

Os efeitos do ácido valpróico na cicatrização do plano músculoaponeurótico da parede abdominal: estudo experimental em ratos

Effects of valproic acid on wound healing of the abdominal wall musculoaponeurotic layer: an experimental study in rats

RACHEL BIONDO SIMÕES ACBC-PR¹ ; MARIA DE LOURDES PESSOLE BIONDO SIMÕES ECBC-PR^{1,2} ; SÉRGIO OSSAMU IOSHII³ ; ROGÉRIO RIBEIRO ROBES² ; MOACIR OLIVEIRA DALL'ANTONIA² ; MATHEUS PRINCE GOEHR² ; PEDRO JUAN FURTADO NEVES² .

R E S U M O

Introdução: o ácido valpróico (VPA), droga epigenética, apresenta-se com potencial para o tratamento de neoplasias. Estudam-se seus efeitos sobre a cicatrização do plano peritônio-músculo-aponeurótico (PMA) da parede abdominal. **Método:** sessenta ratos Wistar, foram alocados em dois grupos: o experimental (VPA) e o controle (cloreto de sódio 0,9%), tratados diariamente, iniciando três dias antes da intervenção e até a eutanásia. Sob anestesia, fez-se uma laparotomia mediana que foi reparada com dois planos de síntese. As avaliações aconteceram 3, 7 e 14 dias após a cirurgia. Estudou-se a integridade das feridas, a qualidade da reação inflamatória, a intensidade do infiltrado de leucócitos, a síntese do colágeno, a intensidade da angiogênese e a presença de miofibroblastos. **Resultados:** o plano PMA mostrou-se deisciente em 11 dos 30 animais ($p=0,001$) do grupo experimento. Não houve diferença na qualidade da reação inflamatória e nem no infiltrado de leucócitos. A imuno-histoquímica revelou, no grupo experimento, menos colágeno I ($p_3=0,003$, $p_7=0,013$ e $p_{14}=0,001$) e mais colágeno III ($p_3=0,003$, $p_7=0,013$ e $p_{14}=0,001$). Colágeno avaliado pelo Sirius Supra Red F3BA mostrou, no grupo experimento, menos colágeno nos três tempos ($p<0,001$) com menos colágeno I e colágeno III ($p<0,001$). Constatou-se menor número de vasos no 3º dia ($p<0,001$) e no 7º dia ($p=0,001$) e não afetou a quantidade de miofibroblastos. **Conclusão:** o VPA mostrou deiscências do plano PMA, com reação inflamatória semelhante ao controle, menor deposição de colágeno total e de colágeno I, menor atividade angiogênica, sem interferir na quantidade de miofibroblastos.

Palavras-chave: Ácido Valproico. Epigênese Genética. Cicatrização. Parede Abdominal.

INTRODUÇÃO

O câncer, um problema de saúde em escala global, representa a segunda maior causa de óbitos no mundo¹. E números alarmantes são esperados para os próximos anos^{2,3}. Esta condição implicará em altos custos para o sistema de saúde e a busca de tratamentos eficientes e métodos de prevenção se torna imperiosa.

Neoplasias são caracterizadas por crescimento anômalo e desordenado de células, sendo dependentes de fatores genéticos e epigenéticos⁵⁻⁷. Alterações moleculares possibilitam aos tumores: evasão de supressores de crescimento, evasão do sistema imune, permissão da imortalidade replicativa, inflamação pró-tumoral, ativação de metástase e invasão, mutações e instabilidade do genoma, resistência a morte tumoral, desregulação do metabolismo energético celular,

sustentação da sinalização proliferativa e indução da angiogênese⁸.

A epigenética é uma área da biologia que envolve alterações da expressão dos genes sem que haja modificações na sequência do DNA. Os principais mecanismos envolvidos estão relacionados à metilação do DNA e a alterações das histonas, especialmente a desacetilação⁹. A metilação do DNA envolve as enzimas DNA metiltransferases que adicionam o radical metil na posição 5 do anel das citosinas (C5), alterações estas que acometem principalmente nas regiões conhecidas como ilhas CpG, que são regiões da cadeia de DNA ricas em dinucleotídeos CpG. Alterações na metilação destas regiões podem desencadear a inibição de genes supressores de tumor ou promover a ativação de oncogenes, propiciando o desenvolvimento de câncer¹⁰. Os inibidores da metiltransferase e da histona-desacetilase

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

têm surgido como alternativas terapêuticas em alguns tipos de câncer⁶.

Diversos mecanismos estão associados com a alteração das cadeias de histonas. A acetilação de resíduos de lisina presentes nestas histonas, mediadas pelas enzimas histonas acetiltransferases (HAT) e histonas desacetilases (HDAC), está relacionada com a regulação da transcrição gênica, com a apoptose, com a autofagia e com o controle do ciclo celular¹¹. Diversas drogas atuam sobre estes efeitos epigenéticos prolongando a sobrevivência dos doentes¹¹⁻²². O ácido valpróico (VPA) é uma destas drogas, com capacidade de inibir as histonas desacetilases (HDACs) das classes 1 (HDACs 1, 2, 3 e 8) e 2 (HDACs 4, 5, 7 e 9)^{23-28,29}.

O VPA tem sido usado, há décadas, para o tratamento dos transtornos bipolares e epilepsia²⁹. Artigos recentes relatam sua capacidade de diminuir alguns tipos de tumores e o seu potencial invasor. É considerada uma droga epigenética por ser capaz de levar a modificações na transcrição, na tradução e na replicação dos genes, agindo na metilação das histonas e das proteínas não histonas com remodelação da cromatina e da expressão gênica dos RNAs não codificantes (ncRNA)²⁹.

Em câncer da mama o VPA alterou a proliferação, a sobrevivência, a migração celular e a expressão de receptores hormonais das células tumorais em configurações pré-clínicas e clínicas²⁷ e em linhagens de células tumorais de bexiga, diminuiu a proliferação celular. Com o DNA hipermetilado ocorre o bloqueio da fase G1^{30,31}.

