

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA ACETILAÇÃO DAS HISTONAS H3 E H4 E
EXPRESSÃO DAS ENZIMAS HISTONAS DESACETILASES
HDAC1, HDAC2 E HDAC6 NO LINFOMA MULTICÊNTRICO
CANINO**

**Isabela Cristina Canavari
Médica Veterinária**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA ACETILAÇÃO DAS HISTONAS H3 E H4 E
EXPRESSÃO DAS ENZIMAS HISTONAS DESACETILASES
HDAC1, HDAC2 E HDAC6 NO LINFOMA MULTICÊNTRICO
CANINO**

Discente: Isabela Cristina Canavari

Orientadora: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias

2021

C213a Canavari, Isabela Cristina
Avaliação da acetilação das histonas H3 e H4 e expressão das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 no linfoma multicêntrico canino / Isabela Cristina Canavari. -- Jaboticabal, 2021
80 p. : tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Mirela Tinucci-Costa

1. Medicina veterinária. 2. Oncologia veterinária. 3. Epigenética. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DA ACETILAÇÃO DAS HISTONAS H3 E H4 E EXPRESSÃO DAS ENZIMAS HISTONAS DESACETILASES HDAC1, HDAC2 E HDAC6 NO LINFOMA MULTICÊNTRICO CANINO

AUTORA: ISABELA CRISTINA CANAVARI

ORIENTADORA: MIRELA TINUCCI COSTA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV - UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. RENEE LAUFER AMORIM (Participação Virtual)
Depto. de Clínica Veterinária / FMVZ - UNESP

Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. HEIDGE FUKUMASU (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA / USP - Pirassununga/SP

Prof. Dr. RODRIGO DOS SANTOS HORTA (Participação Virtual)
Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG / Belo Horizonte/MG

Jaboticabal, 08 de novembro de 2021



DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Isabela Cristina Canavari nasceu em Pitangueiras-SP, em 2 de janeiro de 1991. Concluiu o Ensino Médio no Centro Educacional Poetisa “Cecília Meireles”, em 2008. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, câmpus de Jaboticabal-SP, em 2009. Durante a graduação, concluiu dois projetos de Iniciação Científica, entre 2011 e 2013, sob orientação do Professor Doutor Wilter Russiano Vicente e coorientação da Professora Doutora Juliana Borges Silva. Participou e organizou diversos cursos e projeto de extensão, concluindo a graduação em 2013. Entre os anos de 2014 e 2016, realizou a Residência Multiprofissional em Saúde, com ênfase em clínica médica de pequenos animais, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, câmpus de Jaboticabal, participando da Associação dos Médicos Veterinários Residentes (AMVR) da mesma instituição. Em 2018, concluiu o Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV-UNESP Jaboticabal, na área de Clínica Médica, sob orientação da Professora Doutora Mirela Tinucci Costa e, no mesmo ano, ingressou no Doutorado, no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, pela mesma instituição e sob a mesma orientação. Durante a pós-graduação, fez parte das equipes de atendimento dos Serviços de Oncologia e Dermatologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV-UNESP Jaboticabal. Em 2021, tornou-se Professora Substituta da disciplina de Clínica de Cães e Gatos na FCAV-UNESP Jaboticabal.

AGRADECIMENTOS

A finalização desse trabalho representa o esforço e auxílio de pessoas sem as quais não seria possível colocar um ponto final, ou melhor, uma vírgula, nesse capítulo tão importante da minha trajetória profissional e pessoal. Primeiramente, agradeço à Deus por permitir que eu chegasse até aqui para concluir essa etapa, mesmo diante de tantas adversidades ocorridas nos últimos tempos.

Agradeço imensamente e eternamente à minha Família, que sempre foi meu alicerce e força para buscar meus sonhos, sem medir esforços para que eu os alcançasse.

Ao meu amor, Rafael, agradeço por ter se tornado a extensão do meu alicerce, me amparando nos momentos difíceis e celebrando todas as minhas vitórias. Tenho muito orgulho da família que formamos.

À minha professora preferida, orientadora, exemplo de mulher e profissional. Não tenho palavras para agradecer à Professora Mirela por todo acolhimento e ensinamento ao longo dos últimos anos, desde a graduação até a conclusão do doutorado.

Ao nosso pequeno grande grupo de pesquisa: Professores Oscar Sierra e Igor Senhorello, obrigada por todo o companheirismo ao longo do desenvolvimento dos nossos projetos. Sem vocês, eu não chegaria a esse momento. E um agradecimento especial ao Prof. Dr. Giovanni Vargas, fundamental na idealização das nossas pesquisas sobre epigenética no câncer canino. Muito obrigada!

À FCAV, Hospital Veterinário e Setor de Oncologia. São minha segunda casa, onde vivi momentos inesquecíveis, fiz amizades que carrego comigo para sempre, me espelho diariamente e tenho muito orgulho de fazer parte. Professores, residentes, pós-graduandos e funcionários, meu muito obrigada por toda a ajuda, amparo nos momentos difíceis e sorrisos nos momentos bons, que não são poucos!

À USP-Pirassununga pela parceria no desenvolvimento desse trabalho, especialmente ao Prof. Dr. Flávio Meirelles e à Dr^a Cibele Zinni.

Agradeço da forma mais pura e sincera possível aos maiores responsáveis por me incentivar a buscar ser uma Médica Veterinária melhor. Aos meus pacientes. Tanto

aqueles que ainda terei a oportunidade de ajudar e principalmente a todos que já estiveram sob meus cuidados, inclusive aos que ajudaram no desenvolvimento dessa pesquisa. O nosso maior objetivo é oferecer melhor qualidade de vida, novas opções de tratamento e melhor prognóstico, especialmente para nossos pacientes oncológicos de quatro patas!

À Capes, pela concessão da bolsa de doutorado (processo 88882.330352/2019-01) e à Fapesp, pelo auxílio financeiro (2016/00128-5), possibilitando o desenvolvimento dessa e outras pesquisas fundamentais para o enriquecimento científico na Medicina e Oncologia Veterinárias.

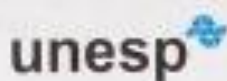
O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	1
1. Revisão de literatura	1
1.1 Introdução	1
1.2 Epigenética.....	2
1.3 Terapias epigenéticas	10
1.4 Referências bibliográficas	15
CAPÍTULO 2 - Avaliação da acetilação das histonas H3 e H4 e expressão das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 no linfoma multicêntrico canino	29
Resumo	29
Introdução	30
Resultados	32
Caracterização dos animais	32
Perfil epigenético no LDGCB em cães	32
Correlação da avaliação epigenética e variáveis clínico-patológicas com o prognóstico	32
Discussão	34
Métodos.....	41
Comitê de ética.	41
Seleção de amostras.....	41
<i>Western blot</i>	42
Imuno-histoquímica	43

Avaliação das imunomarcações.....	45
Análise estatística.	46
Referências	47
APÊNDICE A	65

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



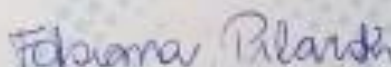
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da acetilação das histonas H3 e H4 e expressão das histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 no linfoma multicêntrico canino**", protocolo nº 007973/18, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Mirela Tinucci Costa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 14 de junho de 2018.

Vigência do Projeto	01/07/2018 a 01/07/2020
Espécie / Linhagem	Cães
Nº de animais	20 (15 animais do grupo infirma e 5 do grupo controle)
Peso / Idade	Variados
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Animais domiciliados

Jaboticabal, 14 de junho de 2018.


Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
 Coordenadora – CEUA

AVALIAÇÃO DA ACETILAÇÃO DAS HISTONAS H3 E H4 E EXPRESSÃO DAS ENZIMAS HISTONAS DESACETILASES HDAC1, HDAC2 E HDAC6 NO LINFOMA MULTICÊNTRICO CANINO

RESUMO - Alterações epigenéticas são associadas aos processos de carcinogênese e a acetilação das histonas é um dos mecanismos mais estudados, ocorrendo de acordo com a atividade das enzimas histonas acetilases (HAT) e histonas desacetilases (HDAC). O aumento na expressão e/ou atuação aberrante das HDAC interferem diretamente na regulação transcricional, podem fornecer condições para o desenvolvimento tumoral e tornaram-se alvos de estudos para intervenção terapêutica. No linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), em humanos, alterações nos mecanismos epigenéticos de acetilação das histonas já foram identificadas e associadas ao pior prognóstico dos pacientes. Porém, em cães ainda são escassos os estudos que avaliaram essas modificações na forma multicêntrica do LDGCB. No primeiro capítulo, são descritos os mecanismos epigenéticos relacionados aos seus aspectos fisiológicos e as modificações registradas em neoplasias, nas medicinas humana e veterinária. No segundo capítulo, foram avaliadas as expressões das histonas acetiladas H3 e H4, e das enzimas HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em amostras de LDGCB (n=20), comparativamente à expressão em tecido linfóide de cães saudáveis (n=5), por meio da marcação imuno-histoquímica e validação da expressão proteica por *Western blot*. As expressões das histonas e enzimas e os aspectos clínico-patológicos foram correlacionados entre si e com o prognóstico dos animais doentes. Os resultados mostraram que HDAC2 está mais expressa no LDGCB ($p < 0,05$), enquanto H3, H4, HDAC1 e HDAC6 não diferiram entre os grupos. As histonas acetiladas e enzimas histonas desacetilases não apresentaram correlação com o tempo livre de doença (TLD) e tempo de sobrevida (TS), porém o alto índice mitótico foi relacionado ao menor tempo de sobrevida dos cães e menor expressão de HDAC6; e a presença de sinais clínicos no estadiamento da doença (subestágio b) indicou menores TLD e TS. Esse estudo deve estimular o desenvolvimento de novas investigações, a fim de melhor elucidar as alterações epigenéticas na patogênese do LDGCB, uma das neoplasias mais comuns em cães, podendo auxiliar na descoberta de novas abordagens terapêuticas alvo-específicas e melhorando o prognóstico dos pacientes.

