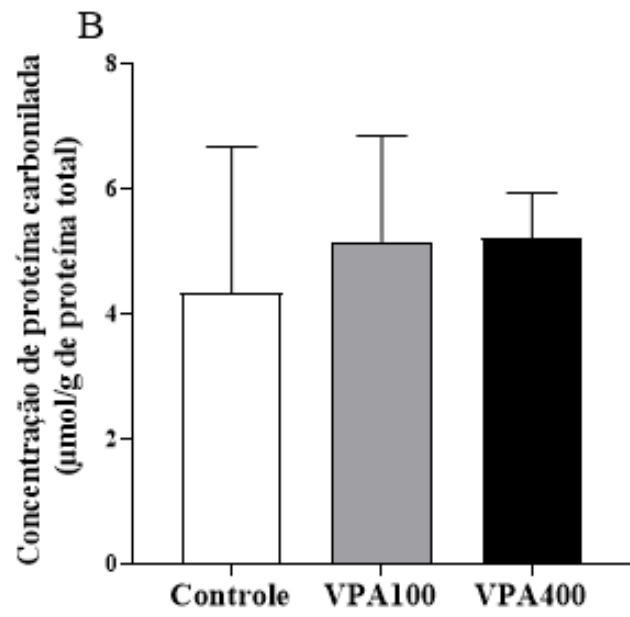
Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

4.5. AVALIAÇÃO DO DANO OXIDATIVO LIPÍDICO, DANO OXIDATIVO PROTEICO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL NÃO-ENZIMÁTICA EM RATOS TRATADOS COM O VPA

O tratamento crônico com o VPA aumentou o dano oxidativo aos lipídeos no grupo VPA100 ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e ao VPA400 (Fig. 4A). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos tratados e o controle sobre o dano oxidativo proteico (Fig. 4B). Notou-se um aumento da capacidade antioxidante total não-enzimática nos grupos VPA100 ($p < 0,05$) e VPA400 ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Fig. 4C).

Figura 5. Determinação da concentração de TBARs (A), PC (B) e FRAP (C) na saliva de ratos Wistar.





Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

5. Discussão

O presente estudo demonstrou que os tratamentos com o VPA não alteraram o fluxo, pH, capacidade tamponante e as concentrações de proteína total, cloreto, sódio e potássio salivares. Porém, a atividade da amilase foi maior nos grupos VPA100 e VPA400 em relação ao grupo C, enquanto as concentrações de cálcio e fosfato decaíram no grupo VPA400 em relação ao C. TBARs salivar foi maior no grupo VPA100 comparado aos grupos C e VPA400. Em contrapartida, a proteína carbonilada salivar foi semelhante entre os grupos. VPA100 e VPA400 tiveram maiores valores de capacidade antioxidante total não-enzimática, ao despeito do aumento do dano oxidativo lipídico. Portanto, a hipótese nula desse estudo foi parcialmente rejeitada.

Nossa pesquisa demonstrou que o tratamento diário por 21 dias com VPA 100 mg/kg e 400 mg/kg via gavagem intragástrica não foi hepatotóxico. Tais protocolos equivalem aproximadamente à dose terapêutica inicial e a dose máxima diária em humanos, respectivamente [Depakene, 2021]. Resultados semelhantes foram encontrados em ratos tratados com VPA (Depakin Chrono BT®, 500 mg, 30 tabletes, Sanofi, Paris France) por via gavagem intragástrica com a dose 500 mg/kg/dia [Koroglu et al., 2021]. Em contrapartida, é descrito que VPA possui metabólitos tóxicos que podem elevar os marcadores de estresse oxidativo e consequente hepatotoxicidade [Alqarni et al., 2022]. Por exemplo, VPA na dose de 200 mg/kg/dia administrado via intraperitoneal durante 4 semanas teve efeito hepatotóxico caracterizado pelo aumento das atividades da AST e ALT, porém, os mecanismos celulares envolvidos neste efeito não foram elucidados [Ahangar et al., 2017].

Os tratamentos crônicos com VPA também não alteraram a massa corpórea final, além da ingestão de ração e água. Resultados semelhantes foram obtidos após tratamento crônico via gavagem intragástrica de ratos Wistar com 500 mg/kg/dia (14 dias) [Koroglu et al., 2021] e 300 mg/kg/dia (15 dias) de VPA [Costalonga et al., 2017]. Todavia, observa-se o efeito contrário no tratamento com o VPA em animais Sprague-Dawley na dosagem de 300 mg/kg via gavagem intragástrica, durante 10 semanas, evidenciando a redução do ganho de massa corpórea [Khan et al., 2016].

O tamanho, massa e índice das glândulas salivares demonstram correlação

com disfunções das glândulas salivares associadas com redução do fluxo salivar em modelos experimentais animais de diabetes [Nogueira et al., 2005], radioterapia [Coppes et al., 2002; Lee et al, 2006; De la Cal et al., 2012] e em situações de desequilíbrio dietéticos [Lasisi et al., 2015; Zalewska et al., 2019]. Em nosso trabalho, ambas as doses de VPA não afetaram a massa e o índice das glândulas salivares. Esses resultados devem ser considerados com reserva, tão logo as disfunções das glândulas salivares não se restringem as alterações no fluxo salivar, como também a modificações na composição e função da saliva. Por isso, torna-se relevante a análise do conteúdo de proteína total e atividade da amilase discutidos nos próximos tópicos.

Em nosso estudo, a ausência de efeitos colaterais do VPA sobre a glândulas salivares é reforçado pelo fato dos parâmetros fluxo, pH e capacidade tamponante salivar permanecerem semelhantes entre os grupos, o que sugere que o VPA não apresenta efeitos anticolinérgicos.