Verificou-se que o VPA possui efeitos antiangiogênicos tanto *in vitro* como *in vivo*^{27,32} provavelmente pela regulação negativa de genes pró-angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e/ou da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS). Ainda, a inibição das HDACs levam à hiperacetilação do fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1 α), fator de transcrição pró-angiogênica, que é degradado⁷.

A neoformação de vasos é essencial para a cicatrização³³ sendo necessários o fator de crescimento beta (TGF- β), o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) para que ocorra a reconstituição dos tecidos lesados^{34,35}. Logo, se por um lado a deficiência da angiogênese

poderia interferir benéficamente no crescimento tumoral, por outro lado poderia levar à cicatrização inadequada³⁶.

Alterações na cicatrização poderiam advir não só da inibição de HDAC com diminuição da proliferação e da migração celular^{27,31,37} mas também da trombocitopenia³⁸⁻⁴⁰, da diminuição dos níveis de fibrinogênio e do VEGF⁴¹.

Como o VPA influenciaria na cicatrização? Alguns autores relataram prejuízos à cicatrização⁴⁰⁻⁴² enquanto outros concluíram por efeitos benéficos⁴³⁻⁴⁶.

Em estudo recente, de nossa linha de pesquisa, estudando a cicatrização cutânea, percebeu-se que administração de VPA promoveu reação inflamatória mais intensa, diminuiu a angiogênese e a deposição de colágeno, especialmente do colágeno do tipo I. Entretanto estas alterações não levaram a prejuízos macroscópicos⁴⁷. Em outro trabalho de nosso grupo, estudando a cicatrização da bexiga urinária, percebeu-se que o VPA determinou alterações no processo cicatricial, mas não se identificaram fístulas ou deiscências⁴⁸.

Não se encontrou, na literatura revisada, estudos da ação do VPA na cicatrização aponeurótica. Se considerarmos que este plano é formado por tecido conjuntivo, denso ordenado, rico em colágeno, mas pobre em vascularização, a utilização de VPA em pacientes, especialmente, os portadores de câncer, geraria alguma preocupação, quando necessitassem ser submetidos à intervenções cirúrgicas, especialmente os acessos à cavidade abdominal feitos através da linha média.

Assim, o objetivo deste estudo foi reconhecer, em modelo murino, os efeitos do VPA sobre o processo de cicatrização da aponeurose abdominal por meio da análise da reação inflamatória, da angiogênese e da síntese do colágeno.

MÉTODOS

Este estudo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas (CEUA-Biológicas) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob o número 1313, processo 23075.058610/2019-42. Aprovado em 18 de junho de 2019. Obedeceu a Lei Federal n.º 11.794 de 08 de outubro de 2008 e seguiu as orientações da Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/

COBEA). Para determinar 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 teve por objetivo o respeito aos "3 Rs".

Foram utilizados 60 *Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia, da linhagem Wistar, machos, com 120 dias de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Paraná. Pesaram, em média $462,33 \pm 33,72g$. Foram sorteados para os grupos controle (C) e experimento (E) e novamente separados em três subgrupos de dez animais, conforme o tempo de aferição, denominados C 3, C 7, C 14, E 3, E 7 e E 14.

Os animais foram mantidos no Laboratório da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Universidade Federal do Paraná com umidade relativa do ar própria do ambiente e temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ C$), em ciclo de claro-escuro de 12 horas. Receberam ração comercial própria para a espécie e água ad libitum.

Aos ratos do grupo experimento administrouse, por gavagem, 100mg/kg/dia de VPA⁴⁹. A medicação foi iniciada três dias antes da intervenção e mantida até o dia da eutanásia. Os ratos do grupo controle receberam volume equivalente de solução de cloreto de sódio 0,9%.

Para a intervenção foram anestesiados utilizando-se injeção intramuscular de 0,1ml/100g de peso de uma solução constituída por 1,0ml de quetamina (50mg/ml) e 1,0ml de xilazina (20mg/ml). Além disso fez-se injeção intra-peritoneal de 20mg/kg de tionembutal. Para a manutenção anestésica usou-se isofluorano 1 a 1,5% associado à oxigênio 100% sob máscara inalatória.

Tiveram a parede abdominal ventral depilada, seguindo-se a fixação à prancheta cirúrgica e a antisepsia com solução alcoólica de clorexidina 2%.

Realizou-se laparotomia mediana de, aproximadamente, cinco centímetros seguida de laparorráfia com dois planos de síntese: o plano músculoaponeurótico com chuleio contínuo com fio 5.0, multifilamentar trançado de poliglactina 910 e o da pele com chuleio contínuo de fio monofilamentar de náilon 4.0. Todos os procedimentos foram realizados por um único cirurgião.

Recuperados da anestesia e feita a analgesia (cloridrato de tramadol, 5mg/kg, por via intra-muscular), os animais foram devolvidos às suas gaiolas e medicados

diariamente até o dia programado para a aferição. A eutanásia aconteceu após 3, 7 e 14 dias, realizada por médico veterinário, sob orientação das diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. Resolução n.º 37 do Ministério de Ciências, Tecnologia, Inovação e Comunicação (Brasília/DF) de 22 de fevereiro de 2018 que consiste na overdose do anestésico por injeção intraperitoneal.

Inspecionou-se a ferida para a identificação de deiscências e de secreções. De todos os animais, um segmento da parede de seis centímetros de lado, contendo a ferida cirúrgica, foi ressecado e fixado em formalina à 10% para estudo histopatológico.