Palavras-chaves: acetilação, cães, histonas desacetilases, linfoma multicêntrico

EVALUATION OF H3 AND H4 ACETYLATION AND EXPRESSION OF HISTONE DEACETYLASE ENZYMES HDAC1, HDAC2 AND HDAC6 IN CANINE MULTICENTRIC LYMPHOMA

ABSTRACT - Epigenetic alterations are associated with carcinogenesis processes and histone acetylation is one of the most studied mechanisms, occurring according to the activity of histone acetylase (HAT) and histone deacetylase (HDAC) enzymes. The increased expression and/or aberrant action of HDACs directly interfere with transcriptional regulation, may provide conditions for tumor development and become targets of studies for therapeutic intervention. In diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) in humans, alterations in the epigenetic mechanisms of histone acetylation have been identified and associated with a worse prognosis in patients. However, in dogs, there are few studies that evaluated these changes in the multicentric form of the DLBCL. The first chapter describes the epigenetic mechanisms related to their physiological aspects and the changes recorded in neoplasms, in human and veterinary medicine. In the second chapter, the expression of acetylated histones H3 and H4, and of the enzymes HDAC1, HDAC2 and HDAC6 in DLBCL samples (n=20) were evaluated and compared to the expression in lymphoid tissue of healthy dogs (n=5), through of immunohistochemical labeling and validation of protein expression by *Western blot*. Histone and enzyme expressions and clinicopathological aspects were correlated with each other and with the prognosis of the sick animals. The results showed that HDAC2 is more expressed in DLBCL ($p < 0.05$), while H3, H4, HDAC1 and HDAC6 did not differ between groups. The acetylated histones and histone deacetylase enzymes did not correlate with disease-free time (DFT) and survival time (ST), but the high mitotic index was related to the shorter survival time of dogs and lower expression of HDAC6; and the presence of clinical signs in the stage of the disease (substage b) indicated lower DFT and ST. This study should stimulate the development of new investigations, in order to better elucidate the epigenetic alterations in the pathogenesis of DLBCL, one of the most common neoplasms in dogs, which may help in the discovery of new target-specific therapeutic approaches and improve the prognosis of the patients.

Keywords: acetylation, dogs, histone deacetylases, multicentric lymphoma

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – Avaliação da acetilação das histonas H3 e H4 e expressão das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 no linfoma multicêntrico canino

- Tabela 1. Variáveis clínico-patológicas referentes aos cães diagnosticados com linfoma difuso de grandes células B.....56
- Tabela 2. Resultado da análise univariada (teste de Wilcoxon) de comparação da expressão imuno-histoquímica das histonas acetiladas e enzimas histonas desacetilases entre os grupos experimentais.....56
- Tabela 3. Análise multivariada das variáveis epigenéticas e clínico-patológicas das amostras de LDGCB e sua correlação com o tempo livre de doença (TLD) e tempo de sobrevida (TS) dos cães.....57
- Tabela 4. Anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica para pesquisa da expressão de histonas e histonas desacetilases, em amostras de linfonodo normal e LDGCB de cães.....58

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 – Avaliação da acetilação das histonas H3 e H4 e expressão das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 no linfoma multicêntrico canino

- Figura 1. Validação da expressão proteica das histonas acetiladas (H3K9 e H4K12) e enzimas desacetilases (HDAC1, HDAC2 e HDAC6) em linfonodo canino normal (controle) e neoplásico (LDGCB), pela técnica de *Western Blot*.....59
- Figura 2. Fotomicrografia mostrando a reatividade das histonas acetiladas e histonas desacetilases em linfonodo neoplásico canino (esquerda) e linfonodo normal canino (controles positivos no centro e controles negativos à direita). Imunomarcagem de H3K9Ac (a; b; c), H4K12Ac (d; e; f), HDAC1 (g; h; i), HDAC2 (j; k; l) e HDAC6 (m; n; o). Reação imuno-histoquímica, x40.....60
- Figura 3. Comportamento e distribuição da expressão das histonas acetiladas (H3K9, H4K12) e enzimas histonas desacetilases (HDAC1, HDAC2 e HDAC6) em amostras de LDGCB canino, por meio da análise multivariada de componentes principais. A tabela superior esquerda ilustra a análise exploratória de fatores, indicando a correlação positiva entre H3K9Ac e H4K12Ac (F1), a correlação oposta entre HDAC1 e HDAC6 (F2) e o comportamento independente de HDAC2 (F3).....61
- Figura 4. Expressão das histonas acetiladas H3, H4 e enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em relação ao tempo de sobrevida (semanas) dos cães com LDGCB. As curvas de sobrevida foram determinadas pelo método de Kaplan-Meier e as variáveis comparadas pelo teste de Long-rank.....62
- Figura 5. Relação entre a alta (>35%) ou baixa (<35%) expressão de Ki67 e fatores prognósticos (TLD e TS) do LDGCB, em cães. As curvas de sobrevida foram determinadas pelo método de Kaplan-Meier e as variáveis comparadas pelo teste de Long-rank (acima). Representação da marcação nuclear de Ki67 em amostra de LDGCB canino. Reação imuno-histoquímica, x40.....63

Figura 6. (A) Índice mitótico em relação ao tempo de sobrevida (semanas) dos cães com LDGCB. Curva de sobrevida determinada pelo método de Kaplan-Meier e as variáveis comparadas pelo teste de Long-rank ($P = 0,037$). (B) Análise multivariada e regressão linear inversa entre a expressão da enzima desacetilase HDAC6 e o índice mitótico (IM) > 26 ($P = 0,0006761$).....64

Figura 7. Ausência (a) ou presença (b) de sinais clínicos em relação ao tempo livre de doença (A) e tempo de sobrevida (B) dos cães com LDGCB. Curvas determinadas pelo método de Kaplan-Meier e variáveis comparadas pelo teste de Long-rank.....64

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Introdução

A carcinogênese é um processo resultante de danos genéticos relacionados a alterações na sequência de DNA, como translocações cromossômicas, mutações, deleções e/ou ganho de material genético (Hassler et al., 2013). Por sua vez, as alterações epigenéticas são definidas como anormalidades hereditárias da expressão gênica mediadas por mecanismos que não alteram a sequência do DNA (Ward, 2002), sendo ambos os danos incriminados na tumorigênese (Ferrareso et al., 2014). Todavia, em alguns tipos de câncer, as modificações epigenéticas parecem exercer maior impacto no risco de desenvolvimento neoplásico (Baylin e Jones, 2016; Yamashita et al., 2018).

Alterações epigenéticas podem promover o desenvolvimento tumoral em diferentes subtipos de linfoma não-Hodgkin humano, inclusive no linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) (Morin et al., 2010; Azevedo, 2015; Hopp et al., 2015; Pan et al., 2015; Bianco e Abdalla, 2016, Ribeiro et al., 2019) e são associadas à maior agressividade da doença, bem como a resposta insatisfatória aos tratamentos (Montalbán et al., 2004), evidenciando a participação desses mecanismos na patogênese e prognóstico desse tipo neoplásico (Clozel et al., 2013).

O linfoma é uma das neoplasias mais comuns em cães e representa de 7% a 24% de todos os tipos tumorais nessa espécie (Vail et al., 2019). A forma multicêntrica chega a ocorrer em 80% dos casos (Vail, 2011) e o subtipo LDGCB é a forma mais comum da doença, assim como em seres humanos (Shankland et al., 2012; Marconato et al., 2013) e exibe patogênese molecular, morfologia celular, características clínicas e resposta terapêutica semelhantes nas duas espécies (Burnett et al., 2003; Su et al., 2013).

A origem do linfoma de células B é multifatorial e resulta de mutações herdadas, alterações nas sequências de DNA, expressão anormal de oncogenes e genes

supressores tumorais (Elvers, 2015), entretanto sua biologia tumoral não é totalmente explicada apenas pelas alterações genéticas. Desta forma, as alterações epigenéticas parecem exercer um papel importante no desenvolvimento e progressão do LDGCB, muito embora sejam pouco compreendidas, mormente na espécie canina (Jones e Baylin, 2007; Ferraresso et al., 2014), o que incentiva a identificação das modificações nesses mecanismos, como novos biomarcadores relacionados ao desenvolvimento do linfoma (Epifhanio et al., 2019).

No estudo em tela, o objetivo foi identificar possíveis alterações epigenéticas relacionadas à acetilação das histonas, no LDGCB canino, por meio da avaliação da acetilação de H3 e H4 e expressão das enzimas HDAC1, HDAC2 e HDAC6, correlacionando essas proteínas e as variáveis clínicas e patológicas entre si, e com o prognóstico dos animais, como forma de entender o possível envolvimento desses mecanismos na evolução e severidade da doença nos pacientes.

1.2 Epigenética

Os mecanismos epigenéticos ou epigenoma são um conjunto de modificações dinâmicas e reversíveis do DNA e histonas (cromatina), denominadas “marcas epigenéticas” e relacionadas à regulação da transcrição e expressão gênicas dentro do genoma, sem alterar a sequência do DNA, o que resulta em alterações fenotípicas que são herdáveis pela mitose e meiose celulares (Jirtle e Skinner, 2007; Tang e Ho, 2007; Baylin e Jones, 2011; Costa e Pacheco, 2013; Flavahan et al., 2017). Portanto, enquanto o genoma é idêntico nos diferentes tipos celulares de um mesmo indivíduo, o epigenoma varia entre as células (Muller e Prado, 2008) e representa umas das melhores promessas na pesquisa oncológica (Toh et al., 2017).