A produção salivar é mediada pelos reflexos neurais do sistema nervoso autônomo sobre as glândulas salivares e difere em relação ao volume e composição dependendo dos diferentes tipos de estímulos [Pedersen et al., 2018]. A sinalização simpática é modulada pela norepinefrina atuando aos receptores adrenérgicos $\alpha 1$ e $\beta 1$ nas glândulas salivares, enquanto a sinalização parassimpática gira entorno da acetilcolina ligada aos receptores colinérgicos muscarínicos (mAChR – principalmente M1 e M3) para estimular a secreção salivar [Proctor & Carpenter, 2007; Proctor e Carpenter, 2014]. Estudo conduzido com humanos também não detectou diferenças nos valores de fluxo salivar e pH entre pacientes saudáveis e pacientes epiléticos que faziam uso dos anticonvulsivantes carbamazepina, ácido valpróico ou fenitoína [Henskens et al., 1996]. Apesar do estudo tenha tomado o cuidado em contar com uma população utilizando o mesmo esquema terapêutico para cada medicamento, os resultados devem ser considerados com reservas em função da ampla faixa etária, desequilíbrio na distribuição entre os sexos e em função do número baixo de voluntários em cada grupo. Por outro lado, crianças e adolescentes epiléticos, tratados com fenitoína apresentaram redução do fluxo e capacidade tamponante salivar em relação a indivíduos tratados com carbamazepina durante mesmo período [Lundström et al., 1982]. Apesar dos resultados importantes, esse trabalho falha em não comparar os resultados de cada anticonvulsivante com o grupo controle constituído por crianças recém-diagnosticada com epilepsia e que não receberam nenhum tipo de medicação.

Em nossa pesquisa, mesmo não apresentando alterações da concentração de proteína total dos grupos tratados comparados ao grupo controle, foi observado certa alteração na composição salivar comprovada pelo aumento da atividade da amilase salivar em ambos os protocolos experimentais VPA100 e VPA400. A secreção de proteínas é modulada pela via cíclica de sinalização adenosina monofosfato/proteína quinase A (cAMP/PKA), decorrente da interação dos receptores β_1 adrenérgicos com os neurotransmissores norepinefrina e peptídeo intestinal vasoativo [Straub et al., 2002], sugerindo, em nosso estudo, que o VPA não foi capaz de modular a secreção de proteínas como agonista do sistema adrenérgico. Por outro lado, a atividade da α -amilase salivar sintetizada nas células acinares das glândulas salivares é regulada principalmente pelo sistema nervoso autônomo simpático [Proctor & Carpenter, 2007], mostrou-se influenciada pelo tratamento crônico com o VPA. Em ensaios clínicos com pacientes submetidos a monoterapia com VPA, foi evidenciado o aumento transiente da amilase no sangue [Voudris et al., 2006; Jha et al., 1993] e urina [Jimenez-Rodriguezvila et al., 1986]. Em especial, no sangue, a hiperamilasemia transiente foi relacionada ao aumento da amilase não-específica, isto é, derivado provavelmente das glândulas salivares [Voudris et al., 2006]. Esse aumento pode ocorrer independente do quadro de pancreatite [Werlin & Fish, 2006]. Tal achado corrobora com o estudo que detectou o aumento da amilase salivar em pacientes tratados com VPA [Henskens et al., 1996]. Por fim, nossa pesquisa valida os estudos prévios, demonstram o aumento da secreção de amilase na saliva induzida por pilocarpina, todavia, os mecanismos desta disfunção nas glândulas salivares não estão claros.

Em nossos achados, o grupo VPA400 apresentou redução nas concentrações de cálcio e fosfato e os demais eletrólitos sódio, potássio e cloreto mantiveram-se semelhantes ao grupo controle em ambos os protocolos experimentais. A saliva primária isosmótica pobre em potássio é formada nas extremidades secretoras ou ácinos das glândulas e através da ação força motriz do cotransportador de sódio, potássio e cloreto ocorre a saída do cloreto da célula acinar criando um potencial transepitelial para transporte de sódio, que por sua vez, juntamente com o cloreto arrastam a água para o lúmen via trans e paracelular equilibrando a diferença osmótica [Almássy et al., 2018]. A secreção do fluido salivar é mediada por um aumento de cálcio intracelular nas células acinares em resposta a

liberação de cálcio, mediada por inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3), estocado no retículo endoplasmático via receptor de inositol trifosfato [Ambudkar, 2016]. A literatura demonstra que variáveis sistêmicas podem interferir na concentração de eletrólitos salivares, como por exemplo, em ratos castrados observa-se o aumento da concentração salivar dos íons fosfato, cálcio e cloreto [Cypriano et al., 2021], enquanto o envelhecimento fisiológico de ratos foi associado com o aumento da secreção de sódio, potássio e bicarbonato [Lasisi et al., 2014]. Ainda não estão totalmente elucidados os possíveis efeitos do VPA sobre o equilíbrio eletrolítico corpóreo. Todavia, ratas de 4-5 meses de idade tratadas por seis semanas com VPA a 500 mg/kg via intraperitoneal apresentaram aumento da secreção urinária de cálcio, enquanto o fosfato foi menor em relação ao grupo controle [Herguner et al., 2006]. Em contrapartida revisão sistemática de pacientes que utilizam o VPA a mais de dois anos, analisou-se os níveis séricos e não demonstraram associação entre o tratamento e desvios de cálcio, potássio e sódio [Meijboom et al., 2017]. Embora lesões renais graves sejam associadas com o aumento das espécies reativas de oxigênio induzida pela toxicidade renal do VPA [Gezginci-Oktayoglu et al., 2016], ainda não está claro se o mesmo pode ocorrer nas glândulas salivares. A redução de cálcio e fosfato na secreção dos eletrólitos pelas glândulas salivares em nossos resultados pode estar associada à ação metabólica do fármaco anticonvulsivante a nível neuronal periférico, de acordo com seu mecanismo de ação e receptores presentes nas glândulas salivares como descrito a seguir.