Fizeram-se cortes com quatro micrômetros de espessura, que foram corados pela hematoxilina-eosina. Avaliou-se a ordenação da cicatriz e a intensidade e a qualidade da reação inflamatória utilizando-se a metodologia de Vizzotto Junior et al.⁵⁰. Os parâmetros foram classificados em acentuado, moderado, discreto e ausente e transformados em variáveis quantitativas. Aos índices que caracterizavam o processo inflamatório agudo foi atribuído sinal negativo, e aos do processo inflamatório crônico o sinal positivo, variando de -3 a +3. A somatória forneceu um escore final que permitiu a classificação do processo inflamatório em agudo, subagudo e crônico⁵⁰.

Cortes corados pela técnica do picrosírius-red F3BA permitiram o reconhecimento do colágeno^{51,52}. As imagens foram capturadas com uma câmera Sony, CCD101® e analisadas pelo aplicativo Image-Plus® 4.5 para Windows da MediaCybernetics. Foram analisados dez campos com ampliação de 400 vezes, cada campo com área de $142.901 \mu m^2$. Em cada campo determinou-se o percentual ocupado pelo colágeno e I pelo colágeno III. Uma vez que os demais tipos de colágeno presentes representam frações muito pequenas, considerou-se a somatória dos colágenos I e III como sendo o colágeno total da cicatriz. Obteve-se a média dos dez campos lidos que foi considerada para cada animal.

Novos cortes foram submetidos a cinco diferentes imunomarcadores pela técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase, conforme descrita por Hsu, Raine e Fanger⁵³. Para a identificação e quantificação dos leucócitos foi empregado o anticorpo monoclonal antileucocitário comum (anti-LCA), para a

identificação das células endoteliais e dos vasos o anti-CD34, para reconhecer os colágenos os anticorpos anti-colágeno I e anti-colágeno III e para a identificação dos miofibroblastos o anti-alpha-músculo liso (anti-AMS). As imagens foram digitalizadas com o scanner digital Axio Scan.Z1 Digital Slide Scanner® (Zeiss, Germany) e validadas pelo software Zeiss ZenLite® (Zeiss, Germany). Para estas avaliações foram lidos 10 campos de 131.307,264 µm².

Procedeu-se à análise estatística. Os resultados de variáveis quantitativas foram descritos por média, desvio padrão, mediana, mínimo, máximo e amplitude interquartilica (AIQ). Variáveis categóricas foram descritas por frequência e percentual. Para a comparação dos grupos Controle e Experimento, em relação a variáveis quantitativas, foi usado o teste t de Student para amostras independentes ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. A comparação dos dias de eutanásia (3, 7 e 14 dias) foi feita usando-se o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator e o teste post-hoc de Bonferroni ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o teste post-hoc de Dunn. Para a análise de variáveis categóricas foi usado o teste exato de Fisher. Valores de p<0,05 indicaram significância estatística. Para comparações múltiplas dos dias de sacrifício os valores de p foram corrigidos por Bonferroni. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.28.0. Armonk, NY: IBM Corp.

RESULTADOS

Não se encontrou secreção nas feridas em nenhum dos tempos observados. A pele mostrava

sinais de epiteliação semelhantes, nos três tempos avaliados. Entretanto o plano aponeurótico apresentou-se deisciente em 11 dos 30 animais do grupo experimento representando 35,67% da amostra (p=0,0001), um no 3.º dia (10%), quatro no 7.º dia (40%) e seis no 14.º dia (60%). Pode-se perceber que à medida que o tempo passava, maior era o número de animais com deiscência deste plano (Figura 1).



Figura 1. Aspectos observados nas paredes abdominais dos animais do grupo experimento que apresentaram deiscências da camada músculo-aponeurótica.

A reação inflamatória, no terceiro dia era aguda ou sub-aguda nos dois grupos. Com sete dias a reação inflamatória era aguda ou sub-aguda em todos os cortes histológicos do grupo experimento enquanto que no controle, em quatro dos dez se encontrava reação do tipo crônica (p=0,087). Aos quatorze dias, nos cortes histológicos das feridas do grupo controle, predominava a condição crônica enquanto no grupo experimento predominava a sub-aguda (p=0,179). (Tabela 1, Figura 2).

Tabela 1 - Qualidade da reação inflamatória.

Reação inflamatória	3 dias		7 dias		14 dias	
	Controle	Experimento	Controle	Experimento	Controle	Experimento
Aguda/subaguda	11 100%	10 100%	6 60%	10 100%	3 30%	7 70%
Crônico	0 0%	0 0%	4 40%	0 0%	7 70%	3 30%
Total	11	10	10	10	10	10
p* (Contr. vs. Exper.)		1		0,087		0,179

*Teste exato de Fisher p<0,05

O número de leucócitos marcados pelo anti-LCA foi maior no grupo controle, no terceiro dia, mas a diferença não foi significativa (p=0,197). No sétimo e no

décimo-quarto dia a contagem destas células foi maior no grupo experimento, mas sem diferença significativa (sete dias p=0,165 e quatorze dias p=0,315) (Tabela 2).

A média do número de vasos foi, significativamente, menor no grupo experimento aos de três dias ($p < 0,001$) e aos sete dias ($p = 0,001$). Na análise de quatorze dias, embora o grupo experimento mostrasse menor número de vasos, a diferença não foi significativa ($p = 0,139$) (Tabela 3, Figura 4).

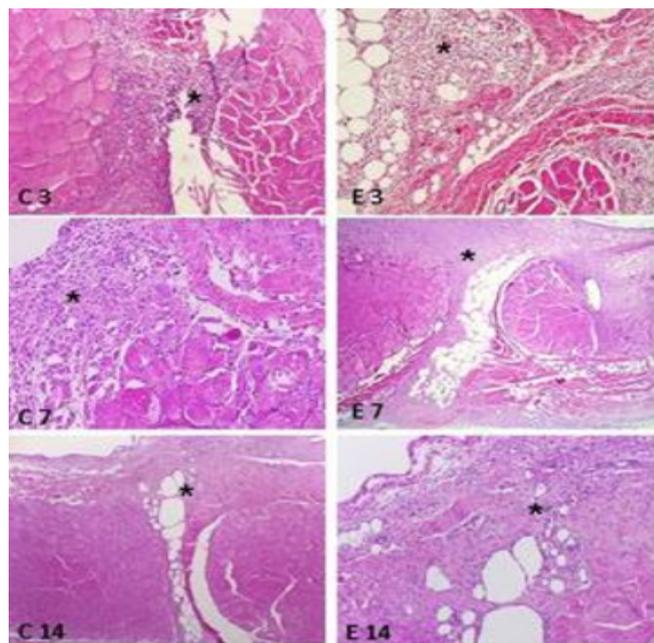


Figura 2. Fotomicrografias dos cortes histológicos da camada músculoaponeurótica mostrando aspectos da reação inflamatória (HE-200x).