O desenvolvimento celular depende da atuação equilibrada dos mecanismos epigenéticos, uma vez que a regulação transcricional interfere no crescimento e diferenciação celulares. Portanto, os mecanismos normais são desregulados no início e progressão tumorais, uma vez que alterações na expressão gênica podem promover a inativação de genes supressores tumorais, desregulação do ciclo celular, inibição da apoptose, indução da proliferação celular descontrolada, assim como a ativação

de oncogenes, fatores que estimulam a tumorigênese (Marks et al., 2000; Kisseberth et al., 2008; Ferrareso et al., 2017).

Os mecanismos epigenéticos ocorrem de acordo com a atuação de diferentes proteínas, responsáveis pela adição (“writers”) e remoção de assinaturas epigenéticas (“erasers”) ou reconhecimento (“readers”) de modificações do DNA e histonas (Biswas e Rao, 2018). Dentre eles, a metilação do DNA e as modificações das histonas são alguns dos mecanismos mais reconhecidos e envolvem processos que alteram a estrutura das ligações covalentes do DNA, modulando a acessibilidade dos fatores de transcrição aos seus segmentos de DNA-alvo (Roth e Allis, 1996; D’Alessio e Szyf, 2006). Portanto, quando modificados, esses mecanismos são considerados os principais envolvidos na iniciação neoplásica (Fraga et al., 2005; Ilango et al., 2020) e contribuintes para a quimiorresistência, em humanos, uma vez que influenciam no silenciamento transcricional ligado aos genes supressores tumorais, reparadores de danos ao DNA e reguladores do ciclo celular e apoptose (Amengual, 2020), facilitando a sobrevivência e proliferação de clones resistentes (De et al., 2013).

Adicionalmente, outro mecanismo epigenético fortemente reconhecido são os RNA não codificados (ncRNA), os quais podem se ligar a diferentes RNA mensageiros (RNAm) e inibir o processo de tradução (Croce, 2009). Sendo assim, esses três mecanismos apresentam fundamental importância na programação adequada da expressão gênica (Rothhammer e Bosserhoff, 2007).

A metilação do DNA é a adição covalente de grupamentos metil nas citosinas, sendo este um processo enzimático realizado por proteínas chamadas DNA metiltransferases (DNMT) (Mizuno et al., 2001) e a primeira marca crítica das modificações epigenéticas que afetam a regulação do genoma em células tumorais (Stirzaker et al., 2014). Dessa maneira, tanto a hipometilação quanto a hipermetilação favorecem a carcinogênese e a progressão tumoral (Epifhanio et al., 2019; Ribeiro et al., 2019).

A hipometilação está relacionada à reativação gênica e instabilidades cromossômicas que podem resultar na expressão de oncogenes, aumento das taxas de recombinações e mutações gênicas (De Smet et al., 2004). Em humanos, foi identificado que padrões aberrantes de metilação do DNA podem interferir na patogênese de neoplasias hematopoiéticas (Epifhanio et al., 2019), inclusive em

linfomas de células B (Wong Doo, 2016). Em cães, estudos também evidenciaram a importância do papel da hipometilação do DNA de leucócitos circulantes, em pacientes com linfoma multicêntrico de células B e T (Epifhanio et al., 2019), e em tecidos, no LDGCB, associando o acúmulo dessas alterações epigenéticas com a maior agressividade da doença (Ferraresso et al., 2017).

Por outro lado, o acúmulo de grupos metil ou hipermetilação altera a afinidade do DNA com fatores de transcrição e podem interagir com as enzimas histonas desacetilases (HDAC), tornando a cromatina menos acessível (Esteller, 2007; Greenberg e Bourc'his, 2019). Ferraresso et al. (2017) sugerem que a hipermetilação de membros da família de genes *HOX*, relacionados ao desenvolvimento embrionário, morfogênese tecidual e diferenciação celular, possam contribuir para a patogênese do LDGCB, no homem e no cão. Assim, a hipermetilação está associada ao silenciamento de genes supressores tumorais, supressores de invasão e metástase, reparadores de DNA e inibidores da angiogênese (Jovanovic et al., 2010).

Os ncRNA são RNA não traduzidos em proteínas e existem evidências do seu papel na proliferação, metabolismo, diferenciação e apoptose celulares (Filipowicz et al., 2008; Alberti e Cochella, 2017). Os microRNA (miRNA) são pequenos ncRNA que participam de diversos processos biológicos e sua expressão é regulada durante a hematopoiese (Khan et al., 2019). Além disso, a expressão de miRNA também é responsável pela regulação de outros mecanismos epigenéticos, como metilação do DNA e modificações das histonas, ou seja, a desregulação de miRNA é considerada um marcador de iniciação neoplásica (Humphries et al., 2019). Já foi demonstrada sua expressão aberrante em linhagens de cultivos celulares de linfoma canino e associação à quimiorresistência (Asada et al., 2019), bem como em amostras teciduais de linfoma multicêntrico de células B e T, em cães, tornando painéis de miRNA futuros biomarcadores úteis, na oncologia veterinária (Craig et al., 2019).

As histonas são proteínas que atuam como uma matriz na qual o DNA se enrola, formando juntos, o nucleossomo. São conhecidas 5 famílias de histonas: H1 auxilia na ligação entre os nucleossomos, formando a cromatina; enquanto H2A, H2B, H3 e H4, em duplicata, formam um octâmero de histonas, no qual o DNA se enrola. As histonas possuem caudas, agrupamentos amino-terminal (n-terminal), contendo diversos resíduos de aminoácidos (lisina, serina e arginina), que apresentam carga

positiva e interagem com a carga negativa do DNA. Essas caudas são projetadas para fora dos nucleossomos, tornando-se sujeitas a modificações pós-transducionais (Peterson e Laine, 2004; Kouzarides, 2007; Martins e Castilho, 2013).

Inicialmente, as histonas eram consideradas somente componentes estruturais, mas já se sabe que elas exercem diversas funções na célula, sendo conhecido seu envolvimento na manutenção do equilíbrio dinâmico da cromatina, influenciando na sua conformação estrutural, regulando a repressão e ativação da transcrição gênica e protegendo o DNA de agentes prejudiciais (Margeron et al., 2005; Cutter e Hayes et al., 2015; Mottamal, 2015).

As modificações das histonas são o ponto-chave da regulação epigenética e um dos mecanismos mais importantes no desenvolvimento neoplásico, envolvendo processos como acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, desaminação, propionilação e butirilação na porção caudal dessas proteínas (Howell et al., 2009; Kebede et al., 2015; Qin et al., 2019). Essas modificações promovem alterações da interação entre as histonas e o DNA, resultando em mudanças no grau de enovelamento da cromatina e, conseqüentemente, na expressão gênica (Moss e Wallrath, 2007), relacionando-se aos processos celulares de replicação, reparo e recombinação (Kouzarides, 2007).

Os mecanismos de modificações das histonas são reversíveis e mediados pela atividade enzimática de histonas metiltransferases (HMT), histonas desmetilases (HDM), histonas acetiltransferases (HAT), histonas desacetilases (HDAC), enzimas que promovem a ubiquitinação (E1, E2 e E3) e desubiquinases (DUB), sendo que as modificações mais estudadas e relacionadas à fisiopatogenia neoplásica, são a metilação e acetilação (Chen e Dent, 2014; Elmallah e Micheau, 2019).

As alterações que esses mecanismos exercem sobre a estrutura da cromatina influenciam diretamente na expressão gênica, uma vez que os genes se tornam inativos se a cromatina estiver condensada (heterocromatina), e podem ser expressos se a cromatina estiver descondensada (eucromatina), permitindo acessibilidade ao DNA pelos fatores de transcrição e recrutando proteínas específicas que reconhecem as modificações ocorridas nas histonas (Strahl e Allis, 2000; Rodenhiser e Mann, 2006).

A acetilação das histonas é considerada um dos mecanismos epigenéticos mais bem compreendidos e ocorre de acordo com a atividade das enzimas histonas acetilases (HAT) e histonas desacetilases (HDAC) (Thiagalingam et al., 2003). Esse mecanismo interfere na função cromossômica por meio da alteração da carga eletrostática das histonas e modificando suas propriedades ligantes ao DNA (Costelloe et al., 2006) ou pela interferência (criação, estabilização, rompimento e oclusão) na interação entre a cromatina e proteínas regulatórias (fatores de transcrição, proteínas envolvidas na condensação da cromatina e reparo do DNA) (Feinberg e Tycko, 2004; Rosa e Caldas, 2005). Todas as histonas são modificadas *in vivo*, porém a acetilação ocorre, principalmente, em H3 e H4 (Wade et al., 1997) e é melhor caracterizada nos resíduos de lisina H3K9, H3K14, H4K5, H4K8, H4K12 e H4K16 (Struhl, 1998).

A compreensão da relação entre alterações epigenéticas e a carcinogênese incentivou a realização de estudos (Jones e Baylin, 2007; Dworkin et al., 2009), visto que o desequilíbrio entre as atividades das HAT e HDAC na regulação transcricional, fornecem condições para o desenvolvimento tumoral (Ronconi et al., 2005). Diante disso, o aumento na expressão de HDAC ou mutações nas HAT foram verificados em diferentes tipos tumorais, resultando na perda da acetilação das histonas (D'Alessio e Szyf, 2006; Wang et al., 2020).