As enzimas biossintéticas do sistema GABAérgico estão amplamente distribuídos ao redor das células acinares nas glândulas salivares de ratos e intimamente relacionado ao sistema nervoso autônomo [Sawaki et al., 1995; Kosugue et al., 2009], mediando respostas inibitórias na secreção salivar [Kosuge et al., 2009]. Após 2 dias de tratamento subcrônico de pacientes com VPA na dosagem de 300 mg e 600 mg via oral, observou-se cerca de 30% do aumento sérico do GABA comparados a pacientes controle [Owens & Nemeroff, 2003]. Além disso, efeitos glutamatérgicos foram descritos na expressão gênica do RNAm para subunidades NR1, NR2A-D, e NR3A e NR3B do receptor NMDA nas glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais de ratos Wistar de 7-8 semanas de idade [Yoshikawa et al., 2022]. O VPA, por sua vez, reduz a liberação de moléculas excitatórias como o ácido β -hidroxibutírico, e reduz a excitação neuronal devido à ativação de receptores

NMDA de glutamato [Gean et al., 1994]. Apesar dessa evidência, o modelo experimental não inibiu a secreção salivar induzida pela pilocarpina. Esse resultado pode ser influenciado pela dose, frequência e tempo de tratamento com VPA. Por isso, para confirmarmos nossos resultados sugerimos para próximos experimentos aumentarmos a dose e o tempo de tratamento com o VPA.

Após avaliação do estado redox pelos marcadores de estresse oxidativo presentes na saliva, observamos um aumento do dano oxidativo lipídico salivar, demonstrando maiores níveis de TBARs nos animais VPA100 em relação ao grupo VPA400 e controle. Entretanto, os valores de proteína carbonilada mantiveram-se semelhantes entre os grupos tratados e o grupo controle, evidenciando que não houve dano proteico na composição salivar após o tratamento com VPA. Embora estudo com crianças epiléticas tenha demonstrado a capacidade do VPA e levetiracetam em aumentar a peroxidação lipídica no plasma pelo método TBARs [Haznedar et al., 2019], ainda não está elucidado os efeitos destes fármacos no estado redox salivar. Sendo assim, a hipótese do estresse oxidativo ocasionado pelo VPA sustenta-se apresentando ocorrências em outros tecidos e em diferentes biomarcadores previamente analisados na literatura. Por exemplo, em contrapartida aos nossos resultados, o estado redox na via reprodutiva analisada nos testículos e epidídimo de ratos machos Wistar tratados com VPA na dosagem de 250, 500 e 1000 mg/kg, via gavagem intragástrica por 28 dias, foi mensurado e comprovado o aumento da proteína carbonilada [Naderi et al., 2021]. Tais achados em conjunto nos indicam os efeitos comprometedores do VPA no balanço redox e seu comportamento em diferentes tecidos. Apesar desses importantes resultados, um estudo realizado em cultura de células neuronais primária isoladas de ratos Sprague-Dawley tratadas com concentrações relevantes de VPA durante 7 dias, demonstraram os efeitos neuroprotetores do VPA na atenuação da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas em células corticais cerebrais [Wang et al, 2003]. Ressalta-se que as discrepâncias entre nossos resultados e as demonstrações do estudo supracitado podem estar relacionadas as diversas variáveis: a) diferenças entre a ação neuroprotetora do VPA sobre o tecido cerebral e sua sugestiva ação sobre as glândulas salivares através do sistema neuronal periférico; b) ação neuroprotetora central do VPA devido a maior suscetibilidade do tecido cerebral ao estresse oxidativo; c) Duração do tratamento com o VPA e as distintas metodologias empregadas para a administração do

anticonvulsivante.

Observamos em nossos resultados o aumento da capacidade antioxidante total nos grupos tratados VPA100 e VPA400, embora o elevado valor não tenha sido suficiente para prevenir o aumento de TBARS no grupo VPA100. Para tanto, devemos ter cuidado ao analisar o status da capacidade antioxidante salivar tendo em vista sua interferência por diversos fatores cotidianos [Kamodyová et al., 2013]. O aumento da capacidade antioxidante salivar por sua vez, também é descrito desde modelos de cárie dentária em crianças entre 7-14 até decorrente tratamento suplementativo por vitamina C [Preethi et al., 2010; Kamodyová et al., 2013]. Todavia, é descrito na literatura os importantes efeitos antioxidantes do VPA em animais na atenuação dos danos causados pela hemorragia e isquemia nos tecidos do cérebro, no pulmão e fígado [Sher et al., 2015]. Em contrapartida, a capacidade antioxidante total analisada a partir da glutathione (GSH) no fígado de ratos Wistar normoglicêmicos e induzidos a diabetes durante 21 dias, nas dosagens de 100, 300 e 600mg/kg via oral, apresentaram-se reduzidas no grupo de menor dosagem e níveis aumentados no grupo VA300 [Akindele et al., 2015]. Considerando que de fato, alguns órgãos e tecidos possam aumentar a atividade das enzimas antioxidantes para proteger contra o estresse oxidativo [Ji & Yeo., 2021], tal aumento na capacidade antioxidante total em nossos achados coincide com a proposta de uma resposta celular compensatória à intensificação de espécies reativas de oxigênio e geração de estresse oxidativo [Dos Santos et al., 2022].