Miofibroblastos eram raros nos dois grupos, no terceiro dia ($p = 0,361$). Existiam em quantidade

moderada no sétimo dia ($p = 1$) e no décimo-quarto dia ($p = 0,087$).

A análise do colágeno pela imunohistoquímica mostrou, nos três tempos, maior quantidade de colágeno I no grupo controle e maior quantidade de colágeno III, nos três tempos, no grupo experimento (três dias $p = 0,003$, sete dias $p = 0,013$ e quatorze dias $p = 0,001$).

A análise do colágeno por meio do picrosírius-red F3BA, avaliadas as áreas e obtidas as médias, mostrou menor quantidade de colágeno total no grupo experimento, nos três tempos avaliados ($p < 0,001$). Entretanto houve ganho nos dois grupos, com o progredir do processo (Figura 3). Na Figura 5 pode-se ver os aspectos do colágeno.

Analizadas as concentrações das frações de colágeno, verificou-se mais colágeno tipo I e tipo III no grupo controle, nos três tempos ($p < 0,001$).

DISCUSSÃO

A cicatrização de feridas em todos os tecidos tem comportamento semelhante. As diferenças se evidenciam no tempo de evolução que está relacionado à capacidade replicativa das células e às condições do meio. É um processo complexo que envolve inúmeras e diferentes células, sendo dividido, didaticamente em fases inflamatória, proliferativa e de remodelação^{36,54,55}.

Tabela 2 - Média de leucócitos em 10 campos (marcados por anti-LCA).

	Dia	Grupo	n	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	IIQ	p* Contr.vs. Exper.
p**	3	Contr.	11	47,27	23,70	40	25	100	30	0,197
		Exper.	10	38,40	19,24	30	24	80	20	
	7	Contr.	10	19,00	9,94	15	10	35	20	0,165
		Exper.	10	33,50	20,28	30	5	65	30	
	14	Contr.	10	7,90	2,18	8	5	10	5	0,315
		Exper.	10	10,60	5,32	10	5	20	2	
				D3xD7xD14	D3 x D7	D3 x D14	D7 x D14			
		Contr.		:	:	:	:			
				$p < 0,001$	$p = 0,050$	$p < 0,001$	$p = 0,058$			
				D3xD7xD14	D3 x D7	D3 x D14	D7 x D14			
		Exper.		:	:	:	:			
				$p < 0,001$	$p = 1$	$p = 0,001$	$p = 0,008$			

*Teste não paramétrico de Mann Whitney (LCA) ou teste de Student para amostras independentes ($p < 0,05$). **Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (LAC) ($p < 0,05$). IIQ: intervalo interquartil.

Tabela 3 - Número médio de vasos sanguíneos em 10 campos (anti-CD34).

Dia	Grupo	n	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	IIQ	p*	
3	Contr.	11	17	1,9	18	14	20	3	<0,001	
	Exper.	10	11,6	2,12	12	8	14	2		
7	Contr.	10	18,1	2,6	18	15	22	5	0,001	
	Exper.	10	13,1	3,18	14	6	17	3		
14	Contr.	10	10	2,67	9,5	7	15	3	0,139	
	Exper.	10	8,2	2,53	8	5	12	4		
p**	Contr.	:	:	:	:	:	:	:		
	Exper.	:	:	:	:	:	:	:		
			D3xD7xD14	D3 x D7	D3 x D14	D7 x D14				
			p<0,001	p=0,908	p<0,001	p<0,001				
			D3xD7xD14	D3 x D7	D3 x D14	D7 x D14				
			p=0,001	p=0,647	p=0,023	p<0,001				

*Teste t de Student para amostras independentes: p<0,05. **Teste ANOVA de um fator (CD34): p<0,05. IIQ: intervalo interquartil.

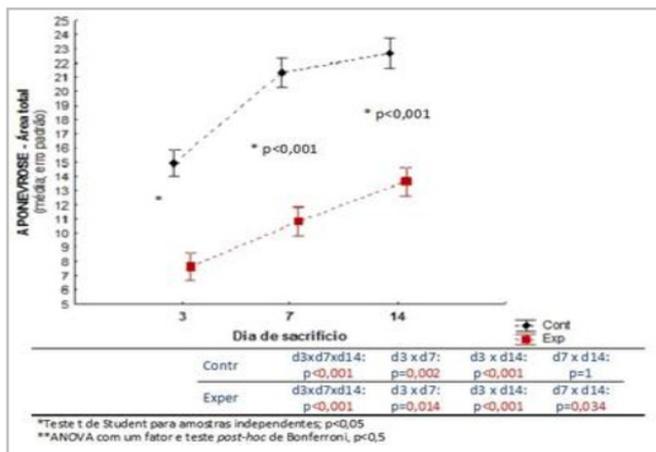


Figura 3. Área ocupada pelo colágeno, avaliada pelo Picrosirius-red F3BA.