A translocação cromossômica envolvendo genes que codificam HAT ou HDAC é relacionada a diversas neoplasias hematopoiéticas (Liu et al., 2006; Haery et al., 2015), já que a expressão e funcionalidade de genes supressores tumorais e oncogenes como *MYC*, *P53* e *TRAIL*, são sabidamente regulados pela acetilação das histonas (Elmallah e Micheau, 2019). Além disso, alterações epigenéticas que resultem na acetilação aberrante das histonas podem interagir e regular o microambiente tumoral, ativando um mecanismo de progressão tumoral no LDGCB (Pascual et al., 2019; Huang et al., 2021).

As HAT promovem a adição de grupos acetis aos resíduos de lisina das histonas, neutralizando a carga positiva dessas proteínas e tornando-as acetiladas. Isso diminui a afinidade dessas proteínas pelo DNA e umas pelas outras, tornando a cromatina descondensada e ativa para a transcrição gênica. A acetilação das histonas H3 e H4 estão diretamente ligadas à transcrição gênica e é um sinal predominante

para a ativação da cromatina, proporcionando seu acesso à transcrição e sendo histonas altamente expressas (Grunstein, 1997; Webber, 2015).

Em pacientes humanos, já foram identificadas mutações em genes que codificam HAT, como *CBP* e *P300*, em casos de linfoma folicular, leucemias e LDGCB (Morin et al., 2011; Pasqualucci et al., 2011; Green et al., 2015). Essas mutações e a desregulação da atividade enzimática podem promover a ativação do gene *MEF2B*, que por sua vez ativa a transcrição do oncogene *BCL-6* e estimula a proliferação neoplásica (Ying et al., 2012).

As HDAC promovem a remoção dos grupos acetis, aumentando a ligação entre as histonas e o DNA, tornando a cromatina condensada e diminuindo a acessibilidade pelos fatores de transcrição, o que resulta no bloqueio da expressão gênica (Bhattacharya et al., 1999; Ausió et al., 2003). A atividade equilibrada desses dois grupos enzimáticos, balanceando a acetilação e desacetilação das histonas permite o controle da proliferação celular (D'Alessio e Szyf, 2006). Além disso, as HDAC podem promover a desacetilação de proteínas não-histonas, como fatores e repressores de transcrição, genes supressores tumorais e oncogenes (Faiola et al., 2005; Eckschlager et al., 2017).

Em humanos, as HDAC são classificadas de acordo com sua homologia, localização celular e atividade enzimática em classe I (HDAC 1, 2, 3 e 8), localizadas no núcleo celular; classe IIa (HDAC 4, 5, 7 e 9), localizadas no núcleo e citoplasma; classe IIb (HDAC 6 e 10), localizadas no citoplasma; classe III (SIRT1-7) e classe IV (HDAC 11). As classes I, II e IV são chamadas enzimas zinco-dependentes e a classe III é NAD⁺ - dependente e cada HDAC exerce funções biológicas distintas (Yamamoto et al, 2007; Beumer e Tawbi, 2010).

As enzimas pertencentes à classe I são expressas em diferentes tecidos e exercem papel fundamental nos mecanismos epigenéticos (Weichert et al., 2008), sendo que algumas HDAC podem estar fortemente expressas em neoplasias sólidas e hematológicas, inclusive linfomas de células B (Gunes et al., 2007; Lee et al., 2014, Morel et al., 2020), já que as HDAC de classe I são altamente expressas nas células linfóides e sugere-se sua predominante participação no desenvolvimento do linfoma (Gloghini et al., 2009).

A condensação da cromatina mediada pelas HDAC, pode resultar no silenciamento de genes supressores tumorais e inibidores do ciclo e diferenciação celulares, estimulando a tumorigênese por meio de fatores responsáveis pela angiogênese, invasão, adesão e progressão tumorais (Chevallier et al., 2004; Chang et al., 2009; Uehara et al., 2012; Chen et al., 2019; Elmallah e Micheau, 2019).

A redução global da acetilação das histonas aparenta correlação com a proliferação e sobrevivência de linfócitos B e T, já que a hiperacetilação induz a parada do crescimento tumoral e morte das células, nas neoplasias originadas por esses dois tipos celulares (Haery et al., 2015).

A desacetilação das histonas e indução da condensação da cromatina também influenciam na redução da expressão de MHC I e II, no linfoma de células B (Cycon et al., 2013; Grunewald et al., 2018), diminuindo o reconhecimento das células neoplásicas pelo sistema imune, durante o desenvolvimento do linfoma (Xu-Monette et al., 2018).

Em casos humanos de linfoma de células B, o oncogene *BCL-6* codifica um fator de repressão de transcrição e requer a atividade de HDAC para estas propriedades oncogênicas. Porém, esse oncogene é inativado pela acetilação, impedindo a repressão transcricional e a transformação celular (Bereshchenko et al., 2002). Sendo assim, a acetilação e desacetilação desreguladas das histonas influenciam na modulação do padrão de expressão gênica, em resposta ao ambiente, interferindo na diferenciação de células B (Da Costa et al., 2020) e contribuindo com o desenvolvimento do linfoma (Sermer et al., 2019).

A HDAC1 atua na regulação da proliferação celular (Park et al., 2004) e é expressa na maioria dos tipos celulares, inclusive células neoplásicas (De Ruijter et al., 2003), ocorrendo maior expressão de HDAC de classe I em neoplasias malignas em estágios avançados e de alto grau, o que impacta no prognóstico dos pacientes (Weichert, 2009).

HDAC1 e HDAC2 são reguladoras de genes com importante influência nos tumores hematopoiéticos (Haery et al., 2015), como repressão de proteínas relacionadas à supressão tumoral e regulação do ciclo celular, como *P53*, *P21*, *P27* e *P57* (Juan et al., 2000; Zupkovitz et al., 2010), interferência na expressão de genes relacionados à apoptose, como *BAX* e *BCL-2* (Jung et al., 2012), do oncogene *MYC*,

envolvido na proliferação neoplásica de linfócitos B (Pillonel et al., 2016) e fatores angiogênicos, como *HIF1-α* e *VEGF* (Pluemsampant et al., 2008; Ray et al., 2013).

Marquard et al. (2009) identificaram maior expressão de HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em casos humanos de LDGCB e linfoma de células T periférico, em comparação com linfonodos normais, sendo que HDAC2 e HDAC6 estariam associadas ao pior prognóstico do LDGCB e linfoma T periférico, respectivamente. Além disso, outros autores relatam que a expressão de HDAC6 é frequentemente alterada em linhagens de células linfóides (Gloghini et al., 2009).

No LDGCB, em humanos, HDAC6 parece ter importância como fator oncogênico e de pior prognóstico, via ativação do oncogene *MET* (Liu et al., 2018), enquanto há relato controverso da associação da HDAC6 como um marcador de melhor prognóstico no LDGCB (Marquard et al., 2009), assim como em tumores de mama, em mulheres (Zhang et al., 2004). Portanto, a função de HDAC6 no desenvolvimento e progressão do linfoma ainda é pouco definido e mais estudos são necessários (Liu et al., 2018).

As HDAC contribuem para a patogênese das neoplasias malignas, não apenas pela sua expressão aumentada (Caslini et al., 2019), mas também por distúrbios na atividade enzimática (Huang et al., 2021), podendo ser recrutadas de forma anormal por proteínas oncogênicas para desacetilar genes alvos. O resultado é a desregulação da transcrição gênica e estímulo da carcinogênese (Seidel et al., 2012; Neganova et al., 2020).

Na espécie canina, alguns estudos do nosso grupo de pesquisa demonstram alterações na expressão de HDAC e acetilação de histonas, em diferentes tipos neoplásicos. Em cães com linfoma cutâneo epiteliotrófico de células T, a expressão de HDAC1, HDAC2 e HDAC6 foi maior no tecido tumoral, em comparação a amostras de pele normal (Matiz, 2019). Já em carcinomas mamários, houve menor expressão de HDAC1 e HDAC2, sendo que HDAC1 foi correlacionada com fatores prognósticos positivos, como ausência de metástases em linfonodos e baixo índice mitótico. Por outro lado, tumores de mama, em cadelas, mostraram menor acetilação de H3 e maior expressão de HDAC6, sendo que, nas amostras com baixa expressão dessa enzima ocorreu correlação com baixa expressão de Ki67 e tumores menores (Senhorello, 2020).

Ainda em cães, foi demonstrada maior expressão de HDAC1, em amostras de sarcomas de tecidos moles, além de baixa expressão de HDAC2 e HDAC6, e maior acetilação de H3 e H4 (Sena, 2019). Já a desacetilação das histonas foi relatada em carcinoma urotelial, em cães, e relacionada ao pior prognóstico da doença nos animais (Eto et al, 2019).

A acetilação das histonas é descrita como um importante mecanismo regulatório, controlando a transcrição em torno de 2% a 15% dos genes (Van Lint et al., 1996; Peart et al., 2005) e modificações nesse mecanismo são importantes eventos carcinogênicos no LDGCB (Huang et al., 2021). Estudos mostraram que a hiperacetilação das histonas está diretamente relacionada à ativação da oncogênese e que a hiperacetilação de H4 participa do desenvolvimento do linfoma, em humanos. Por outro lado, a hipoacetilação ou desacetilação promovem a repressão e silenciamento gênicos, inclusive de genes supressores tumorais (Turner, 2000; Kisseberth, 2008; Marquard et al., 2008). Diante disso, as modificações epigenéticas na patogênese do câncer, contribuem para a progressão da doença e são potenciais alvos de estudos para intervenção terapêutica (Conley et al., 2006; Hassler et al., 2013, Zhao et al., 2014).