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o tratamento crônico com VPA altera a composição e provoca desequilíbrio no estado redox salivar de ratos. Para tanto, os profissionais da área da saúde bucal devem se atentar aos pacientes que fazem uso deste medicamento, uma vez que a redução da secreção de cálcio e fosfato pode afetar o produto de atividade iônica da hidroxiapatita na saliva e biofilme predispondo à cárie, além do fato de que alterações do estado redox na saliva podem aumentar a propensão a doenças periodontais.

REFERÊNCIAS

AHANGAR, N.; NADERI, M.; NOROOZI, A.; GHASEMI, M.; ZAMANI, E.; SHAKI, F. Zinc deficiency and oxidative stress involved in valproic acid induced hepatotoxicity: protection by zinc and selenium supplementation. **Biological Trace Element Research**, v. 179, n. 1, p. 102–109, set. 2017. DOI: 10.1007/s12011-017-0944-z.

AKINDELE, A. J.; OTUGUOR, E.; SINGH, D.; OTA, D.; BENEBO, A. S. Hypoglycemic, antilipidemic and antioxidant effects of valproic acid in alloxan-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 762, p. 174–183, 5 Sept. 2015.

AMBUDKAR, I. S. Calcium signalling in salivary gland physiology and dysfunction. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 11, p. 2813–2824, 1 June 2016. DOI: 10.1113/JP271143

ALMÁSSY, J.; SIGUENZA, E.; SKALICZKI, M.; MATESZ, K.; SNEYD, J.; YULE, D. I.; NÁNÁSI, P. P. New saliva secretion model based on the expression of Na⁺–K⁺ pump and K⁺ channels in the apical membrane of parotid acinar cells. **Pflügers Archiv – European Journal of Physiology**, v. 470, n. 4, p. 613–621, abr. 2018. DOI: 10.1007/s00424-018-2109-0.

ALQARNI, F.; EWEIS, H. S.; ALI, A.; ALRAFIAH, A.; ALSIENI, M.; KARIM, S.; ALKATHYRI, M. A. The effect of coenzyme Q10 on liver injury induced by valproic acid and its antiepileptic activity in rats. **Biomedicines**, v. 10, n. 1, art. 168, 13 Jan. 2022. DOI: 10.3390/biomedicines10010168

BALAGURA, G. ; IAPADRE, G. ; VERROTTI, A. ; STRIANO, P. Moving beyond sodium valproate: choosing the right anti-epileptic drug in children. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 12, p. 1449–1456, Aug. 2019. DOI: 10.1080/14656566.2019.1617850.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 15 Jul. 1996. DOI: 10.1006/abio.1996.0292

BUAINAIN, R. P.; OLIVEIRA, C. T. P.; MARSON, F. A. L.; ORTEGA, M. M. Epidemiologic profile of patients with epilepsy in a region of Southeast Brazil: data from a referral center. **Frontiers in Neurology**, v. 13, art. 822537, 10 May 2022. DOI: 10.3389/fneur.2022.822537

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: PACKER, L. (ed.). **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302–310, 1978. DOI: 10.1016/S0076-6879(78)52032-6.

CERVENKA, M. C.; KAPLAN, P. W. **Epilepsy. Seminars in Neurology**, v. 36, n. 4, p. 342–349, ago. 2016. DOI: 10.1055/s-0036-1585100.

CHATEAUVIEUX, S.; MORCEAU, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. **Journal of Biomedicine and**

Biotechnology, v. 2010, art. 479364, 2010. DOI: 10.1155/2010/479364.

COPPES, R. P.; VISSINK, A.; KONINGS, A. W. T. Comparison of radiosensitivity of rat parotid and submandibular glands after different radiation schedules. **Radiotherapy and Oncology**, v. 63, n. 3, p. 321–328, jun. 2002. DOI: 10.1016/S0167-8140(02)00129-9.

COSTALONGA, E. C.; SANTOS, A. R.; LIMA, A. S.; BARBOSA, F. A. R.; MOREIRA, L. S.; BORTOLINI, J.; FRANCO, J. L.; GARICANO, M. M. Avaliação da atividade antioxidante e da composição bioquímica da saliva de ratos tratados com ácido valproico. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, art. e0184302, 5 set. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0184302.

CYPRIANO, M. L.; SOUZA, G. C.; COSTALONGA, E. C.; GONÇALVES, J. L. F.; LIMA, A. S.; MARTINS, F. R.; ROSSI, G. C.; FRANCO, J. L.; BORTOLINI, J. C. Efeito da terapia de reposição de testosterona e do chá-mate (*Ilex paraguariensis*) nos parâmetros bioquímicos, funcionais e redox da saliva em ratos orquiectomizados. **Archives of Oral Biology**, v. 132, art. 105289, dez. 2021. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2021.105289.

DAWES, C.; PEDERSEN, A. M. L.; VILLA, A.; EKSTRÖM, J.; PROCTOR, G. B.; VISSINK, A.; AFRAMIAN, D.; MCGOWAN, R.; ALIKO, A.; NARAYANA, N.; SIA, Y. W.; JOSHI, R. K.; JENSEN, S. B.; KERR, A. R.; WOLFF, A. The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 6, p. 863–874, jun. 2015. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2015.03.004.

DE LA CAL, C.; BRIONES, M.; ESPINOZA, I.; FUENTES, R.; NAVARRO, P.; RODRÍGUEZ, P.; RUIZ, M.; VILLALÓN, M.; VILLANUEVA, L.; ZAMORA, M. Salivary biomarkers and their association with oral health status. **Open Dentistry Journal**, v. 6, p. 8–13, 2012. DOI: 10.2174/1874210601206010008.

DEPAKENE: ácido valproico. São Paulo: Abbott Laboratórios do Brasil Ltda, 2021. Bula de remédio. Disponível em: <https://dam.abbott.com/pt-br/documents/pdfs/nossas-bulas/D/BU-Depakene-Bula-Profissional-Xpe-final.pdf>. Acesso em: 02 maio 2021.