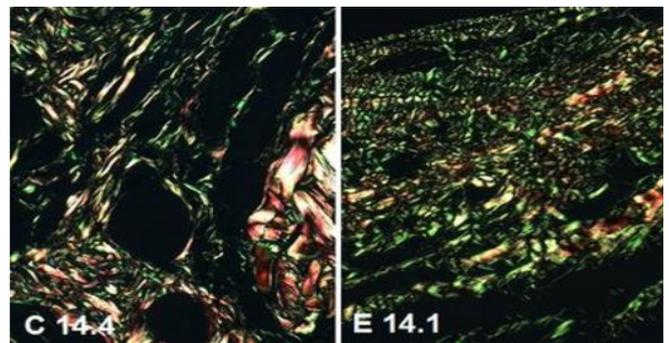


Figura 5. Fotomicrografias dos cortes histológicos no 14º dia, corados pelo Picrosirius-red F3BA (400x) (verde: colágeno tipo III; amarelo a vermelho: colágeno tipo I).

Temos muitas informações da evolução histológica do processo cicatricial, mas de sua base molecular ainda resta muito para desvendar. A regulação epigenética, incluindo a modificações de histonas e a metilação do DNA, provavelmente participa deste processo⁵⁵.

Embora existam vários mecanismos de modificação das histonas a acetilação e a metilação são os mais entendidos. Enquanto a metilação participa da ativação e da repressão de genes a acetilação está associada à ativação de genes⁵⁷.

Os macrófagos são células essenciais ao processo de cicatrização participando de todas as fases, com fenótipos que transitam do pró-inflamatório para o anti-inflamatório. Ao que tudo indica esta modificação é regulada pelas histonas metiltransferases⁵⁵.

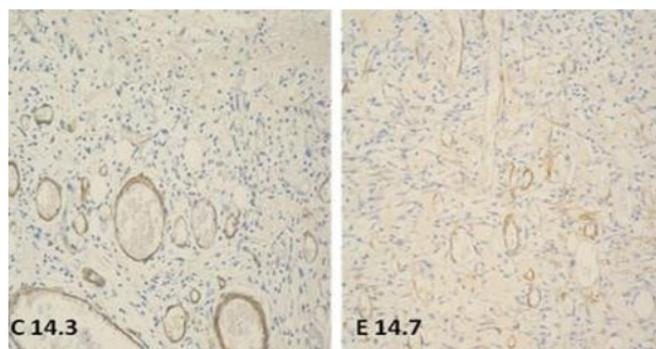


Figura 4. Fotomicrografias demonstrando a presença de vasos sanguíneos no 14º dia (anti-CD34, 200x).

O tecido de granulação, inicialmente, possui mais colágeno III. A molécula de colágeno I, por ser mais complexa vai sendo acrescentada à matriz extracelular mais lentamente. Os fibroblastos são os responsáveis pela síntese do colágeno, mas também pela síntese da fibronectina, da elastina, das lamininas, dos proteoglicanos, do ácido hialurônico e das glicoproteínas^{58,59}.

Embora se tenha descrito que os inibidores de HDAC causam acúmulo de histonas acetiladas, inibindo o crescimento de queratinócitos, ao que parece não inibem os fibroblastos⁶⁰.

Dependendo de qual histona está sendo desacetilada, efeitos diferentes são observados. As desacetilases removem grupos acetil das histonas levando à condensação da cromatina, impedindo a transcrição e desta forma bloqueando a replicação celular²⁷. A HDAC2 que pertence à classe I das histonas, ao remover o radical acetil inibe a expressão de fatores de crescimento. Entre estes fatores o fator de crescimento insulínico I (IGF-I), o fator de crescimento de fibroblastos 10 (FGF-10) e o fator de crescimento epidérmico (EGF)⁶¹.

Foi demonstrado experimentalmente, que a aplicação tópica de VPA em feridas, reduziu a área e promoveu maior migração dos queratinócitos. Os autores ainda relataram terem verificado supressão da apoptose e maior concentração de colágeno. Desta forma, em nível cutâneo haveria melhora da cicatrização⁴³. Em outro experimento utilizando a administração intra-peritoneal, os resultados foram semelhantes⁴⁴. Entretanto em estudo de nossa linha de pesquisa, estudando a cicatrização cutânea, percebeu-se que administração de VPA promoveu a diminuição da angiogênese e da deposição de colágeno, especialmente do colágeno do tipo I⁴⁷.

Experimento em porcos demonstrou que o VPA aumenta a fibrinólise⁴⁵. Níveis de α -SMA, que identificam proteínas contráteis e portanto mioblastos, assim como os marcadores para colágeno I e colágeno III estavam, em outro estudo, aumentados nas feridas tratadas pelo VPA⁴⁶.

No estudo aqui descrito a reação inflamatória, qualitativamente, mostrou evolução muito semelhante nos dois grupos. A análise da celularidade inflamatória avaliada pelo marcador anti-LCA, nos permitiu verificar a intensidade do infiltrado destas células. Encontrou-

se mais leucócitos nos cortes histológicos do grupo controle no terceiro dia e em maior número nos outros dois tempos no grupo tratado com VPA. Entretanto, em nenhum dos tempos esta diferença foi significativa. Isto nos leva a pensar que possa ter acontecido um atraso no desenvolvimento da fase inflamatória, mas que não ocorreu influência significativa no processo inflamatório.

Os experimentos relatados nos artigos consultados mostram aumento dos colágeno I e III quando usaram VPA, mas tratava-se de feridas cutâneas. Neste experimento, ora relatado, quando se utilizou a marcação pela imunistoquímica, observou-se que havia menos colágeno I nos cortes obtidos das peças dos animais tratados e mais colágeno do tipo III. Este achado permite pensar que o processo cicatricial dos animais tratados pelo VPA estivesse menos evoluído do que nos controles. A confirmação se fez pela análise sob luz polarizada dos cortes tratados pelo picrossírius-red F3BA. Pode-se constatar que havia mais colágeno nas cicatrizes das aponevroses dos controles, com maior percentual tanto do colágeno do tipo I como do tipo III. Houve discordância dos resultados relacionados ao colágeno III com os diferentes métodos de identificação. Vale ressaltar que a quantificação pelo método do picrossírius-red F3BA permite melhor análise das áreas. Mesmo assim, a maior concentração de colágeno total e da fração colágeno I no grupo controle nos permite supor que o processo de fibroplasia pode estar comprometido no grupo tratado com VPA.