1.3 Terapias epigenéticas

O tratamento convencional dos casos de LDGCB, no homem e no cão, baseia-se em protocolos quimioterápicos que podem, algumas vezes, apresentar eficácia limitada e de alta toxicidade, resultando em baixa sobrevida e alta taxa de recidiva da doença, o que aumenta o interesse na busca por novas opções terapêuticas (Kong et al., 2015; Vail et al., 2019).

As alterações epigenéticas podem ser reversíveis, principalmente por envolverem processos enzimáticos, diferentemente dos danos genéticos, como as mutações, que são permanentes (Pfister e Ashworth, 2017). Sendo assim, os fármacos direcionados à modulação epigenética, como inibidores das DNMT e HDAC se tornaram potenciais e inovadores alvos terapêuticos contra o câncer (Dawson e Kouzarides, 2012; Ilango et al., 2020).

Considerando que a desregulação da enzimas HAT e/ou HDAC está associada à etiologia do câncer, muitos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de desenvolver inibidores de HDAC (iHDAC) (Elmallah e Micheau, 2019). Estes inibidores são uma classe farmacológica promissora no tratamento oncológico (Kisseberth et al., 2008; Buurman et al., 2012; Khan e La Tangué, 2012), não atuando em tecidos normais (Mai et al., 2005) e induzindo a expressão de genes associados à inibição do crescimento celular e angiogênese, indução da diferenciação celular ou apoptose de células tumorais (Lin et al., 2006; Gibbs, 2007; Gammoh et al., 2012; Guerriero et al., 2017). Mas para isso, deve ser considerada a identificação de marcadores preditivos para os iHDAC (Stimson e Tangué, 2009).

Os iHDAC podem ser categorizados em pan-inibidores, ou seja, que atuam em diversas classes de enzimas, ou em inibidores seletivos (Eckschlager et al., 2017). Os inibidores não seletivos podem ocasionar maior toxicidade e efeitos adversos para os pacientes, sendo relatada frequente ocorrência de trombocitopenia, cansaço, anorexia, vômitos e diarreia (Munster et al., 2009; Gryder et al., 2012; Liao et al., 2020), efeitos provavelmente relacionados à maior capacidade desses fármacos de também alterarem a função de proteínas não-histonas (Ribeiro et al., 2019).

Existem fármacos inibidores de HDAC aprovados pela US Food and Drug Administration (FDA) para uso em humanos, sendo eles vorinostat (2006), belinostat (2014) e panobinostat (2015), considerados pan-inibidores, e romidepsina (2009), um inibidor seletivo para a classe I de HDAC (Lobera et al., 2013; Stahl et al., 2016). Porém, diversos outros inibidores estão em estudo e desenvolvimento (Cho et al., 2018; Elmallah e Micheau, 2019; Da Costa et al., 2020).

Clinicamente, as neoplasias hematopoiéticas apresentam maior sensibilidade aos iHDAC, em comparação aos tumores sólidos (Marks et al., 2010; Ageberg et al., 2013; Ceccacci e Minucci, 2016; Ilango et al., 2020). Algumas hipóteses podem justificar essa diferença, como o fato desses inibidores interferirem em vias de sinalização mais alteradas em doenças hematológicas, como JAK/STAT (West e Johnstone, 2014) e alcançarem concentrações terapêuticas mais efetivas para neoplasias hematopoiéticas, já que sua permeabilidade tecidual é baixa, o que retarda os efeitos nos tumores sólidos (McClure et al., 2018).

Vorinostat (SAHA) foi o primeiro iHDAC aprovado, em 2006, para o tratamento de casos progressivos, refratários e recidivantes de linfoma cutâneo de células T, com capacidade de inibir as enzimas pertencentes às classes I, II e IV, mesmo tipo neoplásico sensível à romidepsina, porém, por inibição de HDAC1, HDAC2 e HDAC4. Romidepsina e belinostat (inibidor das classes I, II e IV) foram aprovados para o tratamento do linfoma T periférico. E o panobinostat foi aprovado, mais recentemente, para o tratamento do mieloma múltiplo, também inibindo HDAC de classe I, II e IV (Li et al., 2016; Li et al., 2020).

Além disso, já foi demonstrado o potencial terapêutico dos iHDAC em pacientes humanos com síndromes mielodisplásicas, leucemias, linfoma de células do manto, linfoma Hodgkin e LDGCB (Lindemann et al., 2004; Marks e Jiang, 2005; Zain, 2012; Ribrag et al., 2017; Ribeiro et al., 2019; Wang et al., 2020).

Apesar do vorinostat, belinostat e panobinostat já terem sido avaliados para o tratamento do LDGCB, esses inibidores apresentaram atividade antitumoral limitada e toxicidade variável nos estudos clínicos em humanos, motivando a descoberta de novos iHDAC (Wang et al., 2020).

No LDGCB, os iHDAC podem induzir a expressão de MHC I e II (Deng et al., 2019; Cycon et al., 2013), classes de moléculas com atividade desregulada durante o processo de carcinogênese nos linfomas B e responsável pela redução da imunogenicidade do tumor, causando resistência à imunoterapia e levando ao pior prognóstico da doença, em pacientes humanos (Garrido et al., 2016).

Os iHDAC aprovados pela FDA foram inicialmente indicados como monoterapia, porém existem limitações no seu uso isolado, e a associação com outros fármacos, como quimioterápicos e imunoterápicos, aumentam seu potencial terapêutico antineoplásico e podem prevenir recidivas (Prince e Prince, 2009; Mohammad et al., 2019; Amengual, 2020; Xavier et al., 2020; Wang et al., 2020), o que pode representar o futuro das terapias epigenéticas (Ribeiro et al., 2019), reduzindo as doses e toxicidades farmacológicas (Haery et al., 2015).

Em cultivos celulares de osteosarcoma humano, o ácido valpróico (iHDAC) aumentou a sensibilidade das células neoplásicas à doxorubicina e o potencial de indução da apoptose, *in vitro* e em modelos experimentais (xenotransplante) (Wittenburg et al., 2011). Também em cultivos celulares de LDGCB, a utilização de

ácido valpróico em associação com o protocolo quimioterápico CHOP (vincristina, ciclofosfamida, doxorrubicina e prednisona) e a imunoterapia, aumentou a indução da apoptose das células neoplásicas (Ageberg et al., 2013). Paralelamente, em outro estudo clínico com pacientes humanos, essa combinação terapêutica mostrou segurança e tolerância clínicas, e aumentou o tempo de sobrevivência (Drott et al., 2018).

Estudos utilizando iHDAC em terapias combinadas com outros agentes farmacológicos foram realizados no linfoma não-Hodgkin (Oki et al., 2013; Stathis et al., 2015), sendo que, em alguns subtipos como LDGCB, linfoma de células do manto, linfoma de células T e também casos de linfoma Hodgkin, os iHDAC demonstraram potencial de ressensibilização das células tumorais já resistentes à quimioterapia; um dos mecanismos envolvidos está relacionado ao aumento da expressão de *P21*, com atividade supressora tumoral (Piekarz et al., 2004).

Como os iHDAC têm potencial de aumentar a imunogenicidade do tumor, sua combinação com a imunoterapia também tem se mostrado promissora no tratamento do câncer (Park et al., 2015; Wang et al., 2020). Em humanos, essa associação no tratamento de linfomas B utilizando imunoterapia com o Rituximab®, um anticorpo monoclonal (mAb) anti-CD20. No entanto, diversos mecanismos podem resultar na resistência das células neoplásicas a essa modalidade terapêutica, fato que pode piorar o prognóstico dos pacientes (Garrido et al., 2016). Outras pesquisas mostraram que os iHDAC tricostatina A, ácido valpróico, romidepsina, vorinostat e entinostat podem aumentar a expressão de CD20 nos linfócitos B neoplásicos, atuando de forma sinérgica com o Rituximab®, reduzindo a progressão tumoral (Zhao et al., 2007; Damm et al., 2015) e aumentando a taxa de sobrevivência dos pacientes (Frys et al., 2015).

O tratamento de cães com linfoma de alto grau, como o LDGCB, baseia-se na combinação de diversos agentes quimioterápicos, sendo que o CHOP representa um dos protocolos com maior sucesso terapêutico, conferindo a remissão completa da doença em até 95% dos pacientes. No entanto, é comum que a maioria dos animais apresentem recidiva da doença entre 6 e 9 meses e tempo médio de sobrevivência de 12 meses, com o tratamento (Childress et al., 2016. Vail et al., 2019). Adicionalmente, a associação de radioterapia ou imunoterapia não aumenta significativamente a sobrevivência dos cães com LDGCB (Lurie et al., 2009; Marconato et al., 2015). Portanto,

novas perspectivas terapêuticas são necessárias com a finalidade de se buscar uma abordagem do paciente oncológico, conseguindo obter um melhor prognóstico para cães com linfoma, principalmente na recidiva da doença (Parachini-Winter et al., 2020; Sloan et al., 2021).

Na medicina veterinária, estudos relacionados às alterações e terapias epigenéticas na oncologia ainda são restritos e não há iHDAC ou outros tipos de drogas epigenéticas utilizados na rotina do tratamento do câncer nessa espécie (Xavier et al., 2020). Matiz (2019) identificou que, além da alta expressão de HDAC no linfoma cutâneo epiteliotrófico de células T, em cães, a maior acetilação de H3 foi correlacionada com maior tempo de sobrevivência dos pacientes. Estes achados sugerem que os cães com esse tipo de neoplasia poderiam ser beneficiados pelo uso de iHDAC e deve motivar a continuidade das investigações.