DJUKIĆ, L. J.; ROGANOVIĆ, J.; BRAJOVIĆ, M.; BOKONJIĆ, D.; STOJIĆ, D. The effects of anti-hypertensives and type 2 diabetes on salivary flow and total antioxidant capacity. **Oral Diseases**, v. 21, n. 5, p. 619–625, jul. 2015. DOI: 10.1111/odi.12325.

DOS SANTOS, D. R.; ALMEIDA, A. M.; GOMES, M. A.; et al. Evaluation of the antioxidant activity and biochemical composition of rat saliva treated with valproic acid. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 218, p. 106048, abr. 2022. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2022.106048.

ELIAS, G. P.; SANTOS, O. A. M. dos; SASSAKI, K. T.; DELBEM, A. C. B.; ANTONIALI, C. Dental mineralization and salivary activity are reduced in offspring of spontaneously hypertensive rats (SHR). **Journal of Applied Oral Science**, v. 14, n. 4, p. 253–259, ago. 2006. DOI: 10.1590/S1678-77572006000400008.

EZZ, H. S.; KHADRAWY, Y. A.; NOOR, N. A. The neuroprotective effect of curcumin and Nigella sativa oil against oxidative stress in the pilocarpine model of epilepsy: a comparison with valproate. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 11, p. 2195–2204, nov. 2011. DOI: 10.1007/s11064-011-0544-9.

FALCO-WALTER, J. J.; SCHEFFER, I. E.; FISHER, R. S. The new definition and classification of seizures and epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 139, p. 73–79, Jan. 2018. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2017.11.015.

GAO, X.; JIANG, S.; KOH, D.; HSU, C. Y.; [outros, se houver]. Salivary biomarkers for dental caries. **Periodontology 2000**, v. 70, n. 1, p. 128–141, fev. 2016. DOI: 10.1111/prd.12100.

GARANITO, M. P.; ROTHSCCHILD, C.; CAMLOFSKI, F. G. L.; CABRAL, E. Valproato de sódio: efeitos colaterais em crianças. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 27, n. 4, p. 456–460, 2009. DOI: 10.1590/S0103-05822009000400017.

GEAN, P. W.; HUANG, C. C.; HUNG, C. R.; TSAI, J. J. Valproic acid suppresses the synaptic response mediated by the NMDA receptors in rat amygdalar slices. **Brain Research Bulletin**, v. 33, n. 3, p. 333–336, 1994. DOI: 10.1016/0361-9230(94)90202-X.

GEZGINCI-OKTAYOĞLU, S.; TURKYILMAZ, I. B.; ERCIN, M.; YANARDAG, R.; BOLKENT, S. Vitamin U has a protective effect on valproic acid-induced renal damage due to its anti-oxidant, anti-inflammatory, and anti-fibrotic properties. **Protoplasma**, v. 253, n. 1, p. 127–135, jan. 2016. DOI: 10.1007/s00709-015-0796-3

GÜRBÜZ, T.; TAN, H. Oral health status in epileptic children. **Pediatrics International**, v. 52, n. 2, p. 279–283, abr. 2010. DOI: 10.1111/j.1442-200X.2009.02965.x.

HAMZA, R. Z.; EL-SHENAWY, N. S. Antioxidant and anti-inflammatory effects of carnosine on valproic acid-induced liver injury in rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 36, n. 11, p. 1212–1221, nov. 2017. DOI: 10.1177/0960327117703521.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422–427, ago. 1972. DOI: 10.1016/0003-2697(72)90094-2.

HAZNEDAR, P.; KARAKAŞ, E.; SİVAS, H.; BAYRAM, N.; YÜCEL, A.; İNANÇ, M.; ŞENTÜRK, M.; ÖZCAN, Ö. Effects of valproic acid on oxidative stress parameters and antioxidant enzyme activities in the brain of rats. **Epilepsy Research**, v. 153, p. 7–13, jul. 2019. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2019.04.006.

HENSKENS, Y. M.; VEERMAN, E. C.; AMEDEI, A.; DE GROOT, J. Salivary flow rate, protein content and levels of calcium, phosphate and chloride in patients with radiation-induced xerostomia. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 25, n. 7, p. 360–366, ago. 1996. DOI: 10.1111/j.1600-0714.1996.tb00997.x.

HERGÜNER, M. O.; ÖZDEMİR, E.; KESER, G.; OĞUZ, E.; KARAMAN, K.; TÜRKER,

H.; TAYLAN, M.; TOLUNER, E.; YILMAZ, M. Effects of valproic acid on oxidative stress parameters in patients with epilepsy. **Renal Failure**, v. 28, n. 7, p. 593–597, 2006. DOI: 10.1080/08860220600942537.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 85, n. 2, p. 162–169, fev. 2001. DOI: 10.1067/mpr.2001.113778.

Jl, L. L.; YEO, D. Redox environment, free radicals, and oxidative stress. **Faculty Reviews**, v. 10, p. 13, 9 fev. 2021. DOI: 10.12703/r/10-13.

JHA, S.; SINGH, R.; AGRAWAL, S.; VERMA, A. Evaluation of salivary flow rate and oral health status in epileptic patients. **Journal of the Indian Medical Association**, v. 91, n. 3, p. 53–54, mar. 1993.

JIMENEZ-RODRIGUEZVILA, M.; SANTANA-RODRIGUEZ, C.; MARTINEZ, J. Pharmacokinetics and bioavailability of valproic acid in epileptic patients. **International Journal of Clinical Pharmacology Research**, v. 6, n. 3, p. 217–224, 1986.