A angiogênese é essencial para a manutenção e homeostase dos tecidos. Na biologia do câncer, a rede de vasos é crucial para o fornecimento de nutrientes e oxigênio para o tumor, e novos circuitos sanguíneos são essenciais para a manutenção das células tumorais⁶². Os mecanismos regulatórios na angiogênese fisiológica são coordenados, bem equilibrados e estritamente regulados por fatores pró e antiangiogênicos. Em contraste, a angiogênese tumoral é caracterizada pelo excesso de fatores pró-angiogênicos que levam à proliferação de células endoteliais (CE) descoordenadas e à migração de células de suporte⁶³. Vale lembrar que efeitos antiangiogênicos foram atribuídos ao VPA. In vitro, inibiu a proliferação de células endoteliais, reduziu a secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e inibiu a formação de tubos, no ensaio de angiogênese³²

Credita-se esta ação à regulação negativa de genes pró-angiogênicos e aos inibidores das histonas desacetilases (HDAC) que levariam à hiperacetilação do HIF-1 α , que é um fator de transcrição pró-angiogênica⁷.

O VPA, portanto, apresenta potencial anti-angiogênico e seria útil no tratamento do câncer. Verificou-se, ainda, que está envolvido na redução da expressão da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) precedida pela inibição de HDAC⁴² tendo-se constatado diminuição dos níveis de NO, que participa da proliferação endotelial, da migração e organização da angiogênese^{43,64-66}.

Neste estudo, observou-se que o grupo tratado com VPA desenvolveu menor número de vasos. Ao que tudo indica o VPA diminui o guanilato-mono-fosfato cíclico e o eNOS e por isso o VEGF se manteria baixo. Como resultado ter-se-ia menor taxa de replicação de células endoteliais e menor migração e organização de vasos^{7,27,32,42,66}.

Entretanto a neoformação de vasos é essencial para a cicatrização³³. Assim, se por um lado a deficiência da angiogênese pode ser benéfica, diminuindo o crescimento tumoral, por outro lado poderia levar à cicatrização inadequada³⁶.

O menor número de vasos, encontrados neste estudo, pode explicar, em parte, a menor deposição de colágeno, visto que esta síntese é oxigênio dependente.

Apesar de ter-se encontrado alterações na intensidade da reação inflamatória, que constitui a fase inicial, menor densidade de colágeno e menor número

de neovasos, não houve interferência no número de miofibroblastos.

A menor quantidade de vasos e a menor quantidade de colágeno podem ser a justificativa para ter-se encontrado deiscências do plano aponeurótico em mais de um terço da amostra ($p=0,0001$). Há de se observar que esta condição foi gradativamente maior com o passar do tempo, chegando a 60% dos animais no 14º dia. Verificou-se que na cicatrização cutânea e na bexiga urinária, em estudos realizados por este grupo, que estas reduções estavam presentes, mas não chegavam a causar dano macroscópico. Em nível aponeurótico, entretanto, houve prejuízo importante, talvez pelo fato da circulação ser mais pobre e existir a necessidade de maior quantidade de colágeno para desempenhar resistência, sendo esta operação oxigênio dependente.

É importante reconhecer estas alterações para que ao se intervir em paciente com câncer e que tenha recebido ou esteja recebendo tratamento associado à epigenéticos, nesta situação especial o VPA, se tenha cuidados redobrados, pois além do prejuízo à cicatrização decorrentes dos quimioterápicos ou mesmo da radioterapia soma-se os causados pelos bloqueios epigenéticos.

CONCLUSÃO

A administração de VPA levou à diminuiu da angiogênese e da deposição de colágeno, especialmente o colágeno do tipo I com deiscência do plano aponeurótico.

ABSTRACT

Introduction: valproic acid (VPA), an epigenetic drug, has potential for the treatment of neoplasms. Its effects on the healing of the peritoneal-musculo-aponeurotic plane (PMA) of the abdominal wall are studied. **Method:** sixty Wistar rats were allocated into two groups: experimental (VPA) and control (0.9% sodium chloride), treated daily, starting three days before the intervention and until euthanasia. Under anesthesia, a median laparotomy was performed and repaired with two synthetic layers. Assessments took place 3, 7 and 14 days after surgery. The integrity of the wounds, the quality of the inflammatory reaction, the intensity of the leukocyte infiltrate, collagen synthesis, the intensity of angiogenesis and the presence of myofibroblasts were studied. **Results:** there was dehiscence of the PMA plane in 11 of the 30 animals ($p=0.001$) in the experimental group. There was no difference in the quality and intensity of the inflammatory reaction. Immunohistochemistry revealed, in the experimental group, less collagen I ($p3=0.003$, $p7=0.013$ and $p14=0.001$) and more collagen III ($p3=0.003$, $p7=0.013$ and $p14=0.001$). Collagen evaluated by Sirius Supra Red F3BA showed, in the experimental group, less collagen at all three times ($p<0.001$) with less collagen I and collagen III ($p<0.001$). A lower number of vessels was found on the 3rd day ($p<0.001$) and on the 7th day ($p=0.001$) and did not affect the number of myofibroblasts. **Conclusion:** VPA showed dehiscence of the PMA plane, with less deposition of total collagen and collagen I, less angiogenic activity, without interfering with the number of myofibroblasts.

Keywords: Valproic Acid. Epigenesis, Genetic. Wound healing. Abdominal Wall.