Pesquisadores mostram a eficácia dos iHDAC em outras neoplasias caninas, sendo uma classe farmacológica com diversos efeitos antitumorais, como indução da apoptose via ativação das caspases 3 e 7, acetilação da α -tubulina (componente mitótico) e ativação de genes supressores tumorais (Wittenburg et al., 2011; Murahari et al., 2017; Dias et al., 2018; Eto et al., 2019). Porém, mesmo com as evidências de alterações epigenéticas no linfoma canino (Sato et al., 2018) e influência das terapias epigenéticas na imunidade, resposta ao estresse oxidativo, transcrição gênica, apoptose, transporte de proteínas e maturação celular, mais estudos clínicos envolvendo um maior número de pacientes com o mesmo tipo neoplásico, são necessários para concluir a efetividade do uso das terapias epigenéticas em cães (Parachini-Winter et al., 2020).

O vorinostat, empregado em cultivos celulares de osteossarcoma canino, induziu a apoptose (Murahari et al., 2017); além de inibir o crescimento e ciclo celulares, no carcinoma urotelial em cães, por meio da indução da acetilação de H3 nas células neoplásicas (Eto et al., 2019). Também foi avaliada a eficácia de diferentes iHDAC em linhagens de células neoplásicas caninas, sendo que o linfoma T e mastocitoma exibiram alta sensibilidade aos fármacos testados (Kisseberth et al., 2008).

Em cultivo celular de linfoma de células B canino (CLBL-1), um painel de iHDAC foram testados e exibiram efeitos inibitórios na proliferação das células neoplásicas,

tanto *in vitro* quanto em modelos experimentais (xenotransplante), sendo o panobinostat o fármaco com efeito antiproliferativo e citotóxico mais promissor, induzindo a acetilação de H3 e atividade das caspases 3 e 7, ocasionando a apoptose das células neoplásicas (Carew et al., 2008; Dias et al., 2018).

Wittenburg et al. (2011) avaliaram os efeitos da combinação de ácido valpróico e doxorrubicina na sensibilidade de células de osteossarcoma canino. Os pesquisadores verificaram, *in vitro*, que o iHDAC aumentou o acúmulo do quimioterápico no núcleo das células neoplásicas, provavelmente em decorrência da hiperacetilação das histonas e descondensação da cromatina. Na avaliação *in vivo*, em modelos experimentais submetidos ao xenotransplante, também foi vista maior redução tumoral, quando houve associação dos fármacos.

Foram avaliados os efeitos farmacocinético e farmacodinâmico da combinação do ácido valpróico com a doxorrubicina em cães diagnosticados com diferentes neoplasias (linfoma, melanoma, carcinoma pulmonar, carcinoma renal, osteossarcoma, adenocarcinoma de glândula apócrina e sarcoma de tecidos moles), sendo que as respostas terapêuticas foram variáveis. Apesar do número reduzido de animais incluídos no estudo, os pesquisadores sugerem que a associação das drogas é segura e pode ser considerada sua utilização em cães (Wittenburg et al., 2010).

Na espécie canina, ainda é escasso o conhecimento sobre a expressão das HDAC e acetilação das histonas, tanto no LDGCB como em outros tipos tumorais. A identificação de alterações epigenéticas é um importante passo na elucidação da patogênese do linfoma multicêntrico, considerada uma das neoplasias mais comuns na rotina clínica veterinária, visando melhorar o diagnóstico e estimulando o desenvolvimento de terapias-alvo específicas, fatores associados que podem melhorar o prognóstico dos pacientes.

1.4 Referências bibliográficas

Ageberg M, Rydström K, Relander T, Drott K (2013) The histone deacetylase inhibitor valproic acid sensitizes diffuse large B-cell lymphoma cell lines to CHOP-induced cell death. **American Journal of Translational Research** 5:170–83.

Alberti C, Cochella L (2017) A framework for understanding the roles of miRNAs in animal development. **Development** 144:2548–2559.

- Amengual JE (2020). Can we use epigenetics to prime chemoresistant lymphomas? **American Society Hematology Education Program** 2020(1):85-94.
- Asada H, Tomiyasu H, Uchikai T, Ishihara G, Goto-Koshino Y, Ohno K, Tisujimoto H (2019) Comprehensive analysis of miRNA and protein profiles within exosomes derived from canine lymphoid tumour cell lines. **PloS One** 14:1–15.
- Ausió J, Levin DB, De Amorim GV, Bakker S, Macleod PM (2003) Syndromes of disordered chromatin remodeling. **Clinical Genetics** 64:83-95.
- Azevedo MPS (2015) **Avaliação da marca epigenética H3K4me3 como biomarcador no Linfoma Difuso de Grandes Células B**. 25 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto.
- Baylin SB, Jones PA (2011) A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications. **Nature Reviews Cancer** 11:726-734.
- Baylin SB, Jones PA (2016) Epigenetic determinants of cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology** 8:a019505.
- Bereshchenko OR, Gu W, Dalla-Favera R (2002) Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. **Nature Genetics** 32:606-13.
- Beumer JH, Tawbi H (2010) Role of histone deacetylases and their inhibitors in cancer biology and treatment. **Current Clinical Pharmacology** 5(3):196–208.
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M (1999) A mammalian protein with specific demethylase activity form CpG DNA. **Nature** 397:579-583.
- Bianco TN, Abdalla DR (2016) Epigenética dos linfomas do tipo não-Hodgkin: revisão de literatura. **Jornal de Ciências Biomédicas e Saúde** 2(1):10-17.
- Biswas S, Rao CM (2018) Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. **European Journal of Pharmacology** 837:8–24.
- Buurman R, Gürlevik E, Schäffer V, Eilers M, Sandbothe M, Kreipe H, Wilknes L, Schlegelberger B, Kunel F, Skawran B (2012) Histone deacetylases activate hepatocyte growth factor signaling by repressing microRNA-449 in hepatocellular carcinoma cells. **Gastroenterology** 143(3), 811-820.
- Burnett RC, Vernau W, Modiano JF, Olver, CS, Moore PF, Avery A (2003) Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. **Veterinary Pathology** 40:32-41.
- Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST (2008) Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. **Cancer Letters** 269:7–17.
- Caslini C, Hong S, Ban YJ, Chen KS, Ince TA (2019) HDAC7 regulates histone 3 lysine 27 acetylation and transcriptional activity at super-enhancer-associated genes in breast cancer stem cells, **Oncogene** 38:6599–6614.
- Ceccacci E, Minucci S. Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: lessons from leukaemia. **British Journal of Cancer** 114(6):605-611.

- Chang HH, Chiang CP, Hung HC, Lin CY, Deng YT, Kuo MYP (2009) Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients. **Oral Oncology** 45:610–614.
- Chen T, Dent SYR (2014) NIH Public Access. **Nature Reviews Genetics** 15(2):93–106.
- Chen X, Zhao S, Li H, Wang X, Geng A, Cui H, Lu T, Chen Y, Zhu Y (2019) Design, synthesis and biological evaluation of novel isoindolinone derivatives as potent histone deacetylase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry** 168:110-122.
- Chevallier N, Corcoran CM, Lennon C, Hyjek E, Chadburn A, Bardwell VJ, Licht JD, Melnick A (2004) ETO protein of t(8;21) AML is a corepressor for Bcl-6 B-cell lymphoma oncoprotein. **Blood** 103:454–1463.
- Childress MO, Ramos-Vara JA, Ruple A (2016) A randomized controlled trial of the effect of prednisone omission from a multidrug chemotherapy protocol on treatment outcome in dogs with peripheral nodal lymphomas. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 249:1067-1078.
- Cho H, Yoon DH (2018). Phase I study of CKD-581, a pan-histone deacetylase inhibitor, in patients with lymphoma or multiple myeloma refractory to standard therapy. **Investigational new drugs** 36(5):877-885.
- Clozel T, Yang S et al. (2013) Mechanism-based epigenetic chemosensitization therapy of diffuse large B-cell lymphoma. **Cancer Discovery** 3(9):1002–1019.
- Conley BA, Wright JJ, Kummar S (2006) Targeting epigenetic abnormalities with histone deacetylase inhibitors. **Cancer** 107:832–840.
- Costa EBO, Pacheco C (2013) Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde** 34(2):125-136.
- Costelloe T, Fitzgerald J, Murphy NJ, Flaus A, Lowndes NF (2006) Chromatin modulation and the DNA damage response. **Experimental Cell Research** 312:2677-686.
- Craig KK, Wood GA, Keller SM, Mutsaers AJ, Wood RD (2019). MicroRNA profiling in canine multicentric lymphoma. **PloS one** 14(12):e0226357.
- Croce CM (2009) Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. **Nature Reviews Genetics** 10(10):704–714.
- Cutter AR, Hayes JJ (2015) A brief review of nucleosome structure. **FEBS Letters** 589:2914–22.
- Cycon KA, Mulvaney K, Rimsza LM, Persky D, Murphy SP (2013) Histone deacetylase inhibitors activate CIITA and MHC class II antigen expression in diffuse large B-cell lymphoma. **Immunology** 140:259–272.
- Da Costa TP, El-Cheikh MC, Carneiro K (2020). Epigenetic Therapy as a Putative Molecular Target to Modulate B Cell Biology and Behavior in the Context of Immunological Disorders. **Journal of immunology Research** 2020:1-19.