KAMODYOVÁ, N.; TÓTHOVÁ, L.; HOLLOVÁ, D.; BOTTO, I.; BAČKOVÁ, L.; FAJCSIKOVÁ, K. Salivary markers of oxidative stress in patients with periodontal disease. **Disease Markers**, v. 34, n. 5, p. 313–321, 2013. DOI: 10.1155/2013/363793.

KHAN, S.; SARFRAZ, M.; ISMAIL, H. M.; ALI, A.; AL-HUSSAINI, A.; NADEEM, M.; IQBAL, M. Valproic acid-induced reproductive toxicity in male rats: protective role of antioxidants. **Reproductive Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 385–394, dez. 2011. DOI: 10.1016/j.reprotox.2011.08.002.

KHAN, S.; SARFRAZ, M.; ISMAIL, H. M.; ALI, A.; AL-HUSSAINI, A.; NADEEM, M.; IQBAL, M. Protective effects of antioxidants against valproic acid-induced oxidative stress in rat liver. **Biochimie**, v. 125, p. 42–52, jun. 2016. DOI: 10.1016/j.biochi.2016.02.004.

KOROĞLU, O. F.; KARAKAŞ, E.; SİVAS, H.; BAYRAM, N.; YÜCEL, A.; İNANÇ, M.; ŞENTÜRK, M.; ÖZCAN, Ö. Protective effects of resveratrol against valproic acid-induced oxidative damage in rat liver tissue. **Tissue and Cell**, v. 72, p. 101526, out. 2021. DOI: 10.1016/j.tice.2021.101526.

KOSUGE, Y.; KOBAYASHI, T.; SUZUKI, S.; ISHII, S.; MIYATA, T.; TANAKA, M.; ARAI, H.; UCHIDA, K. Protective effects of edaravone on valproic acid-induced oxidative stress in rat brain. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, n. 1-3, p. 18–22, 21 maio 2009. DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.02.028.

LASISI, T. J.; ALADA, A. R. Efeitos do kwashiorkor induzido nos parâmetros salivares em ratos Wistar. **African Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 125–132, jun. 2015. Disponível em: ResearchGate. Acesso em: 22 jul. 2025.

LASISI, T. J.; FASANMADE, A. A.; ADEGBITE, A. O.; OJEBODE, T. O. Salivary flow rate and composition in sickle cell anemia patients: a preliminary study. **Annals of Ibadan Postgraduate Medicine**, v. 12, n. 2, p. 109–114, dez. 2014. DOI:

10.4314/ajpm.v12i2.5.

LEE, H.; KIM, Y.; KIM, H.; KIM, D.; CHOI, S.; KIM, J. Effects of peri-implantitis on oxidative stress biomarkers in peri-implant crevicular fluid. **Implant Dentistry**, v. 27, n. 1, p. 33–42, fev. 2018. DOI: 10.1097/ID.0000000000000681.

LEE, H. J.; LEE, J. Y.; KIM, M. J.; KIM, J. S.; KIM, S. H.; KIM, S. J.; KIM, C. H. Valproic acid-induced oxidative stress and apoptosis in human neuroblastoma cells. **American Journal of Pathology**, v. 169, n. 5, p. 1601–1611, nov. 2006. DOI: 10.2353/ajpath.2006.060432.

LLENA-PUY, C. Saliva as a diagnostic fluid. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 11, n. 5, p. E449–E455, ago. 2006. DOI: 10.4317/medoral.11.e449.

LUNDSTRÖM, A.; ELIASSON, G.; LINDGREN, S.; LINDSTRÖM, A. Salivary flow rate and buffer effect in patients with dental caries and periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 9, n. 6, p. 482–488, nov. 1982. DOI: 10.1111/j.1600-051X.1982.tb01569.x.

MEIJBOOM, R. W.; TER HEIDE, R.; THORNE, A.; DORLAND, R.; STRAUSS, M. Pharmacokinetics and clinical efficacy of valproic acid in epilepsy treatment. **CNS Drugs**, v. 31, n. 11, p. 939–957, nov. 2017. DOI: 10.1007/s40263-017-0466-7.

MESQUITA, C. S.; DIAS, M. T.; MORAES, T. J.; FRANÇA, C. C.; VILELA, M. C. Simplified method for determination of salivary proteins using microvolume spectrophotometry. **Analytical Biochemistry**, v. 458, p. 69–71, 1 ago. 2014. DOI: 10.1016/j.ab.2014.05.016.

MISHRA, M. K.; SHARMA, M.; PANDEY, A.; SHARMA, A.; SINGH, N.; KUMAR, S. Neuroprotective effects of natural antioxidants against valproic acid-induced oxidative stress in rat brain. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 104, 24 dez. 2021. DOI: 10.3390/molecules27010104.

NADERI, M.; YOUSEFI, B.; GHOLIPOUR, M.; MOHAMMADI, M.; KAZEMI, M. Protective effects of antioxidants on valproic acid-induced oxidative stress in rat liver tissue. **Anatomical Cell Biology**, v. 54, n. 3, p. 387–394, 30 set. 2021. DOI: 10.5115/acb.21.005.

NAGY, A.; ZAHORNITSA, O.; RIGÓ, J.; PÉTER, A.; TÓTH, K.; KURTÁG, J. Oxidative stress and antioxidant defense in valproic acid treated patients. **Journal of Physiology, Paris**, v. 95, n. 1-6, p. 141–145, jan.–dez. 2001. DOI: 10.1016/S0928-4257(01)0133

NORONHA, A. L.; DE SANTANA, M. M.; OLIVEIRA, G. A.; MOTA, C. S.; FONSECA, F. N.; NASCIMENTO, O. J.; DA COSTA, A. F. Evaluation of oxidative stress markers in patients with epilepsy treated with valproic acid. **Epilepsia**, v. 48, n. 5, p. 880–885, mai. 2007. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2006.01081.x.