REFERÊNCIAS

1. Padma VV. An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine*. 2015;5(4):1-6. doi: 10.7603/S40681-015-0019-4.
2. Organização Panamericana de Saúde (OPAS) / Organização Mundial da Saúde (OMS). Disponível em: paho.org/bra/index.php
3. Instituto Nacional de Câncer – INCA. Estatísticas de câncer 2022, atualizada em 24 de novembro de 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/>
4. Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>.
5. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(1):37-50. doi: 10.1038/nrd1930.
6. Perri F, Longo F, Giuliano M, Sabbatino F, Favia G, Ionna F, et al. Epigenetic control of gene expression: Potential implications for cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;111:166-72. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.01.020.
7. Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7):1414. doi: 10.3390/ijms18071414.
8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. doi: 10.1016/J.CELL.2011.02.013.
9. Topper MJ, Vaz M, Marrone KA, Brahmer JR, Baylin SB. The emerging role of epigenetic therapeutics in immuno-oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(2):75-90. doi: 10.1038/S41571-019-0266-5.
10. Miranda Furtado CL, dos Santos Luciano MC, Silva Santos RD, Furtado GP, Noraes MO, Pessoa C. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. *Epigenetics*. 2019;14(12):1164-76. doi: 10.1080/15592294.2019.1640546.
11. Kulka LAM, Fangmann PV, Panfilova D, Olzscha H. Impact of HDAC inhibitors on protein quality control systems: consequences for precision medicine in malignant disease. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:425. doi: 10.3389/fcell.2020.00425.
12. Chen QW, Zhu XY, Li YY, Meng ZQ. Epigenetic regulation and câncer (review). *Oncol Rep*. 2014;31(2):523-32. doi: 10.3892/or.2013.2913.
13. Dimopoulos K, Grønbaek K. Epigenetic therapy in hematological cancers. *APMIS* 2019;127(5):316–28. doi: 10.1111/apm.12906.
14. Fontes Sousa M, Amorin M, Salta S, De Sousa SP, Henrique R, Jeónimo C. Predicting resistance to endocrine therapy in breast cancer: It's time for epigenetic biomarkers (Review). *Oncol Rep*. 2019;41(3):1431-8. doi: 10.3892/or.2019.6967.
15. Zucchetti B, Shimada AK, Katz A, Curigliano G. The role of histone deacetylase inhibitors in metastatic breast cancer. *Breast*. 2019;43:130-4. doi: 10.1016/j.breast.2018.12.001.
16. 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.
17. Herrera-Solorio AM, Armas-López L, et al. Histone code and long non-coding RNAs (lncRNAs) aberrations in lung cancer: implications in the therapy response. *Clin Epigenetics*. 2017;9:98. doi: 10.1186/s13148-017-0398-3.
18. Duruisseaux M, Esteller M. Lung cancer epigenetics: from knowledge to applications. *Semin Cancer Biol*. 2018;51:116-28. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.09.005.
19. Jiao J, Sagnelli M, Shi B, Fang Y, Shen Z, Tang T, et al. Genetic and epigenetic characteristics in ovarian tissues from polycystic ovary syndrome patients with irregular menstruation resemble those of ovarian cancer. *BMC Endocr Disord*. 2019;19(1):30. doi: 10.1186/s12902-019-0356-5.
20. Nowacka-Zawisza M. 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.
21. González-Flores E, Hernández R, Álvarez PJ, Cabeza L, Perazzoli G, Zafra I, et al. DNA methylation patterns as molecular biomarkers: an overview in colorectal cancer. *Eur J Anat*. 2018;22(4):303-16. doi: 10.1177/1533034616682155.
22. Han T-S, Ban HS, Hur K, Cho H-S. The epigenetic regulation of HCC metastasis. *Int. J. Mol. Sci*.