- D'Alessio ,AC Szyf M (2006) Epigenetic tête-à_tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. **Biochemistry Cell Biology** 84:463-76.
- Damm JK, Gordon S, Ehinger M, Jerkeman M, Gullberg U, Hultquist A, Drott K (2015) Pharmacologically relevant doses of valproate upregulate CD20 expression in three diffuse large B-cell lymphoma patients *in vivo*. **Experimental Hematology and Oncology** 4(1):1-7.
- Dawson MA, Kouzarides T (2012) Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. **Cell** 150:12–27.
- De S, Shaknovich R et al. (2013) Aberration in DNA methylation in B-cell lymphomas has a complex origin and increases with disease severity. **PLoS Genetics** 9(1):e1003137.
- Deng S, Hu Q, Zhang H, Yang F, Peng C, Huang C (2019) HDAC3 inhibition upregulates PD-L1 expression in B-cell lymphomas and augments the efficacy of anti-PD-L1 therapy. **Molecular Cancer Therapeutics** 18:900–908.
- De Ruijter AJ, Van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, Van Kuilenburg AB (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **Biochemical Journal** 370:737-749.
- De Smet C, Lorient A, Boon T (2004) Promoter-dependent mechanism leading to selective hypomethylation within the 5' region of gene MAGE-A1 in tumor cells. **Molecular and Cellular Biology** 24:4781-4790.
- Dias JN, Aguiar SI et al. (2018) The histone deacetylase inhibitor panobinostat is a potent antitumor agent in canine diffuse large B-cell lymphoma. **Oncotarget** 9(47), 28586.
- Drott K, Hagberg H, Papworth K, Relander T, Jerkeman M (2018) Valproate in combination with rituximab and CHOP as first-line therapy in diffuse large B-cell lymphoma (VALFRID). **Blood Advances** 26:1386–1392.
- Dworkin AM, Huang THM, Toland AE (2009) Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. **Seminars in Cancer Biology** 19:165-171.
- Eckschlagner T, Pich J, Stiborova M, Hrabeta J (2017) Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. **International Journal of Molecular Sciences** 18(7):1414–1425.
- Elmallah MI, Micheau O (2019) Epigenetic regulation of TRAIL signaling: implication for cancer therapy. **Cancers** 11(6), 850.
- Elvers I, Turner-Maier J (2015) Exome sequencing of lymphomas from three dog breeds reveals somatic mutation patterns reflecting genetic background. **Genome Research** 25(11):1634–45.
- Epiphany TMF, Fernandes NCCA et al. (2019) Global DNA methylation of peripheral blood leukocytes from dogs bearing multicentric non-Hodgkin lymphomas and healthy dogs: A comparative study. **PloS One** 14:1–22.

- Esteller M (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nature** 8(4):286–298.
- Eto S, Saeki K (2019) Anti-tumor effects of the histone deacetylase inhibitor vorinostat on canine urothelial carcinoma cells. **PLoS One** 16(6):e0218382.
- Faiola F, Liu X, Lo S, Pan S, Zhang K, Lyman E, Farina A, Martinez E (2005) Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. **Molecular and Cellular Biology** 25:10220–10234.
- Feinberg AP, Tycko B (2004) The history of cancer epigenetics. **Nature Review Cancer** 4(2):143-153.
- Ferraresso S, Bresolin S, Arico A, Comazzi S, Gelain M, Riondato F, Bargelloni L, Marconato L, Kronnie G, Aresu L (2014) Epigenetic Silencing of TFPI-2 in Canine Diffuse Large B Cell Lymphoma. **PLoS ONE** 9(4): e92707.
- Ferraresso S, Aricò A et al. (2017) DNA methylation profiling reveals common signatures of tumorigenesis and defines epigenetic prognostic subtypes of canine Diffuse Large B-cell Lymphoma. **Scientific Reports** 7(1):1–11.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. (2008) Mechanisms of posttranscriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nature Reviews Genetics** 9(2):102-114.
- Flavahan WA, Gaskell E, Bernstein BE (2017) Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. **Science** 357: eaal2380.
- Fraga MF, Ballestar E et al. (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. **Nature Genetics** 37:391–400.
- Frys S, Simons Z, Hu Q, Barth MJ, Gu JJ, Mavis C, Skitzki J, Song L, Czuczman MS, Hernandez-Ilizaliturri FJ (2015) Entinostat, a novel histone deacetylase inhibitor is active in B-cell lymphoma and enhances the anti-tumour activity of rituximab and chemotherapy agents. **British Journal of Haematology** 169(4):506-519.
- Gammoh N, Lam D, Puente C, Ganley I, Marks PA, Jiang X (2012) Role of autophagy in histone deacetylase inhibitor-induced apoptotic and nonapoptotic cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 109(17):6561-6565.
- Garrido F, Aptsiauri N, Doorduijn EM, Lora AMG, van Hall T (2016) The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. **Current Opinion in Immunology** 39:44–51.
- Gibbs WW (2007) Além do DNA. **Scientific American Brasil** 16:44-51.
- Gloghini A, Buglio B, Khaskhely NM, Georgakis G, Orlowski RZ, Neelapu SS, Carbone A, Younes Y (2009) Expression of histone deacetylases in lymphoma: implication for the development of selective inhibitors. **British Journal of Haematology** 147:515–525.

Green MR, Kihira S et al. (2015) Mutations in early follicular lymphoma progenitors are associated with suppressed antigen presentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 112(10):E1116–25.

Greenberg MVC, Bourc'his D (2019) The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 20:590-607.

Grunewald CM, Schulz WA, Skowron MA, Hoffmann MJ, Niegisch G (2018) Tumor immunotherapy-the potential of epigenetic drugs to overcome resistance. **Translational Cancer Research** 7:1151–1160.

Grunstein M (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. **Nature** 389:349–352.

Gryder BE, Sodji QH, Oyelere AK (2012) Targeted cancer therapy: giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed. **Future Medicinal Chemistry** 4:505–524.

Guerriero JL, Sotayo A et al. (2017). Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages. **Nature** 543:428-432.

Gunes A, Bilir E, Zengil H, Babaoglu MO, Bozkurt A, Yasar U (2007) Inhibitory effect of valproic acid on cytochrome P450 2C9 activity in epilepsy patients. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology** 100(6):383–386.

Haery L, Thompson RC, Gilmore TD (2015) Histone acetyltransferases and histone deacetylases in B- and T-cell development, physiology and malignancy. **Genes and cancer** 6:184–213.

Hassler M, Schiefer AI, Egger G (2013) Combating the epigenome: epigenetic drugs against non-Hodgkin's lymphoma. **Epigenomics** 5(4):397–415.

Hopp L, Löffler-Wirth H, Binder H (2015) Epigenetic Heterogeneity of B-Cell Lymphoma: DNA Methylation, Gene Expression and Chromatin States. **Genes** 6: 812–840.

Howell PMJR Liu S, Ren S, Behlen C, Fodstad O, Riker AI (2009) Epigenetics in human melanoma. **Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center** 16(6):200-218.

Huang YH, Cai K et al. (2021). CREBBP/EP300 mutations promoted tumor progression in diffuse large B-cell lymphoma through altering tumor-associated macrophage polarization via FBXW7-NOTCH-CCL2/CSF1 axis. **Signal transduction and targeted therapy** 6(1):1-14.

Humphries B, Wang Z, Yang C (2019) MicroRNA Regulation of Epigenetic Modifiers in Breast Cancer. **Cancers** 11:897.

Ilango S, Paital B, Jayachandran P, Padma PR, Nirmaladevi R (2020) Epigenetic alterations in cancer. **Frontiers in Bioscience** 25(1):1058-109.

Jirtle RL, Skinner MK (2007) Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews Genetics** 8:253-262.

- Jones PA, Baylin SB (2007) The epigenomics of cancer. **Cell** 128:683–692.
- Jovanovic J, Rønneberg JA, Tost J, Kristensen V (2010) The epigenetics of breast cancer. **Molecular Oncology** 4:242-254.
- Juan LJ, Shia WJ, Chen MH, Yang WM, Seto E, Lin YS, Wu CW (2000). Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. **Journal of Biological Chemistry** 275:20436–20443.
- Jung KH, Noh JH et al. (2012) HDAC2 overexpression confers oncogenic potential to human lung cancer cells by deregulating expression of apoptosis and cell cycle proteins. **Journal of Cellular Biochemistry** 113(6):2167-2177.
- Kebede AF, Schneider R, Daujat S (2015) Novel types and sites of histone modifications emerge as players in the transcriptional regulation contest. **The FEBS Journal** 282:1658–74.
- Khan, O., & La Thangue, N. B. (2012). HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. **Immunology and Cell Biology**, 90(1):85-94.
- Khan AQ, Ahmed EI, Elareer NR, Junejo K, Steinho M, Uddin S (2019) Role of miRNA-Regulated Cancer Stem Cells in the Pathogenesis of Human Malignancies. **Cells** 8:840.
- Kisseberth WC, Murahari S, London CA, Kulp S, Chen CS (2008) Evaluation of the effects of histone deacetylase inhibitors on cells from canine cancer cell lines. **American Journal of Veterinary Research** 69:938-945.
- Kong Y, Barisone GA, Sidhu RS, O'Donnell RT, Tuscano JM (2015) Efficacy of Combined Histone Deacetylase and Checkpoint Kinase Inhibition in a Preclinical Model of Human Burkitt Lymphoma. **Molecular Medicine** 21:824–832.
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. **Cell** 128:693–705.
- Lee SH, Yoo C, Im S, Jung JH, Choi HJ, Yoo J (2014) Expression of histone deacetylases in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical significance. **International Journal of Medical Sciences** 11:994–1000.
- Li Y, Seto E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine** 6(10):a026831.
- Li G, Tian Y, Zhu WG (2020) The roles of histone deacetylases and their inhibitors in cancer therapy. **Frontiers in Cell and Developmental Biology** 8:1-34.
- Liao B, Sun Q, Yuan Y, Yin Y, Qiao J, Jiang P (2020). Histone deacetylase inhibitor MGCD0103 causes cell cycle arrest, apoptosis, and autophagy in liver cancer cells. **Journal of Cancer** 11(7):1915-1926.
- Lin HY, Chen CS, Lin SP, Weng JR, Chen CS (2006) Targeting histone deacetylase in cancer therapy. **Medicinal Research Reviews** 26:397–413.
- Lindemann RK, Gabrielli B, Johnstone RW (2004) Histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. **Cell Cycle** 3:779-88.