NOGUEIRA, F. N.; DE SOUZA, D. H.; DE OLIVEIRA, A. L.; MOURA, E. G.; LOPES, M. T.; DE OLIVEIRA, D. A. Assessment of oxidative stress in epileptic patients treated

with valproic acid. **Clinica Chimica Acta**, v. 353, n. 1-2, p. 133–139, mar. 2005. DOI: 10.1016/j.cccn.2004.12.014.

NOOR, N. A.; SULAIMAN, M. R.; MOHAMED, Z.; RAJAB, N. F.; AHMAD, S. Evaluation of oxidative stress and antioxidant status in epilepsy patients treated with valproic acid. **Epilepsy & Behavior**, v. 24, n. 2, p. 199–206, jun. 2012. DOI: 10.1016/j.yebeh.2012.05.018.

OURIQUE, G. M.; GONÇALVES, R. V.; DE SOUZA, D. H.; DOS SANTOS, E. S.; FONSECA, F. N.; NASCIMENTO, O. J.; COSTA, A. F. Protective effects of antioxidants against valproic acid-induced oxidative stress in rat liver tissue. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 68, n. 8, p. 435–443, set. 2016. DOI: 10.1016/j.etp.2016.07.005.

OURIQUE, G. M.; GONÇALVES, R. V.; DOS SANTOS, E. S.; DE SOUZA, D. H.; FONSECA, F. N.; NASCIMENTO, O. J.; COSTA, A. F. Protective effects of curcumin against valproic acid-induced hepatotoxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 95, p. 159–167, set. 2016. DOI: 10.1016/j.fct.2016.06.021.

OWENS, M. J.; NEMEROFF, C. B. Role of valproic acid in the treatment of mood disorders: pharmacological mechanisms and clinical applications. **Psychopharmacology Bulletin**, v. 37, suplemento 2, p. 17–24, 2003.

PEDERSEN, A. M. L.; NAUNTO, T.; VIITASALO, K.; KNUUTI, J.; SAIJA, A.; PÄÄKKÖ, E.; TENOVUO, J. Salivary flow rate and composition in patients with systemic diseases and its impact on oral health. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 45, n. 9, p. 730–746, set. 2018. DOI: 10.1111/joor.12665.

PICCO, D. C.; ROMANELLO, L.; BELLINI, P. G.; MALZONI, R. A.; ALMEIDA, J. D. Effects of valproic acid on salivary oxidative stress biomarkers in rats. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 10, p. 1320–1326, out. 2012. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2012.06.012.

PREETHI, B. P.; MANJULA, N.; ARUNA, P.; ROOPA, M. Evaluation of oxidative stress in epilepsy patients treated with valproic acid. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 425–428, out. 2010. DOI: 10.1007/s12291-010-0079-0.

PROCTOR, G. B. The physiology of salivary secretion. **Periodontology 2000**, v. 70, n. 1, p. 11–25, fev. 2016. DOI: 10.1111/prd.12105.

PROCTOR, G. B.; CARPENTER, G. H. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. **Neuroscience. Basic and Clinical**, v. 133, p. 3–18, 2007. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.12.036.

PROCTOR, G. B.; CARPENTER, G. H. Salivary secretion: mechanisms and neural regulation. **Monographs in Oral Science**, v. 24, p. 14–29, 2014. DOI: 10.1159/000358518.

RAZA, M.; JOHNSTON, D. G.; WALKER, D. I.; OAKLEY, S. J.; BEATTIE, J. H. The role of oxidative stress in the pathogenesis of valproic acid-induced hepatotoxicity.

General Pharmacology, v. 27, n. 8, p. 1395–1400, dez. 1996. DOI: 10.1016/S0306-3623(96)00252-0.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB Journal**, v. 22, n. 3, p. 659–661, mar. 2008. DOI: 10.1096/fj.07-9574LSF.

ROMOLI, M.; COLOMBI, C.; SAETTA, P.; VILLA, E.; BASSO, E.; SANTORO, F. Valproic acid and oxidative stress: from cellular mechanisms to clinical applications in neurological diseases. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 10, p. 926–946, 2019. DOI: 10.2174/1570159X17666190828155007.

SAMPAIO, L. P.; LIMA, M. M.; MARTINS, M. M.; DE OLIVEIRA, A. G.; MELO, M. F.; OLIVEIRA, J. M. Oxidative stress and antioxidant status in children with epilepsy treated with valproic acid. **Pediatric Neurology**, v. 42, n. 2, p. 111–117, fev. 2010. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2009.08.007.

SARANGI, S. C.; MAJHI, B.; PANDA, S. K.; MAJHI, A. Oxidative stress and antioxidant status in epileptic patients treated with valproic acid. **Indian Journal of Medical Research**, v. 144, n. 1, p. 104–111, jul. 2016. DOI: 10.4103/0971-5916.198668.

SAWAKI, K.; TAKAHASHI, S.; TAKANO, M.; YAMAMOTO, H.; KASAI, M. Effects of valproic acid on the oxidative metabolism in rat liver microsomes. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 67, n. 4, p. 359–363, abr. 1995. DOI: 10.1254/jjp.67.359.

SHER, Y.; ELIAS, G.; NEUMAN, R.; TANG, J.; WANG, J.; ALI, S.; SHAH, A. Valproic acid-induced oxidative stress and its impact on psychiatric patients: a clinical study. **Psychosomatics**, v. 56, n. 6, p. 615–625, nov.–dez. 2015. DOI: 10.1016/j.psych.2015.06.006.