- 2018;19(12):3978. doi: 10.3390/ijms19123978.
23. Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J*. 2001;20,6969-78. doi: 10.1093/emboj/20.24.6969.
 24. Kostrouchová M, Kostrouch Z, Kostrouchová M. Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia Biologica*. 2007; 53(2):37-49.
 25. 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.
 26. Mummaneni P, Shord SS. Epigenetics and oncology. *Pharmacotherapy*. 2014;34(5):495-505. doi: 10.1002/phar.1408.
 27. Heers H, Stanislow 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.
 28. Gatla HR, Muniraj N, Thevkar P, Yavvari S, Sukhvasi S, Makena MR. Regulation of chemokines and cytokines by histone deacetylases and an update on histone decetylase inhibitors in human diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1110. doi: 10.3390/ijms20051110.
 29. Reynolds MF, Sisk EC, Rasgon NL. Valproate and neuroendocrine changes in relation to women treated for epilepsy and bipolar disorder: a review. *Curr Med Chem*. 2007;14(26):2799-812. doi: 10.2174/092986707782360088.
 30. Xu K, Yu FS. Impaired epithelial wound healing and EGFR signaling pathways in the corneas of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(6):3301-8. doi: 10.1167/iovs.10-5670.
 31. Byun SS, Kim FJ, Khandrika L, Kumar B, Koul S, Wilson S, et al. Differential effects of valproic acid on growth, proliferation and metastasis in HTB5 and HTB9 bladder cancer cell lines. *Cancer Lett*. 2009;281(2):196-202. doi: 10.1016/j.canlet.2009.02.045.
 32. Osuka S, Takano S, Watanabe S, Ishikawa E, Yamamoto T, Matsumura A. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and glioma angiogenesis in vivo in the brain. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2012;52(4):186-93. doi: 10.2176/nmc.52.186.
 33. Ramjiawan RR, Griffioen AW, Duda DG. Anti-angiogenesis for câncer revisited: is there a role for combinations with immunotherapy? *Angiogenesis*. 2017;20(2):185. doi: 10.1007/S10456-017-9552-Y.
 34. Tonnesen MG, Feng X, Clark RAF. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2000;5(1):40-6. doi: 10.1046/J.1087-0024.2000.00014.X.
 35. Wallace HA, Basehore BM, Zito PM. Wound healing phases. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2017. Disponível em: <https://europepmc.org/article/NBK/nbk470443>.
 36. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. *Eur Surg Res*. 2017;58(1-2):81-94. doi: 10.1159/000454919.
 37. Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, Herrera LA. Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev*. 2008;34(3):206-22. doi: 10.1016/j.ctrv.2007.11.003.
 38. Nasreddine W, Beydoun A. Valproate-induced thrombocytopenia: a prospective monotherapy study. *Epilepsia*. 2008;49(3):438-45. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01429.x.
 39. Vasudev K, Keown P, Gibb I, McAllister-Williams RH. Hematological effects of valproate in psychiatric patients: what are the risk factors? *J Clin Psychopharmacol*. 2010;30(3):282-5. doi: 10.1097/JCP.0b013e3181db2684.
 40. Tseng, Y-T, HO P-S, Wang C-F, Liang C-S. Valproic acid-induced thrombocytopenia may cause wound nonhealing in individuals with schizophrenia. *Psychosomatics*. 2015;56(4):410-3. doi: 10.1016/j.psych.2014.02.007.
 41. 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.
42. 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.
 43. Lee S, Zahoor M, Hwang J, Min DS, Choi K. Valproic acid induces cutaneous wound healing in vivo and enhances keratinocyte motility. *PLoS One*. 2012;7(11):e48791. doi: 10.1371/journal.pone.0048791.
 44. Ala M, Razieh MJ, Hossein N, Mohammad RG, Ahmad RD. Sodium valproate improves skin flap survival via gamma-aminobutyric acid and histone deacetylase inhibitory system. *J Surg Res*. 2020;246(2):519-26. doi: 10.1016/j.jss.2019.00.036.
 45. Bambakidis T, Dekker SE, Halawish I, Liu B, Nikolian VC, Georgoff PE, et al. Valproic acid modulates platelet and coagulation function ex vivo. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2017;28(6):479-84. doi: 10.1097/MBC.0000000000000626.
 46. Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol*. 2007;257:143-79. doi: 10.1016/50074-7696(07)57004-X.
 47. Biondo-Simões R, Biondo-Simões MLP, Ioshii SO, Robes RR, Dall'Antonia MO. The effects of valproic acid on skin healing: an experimental study in rats. *Acta Cir Bras*. 2022;37(4):e370403. doi:10.1590/acb370403.
 48. Biondo-Simões MLP, Dall'Antonia MO, Goehr MP, Biondo-Simões R, Ioshii SO, Robes RR. Valproic acid and bladder healing: an experimental study in rats. *Rev Col Bras Cir*. 2022;49:e20223399. doi: 10.1590/0100-6991e-20223399-en.
 49. Correa-Basurto AM, Romero-Castro A, Correa-Basurto J, Hernández-Rodríguez M, Soriano-Ursúa MA, García-Machorro J, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of N-(2-hydroxyphenyl)-2-propylpentanamide in Wistar Rats and its binding properties to human serum albumin. *J Pharm Biomed Anal*. 2019;162:130-9. doi: 10.1016/j.jpba.2018.09.010.
 50. Vizzotto Junior AO, Noronha L, Scheffel DLH, Campos AC. 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.
 51. Montes GS, Junqueira LC. The use of the picosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;86 Suppl 3:1-11. doi:10.1590/s0074-02761991000700002.
 52. Rittié L. Method for picosirius red-polarization detection of collagen fibers in tissue sections. *Methods Mol Biol*. 2017;1627:395-407. doi: 10.1007/978-1-4939-7113-8_26.
 53. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981;29(4):577-80. doi: 10.1177/29.4.6166661.
 54. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med*. 2014;6(265):265sr6. doi: 10.1126/scitranslmed.3009337.
 55. Pastar I, Marjanovic J, Stone RC, Chen V, Burgess JL, Mervis JS, et al. Epigenetic regulation of cellular functions in wound healing. *Exp Dermatol*. 2021;30(8):1073-89. doi: 10.1111/exd.14325.
 56. Lewis CJ, Stevenson A, Fear MW, Wood FM. A review of epigenetic regulation in wound healing: Implications for the future of wound care. *Wound Repair Regen*. 2020;28: 710-8. doi: 10.1111/wrr.12838.
 57. Zhang T, Cooper S, Brockdorff N. The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO Rep*. 2015;16(11):1467-81. doi: 10.15252/embr.201540945.
 58. Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2016;5(3):119-36. doi: 10.1089/wound.2014.0561.
 59. Hinz B. The role of myofibroblasts in wound healing. *Curr Res Transl Med*. 2016;64(4):171-7. doi: 10.1016/j.retram.2016.09.003
 60. Brinkmann H, Dahler AL, Popa C, Serewko MM, Parsons PG, Gabrielli BG, et al. Histone hyperacetylation induced by histone deacetylase

- inhibitors is not sufficient to cause growth inhibition in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001;276(25):22491-9. doi: 10.1074/jbc.M100206200.
61. Spallotta F, Cencioni C, Straino S, Nanni S, Rosati J, Artuso S, et al. A nitric oxide-dependent cross-talk between class I and III histone deacetylases accelerates skin repair. *J Biol Chem.* 2013;288(16):11004-12. doi: 10.1074/jbc.M112.441816.
62. Tonini T, Rossi F, Claudio P. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene.* 2003;22:6549–56. doi: 10.1038/sj.onc.1206816.
63. Pozzi A, Zent R. Regulation of endothelial cell functions by basement membrane- and arachidonic acid-derived products. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2009;1:254–72. doi: 10.1002/wsbm.7.
64. 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.
65. 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.
66. 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. *Cir Res.* 2002;91(9):837-44. doi: 10.1161/01.res0000037983.07158.b1.

Recebido em: 23/10/2023

Aceito para publicação em: 10/03/2024

Conflito de interesses: não.

Fonte de financiamento: nenhuma.

Endereço para correspondência:

Maria de Lourdes Pessole Biondo Simões

E-mail: malubiondo@gmail.com