SILLS, G. J.; ROGAWSKI, M. A. Mechanisms of action of antiseizure drugs and the ketogenic diet. **Neuropharmacology**, v. 168, p. 107966, 15 maio 2020. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.107966.

SILVA, L. G. L.; CABRAL, F. R. Oxidative stress and epilepsy: a review of the effects of valproic acid. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 14, p. 39–45, nov. 2008.

SINISCALCHI, A.; BELLINI, G.; MAZZUCHELLI, L.; GIUSTI, A. M.; MUNGO, E.; PELLACANI, C. Neuroprotective effects of antioxidants in valproic acid-induced toxicity: an in vivo study. **European Journal of Pharmacology**, v. 718, n. 1-3, p. 10–16, 15 out. 2013. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.08.023.

STRAUB, S. V.; WAGNER, L. E. 2nd; BRUCE, J. I. E.; YULE, D. I. Modulation of cytosolic calcium signaling by protein kinase A-mediated phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 36, p. 31949–31956, set. 2002. DOI: 10.1074/jbc.M204610200.

SVEBERG RØSTE, L.; TAUBØLL, T. B.; ISOJÄRVI, J. I.; PAKARINEN, A. J.; HUHTANIEMI, I. T.; KNIP, M.; GJERSTAD, L. Effects of chronic valproate treatment

on reproductive endocrine hormones in female and male Wistar rats. **Reproductive Toxicology**, v. 16, n. 6, p. 767–773, nov.–dez. 2002. DOI: 10.1016/S0890-6238(02)00054-0.

THIJS, R. D.; SURGES, R.; OHANNESSIAN, C.; HOLLANDER, M. C.; SANDERS, L. Epilepsy in adults. **The Lancet**, v. 393, n. 10172, p. 689–701, 16 fev. 2019. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32596-0.

VOUDRIS, K.; LIOLIOS, C.; GITAS, G.; KARAGIORGIS, A.; VASSILIOU, A.; STERGIOU, D. Acute valproic acid overdose in children: a report of six cases. **Brain & Development**, v. 28, n. 9, p. 572–575, out. 2006. DOI: 10.1016/j.braindev.2006.06.006.

WANG, M.; LIU, J.; XU, X.; LI, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, J. Serum lipid profiles and the efficacy of valproic acid in epilepsy: a prospective study. **Seizure**, v. 65, p. 42–47, fev. 2019. DOI: 10.1016/j.seizure.2018.12.006.

WANG, J. F.; HONG, S.; GIBBONS, N. C.; WANG, Y.; KOSZTOLY, A.; KERR, D. S. Effects of valproic acid on glutamate transport and toxicity in rat cortical astrocytes. **Neuroscience**, v. 116, n. 2, p. 485–489, 2003. DOI: 10.1016/S0306-4522(02)00758-3.

WATANABE, Y.; TSUBOTA, M.; SUZUKI, A.; TANAKA, S.; NAKAMURA, K.; KAWAI, Y.; KAWAMURA, H. Effects of valproic acid on mitochondrial function and oxidative stress in rat hepatocytes. **Toxicology Letters**, v. 312, p. 195–203, 15 set. 2019. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.07.016.

WERLIN, S. L.; FISH, D. L. Gastroesophageal reflux in children with epilepsy. **Pediatrics**, v. 118, n. 4, p. 1660–1663, out. 2006. DOI: 10.1542/peds.2006-0343.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Epilepsy. Geneva: WHO**, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>. Acessado em: 02 maio 2021.

WU, S.; HUANG, Y.; YUAN, L.; CHEN, Z.; LI, Y.; ZHANG, X. Effects of valproic acid on cognitive functions in children with epilepsy. **Journal of Child Neurology**, v. 19, n. 1, p. 26–30, jan. 2004. DOI: 10.1177/088307380401900106.

YEUNG, P. M.; WONG, C. K.; KWONG, A. H.; TSE, M. W. Evaluation of salivary oxidative stress markers in patients with periodontitis and diabetes mellitus. **Journal of Investigative Clinical Dentistry**, v. 10, n. 4, p. e12479, nov. 2019. DOI: 10.1111/jicd.12479.

YOUNG, M. R.; SMITH, J. A.; BROWN, K. L.; WILSON, P. R.; TAYLOR, S. M. Cognitive outcomes in children with epilepsy treated with valproic acid: a longitudinal study. **Journal of Child Neurology**, v. 37, n. 6, p. 461–470, maio 2022. DOI: 10.1177/08830738211067422.

YOSHIKAWA, M.; TANAKA, K.; SUZUKI, T.; KOBAYASHI, H.; NAKAMURA, Y.; SATO, M. Roles of oxidative stress in neurodegenerative diseases: insights from

molecular biology and clinical studies. **Biology (Basel)**, v. 11, n. 3, p. 390, 2 mar. 2022. DOI: 10.3390/biology11030390.

ZALEWSKA, A.; WOLSKA, N.; KURZAWA, R.; ZELAZOWSKA, K.; SKORUPSKA, A.; PIETRZAK, M. The role of oxidative stress in epilepsy and the potential use of antioxidants in treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, art. 2606120, 4 jul. 2019. DOI: 10.1155/2019/2606120.

FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº **2021/10656-7**

**ANEXO A - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA – UNESP**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeitos do anticonvulsivante ácido valproico no stresse oxidativo e função secretora das glândulas salivares de ratos Wistar"**, Processo FOA nº 0215-2021, sob responsabilidade de Antonio Hernandes Chaves Neto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 27 de Maio de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 30 de Novembro de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Dezembro de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effects of the anticonvulsant valproic acid on oxidative stress and secretory function of the salivary glands of Wistar rats"**, Protocol FOA nº 0215-2021, under the supervision of Antonio Hernandes Chaves Neto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 27, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 30, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 30, 2023.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br