- Liu T, Kuljaca S, Tee A, Marshall GM (2006) Histone deacetylase inhibitors: Multifunctional anticancer agents. **Cancer Treatment Reviews** 32:157-65.
- Liu Z, Cai Y et al. (2018) Activation of MET signaling by HDAC6 offers a rationale for a novel ricolinostat and crizotinib combinatorial therapeutic strategy in diffuse large B-cell lymphoma. **The Journal of pathology** 246(2):141-153.
- Lobera M, Madauss KP et al. (2013) Selective class IIa histone deacetylase inhibition via a nonchelating zinc-binding group. **Nature Chemical Biology** 9:319-325.
- Lurie DM, Gordon IK, Theon AP, Rodriguez CO, Suter SE, Kent MS (2009) Sequential low-dose rate halfbody irradiation and chemotherapy for the treatment of canine multicentric lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 23:1064-1070.
- Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R (2005) Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. **Medicinal Research Reviews** 25:261–309.
- Marconato L, Gelain ME, Comazzi S (2013) The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. **Hematological Oncology** 31: 1-9.
- Marconato L, Stefanello D, Sabattini S, Comazzi S, Riondato, F, Lagnada P, Frayssinet P, Pizzoni S, Rouquet N, Aresu L (2015) Enhanced therapeutic effect of APAVAC immunotherapy in combination with dose-intense chemotherapy in dogs with advanced indolent B-cell lymphoma. **Vaccine** 33:5080-5086.
- Margeron R, Trojer P, Reinberg D (2005) The key to development: interpreting the histone code? **Current Opinion in Genetics and Development** 15:163-76.
- Marks PA (2010) Histone deacetylase inhibitors: a chemical genetics approach to understanding cellular functions. **Biochimica et Biophysica Acta** 1799(10-12):717-725.
- Marks PA, Jiang X (2005) Histone deacetylase inhibitors in programmed cell death and cancer therapy. **Cell Cycle** 4:549-551.
- Marks PA, Richon VM, Rifkind RA (2000) Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. **Journal of the National Cancer Institute** 92:1210–1216.
- Marquard L, Gjerdrum LM, Christensen IJ, Jensen PB, Sehested M, Ralfkiaer E (2008). Prognostic significance of the therapeutic targets histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in cutaneous T-cell lymphoma. **Histopathology** 53(3):267-277.
- Marquard L, Poulsen CB, Gjerdrum LM, Brown PN, Christensen IJ, Jensen P.B, Sehested M, Johansen P, Ralfkiær E (2009) Histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in B- and T-cell lymphomas. **Histopathology** 54:688–698.
- Martins MD, Castilho RM (2013) Histones: controlling tumor signaling circuitry. **J. Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis** 1(5):1-12.
- Matiz OS (2019) **Evaluation of acetylated histones 3 and 4 and histone deacetylases 1, 2 and 6 in cutaneous T-cell lymphoma in dogs.** 101 f. Tese

(Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

McClure JJ, Li X, Chou CJ (2018) Advances and challenges of HDAC inhibitors in cancer therapeutics. **Advances in cancer research** 138:183-211.

Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, Niho Y, Sasaki H (2001) Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. **Blood** 97(5):1172–1179.

Montalbán C, García JF et al. (2004) Influence of biologic markers on the outcome of Hodgkin's Lymphoma: A study by the Spanish Hodgkin's Lymphoma Study Group. **Journal of Clinical Oncology** 22(9):1664-1673.

Morel D, Jeffery D, Aspeslagh S, Almouzni G, Postel-Vinay S (2020) Combining epigenetic drugs with other therapies for solid tumours - past lessons and future promise. **Nature Reviews Clinical Oncology** 17(2):91-107.

Mohammad HP, Barbash O, Creasy CL (2019) Targeting epigenetic modifications in cancer therapy: erasing the roadmap to cancer. **Nature Medicine** 25(3):403-418.

Morin RD, Mendez-Lago M et al. (2011). Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. **Nature** 476:298–303.

Moss TJ, Wallrath LL (2007) Connections between epigenetic gene silencing and human disease. **Mutation Research** 618(1-2):163-174.

Morin RD, Johnson NA et al. (2010) Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. **Nature genetics** 42(2):181–185.

Mottamal M, Zheng S, Huang TL, Wang G (2015) Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. **Molecules** 20:3898-3941.

Muller HR, Prado KB (2008) Epigenética: um novo campo da genética. **Rubs** 1(3):61-69.

Munster PN, Marchion D et al. (2009). Phase I trial of vorinostat and doxorubicin in solid tumours: histone deacetylase 2 expression as a predictive marker. **British Journal of Cancer** 101:1044-1050.

Murahari S, Jalkanen AL, Kulp SK, Chen CS, Modiano JF, London CA, Kisseberth WC (2017) Sensitivity of osteosarcoma cells to HDAC inhibitor AR-42 mediated apoptosis. **BMC Cancer** 17:1-11.

Neganova ME, Klochkov SG, Aleksandrova YR, Aliev G (2020) Histone modifications in epigenetic regulation of cancer: Perspectives and achieved progress. **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press.

Oki, Y, Buglio D et al. (2013). Phase I study of panobinostat plus everolimus in patients with relapsed or refractory lymphoma. **Clinical Cancer Research** 19: 6882–6890.

Pan H, Jiang Y et al. (2015) Epigenomic evolution in diffuse large B-cell lymphomas. **Nature Communications** 6:6921.

- Parachini-Winter C, Bracha S, Ramsey SA, Yang L, Ho E, Leeper HJ, Curran K M (2020) Prospective evaluation of the lymph node proteome in dogs with multicentric lymphoma supplemented with sulforaphane. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 34(5):2036-2047.
- Park JH, Jung Y et al. (2004) Class I histone deacetylase selective novel synthetic inhibitors potently inhibit human tumor proliferation. **Clinical Cancer Research** 10:5271-5281.
- Park J, Thomas S, Munster PN. Epigenetic modulation with histone deacetylase inhibitors in combination with immunotherapy. **Epigenomics** 7(4):641-652.
- Pascual M, Mena-Varas et al. (2019) PD-1/PD-L1 immune checkpoint and p53 loss facilitate tumor progression in activated B-cell diffuse large B-cell lymphomas. **Blood** 133:2401–2412.
- Pasqualucci L, Dominguez-Sola D et al. (2011) Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. **Nature** 471: 189-195.
- Peart MJ, Smyth GK, Van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA Holloway AJ Johnstone RW (2005) Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 102(10):3697-702.
- Peterson CL, Lainel MA (2004) Histones and histones modifications. **Current Biology** 14:546-51.
- Pfister SX, Ashworth A (2017) Marked for death: targeting epigenetic changes in cancer. **Nature reviews Drug Discovery** 16(4):241-263.
- Piekarz RL, Robey RW, Zhan Z, Kayastha G, Sayah A, Abdeldaim AH, Torrico S, Bates SE (2004) T-cell lymphoma as a model for the use of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: impact of depsipeptide on molecular markers, therapeutic targets, and mechanisms of resistance. **Blood** 103(12):4636-4643.
- Pillonel V, Reichert N, Cao C, Heideman MR, Yamaguchi T, Matthias G, Tzankov A, Matthias P (2016). Histone deacetylase 1 plays a predominant pro-oncogenic role in Eμ-myc driven B cell lymphoma. **Scientific reports** 6(1):1-13.
- Pluemsampant S, Safronova OS, Nakahama K, Morita I (2008) Protein kinase CK2 is a key activator of histone deacetylase in hypoxia-associated tumors. **International Journal of Cancer** 122(2):333–341.
- Prince HM, Prince M (2009) Panobinostat (LBH589): a novel pan-deacetylase inhibitor with activity in T cell lymphoma. **Hematology Meeting Reports** 3:33-38.
- Qin J, Wen B, Liang Y, Yu W, Li H (2019) Histone modifications and their role in colorectal Cancer (Review). **Pathology and Oncology Research** 26(4):2023-2033.
- Ray A, Alalem M, Ray BK (2013) Loss of epigenetic Kruppel-like factor 4 histone deacetylase (KLF-4-HDAC)-mediated transcriptional suppression is crucial in increasing vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in breast cancer. **Journal of Biological Chemistry** 288(38):27232-27242.

Ribeiro ML, Reyes-Garau D, Armengol M, Fernández-Serrano M, Serrano MF, Roué G (2019). Recent advances in the targeting of epigenetic regulators in B-cell non-Hodgkin lymphoma. **Frontiers in Genetics** 10:986.

Ribrag V, Kim WS et al. (2017) Safety and efficacy of abexinostat, a pan-histone deacetylase inhibitor, in non- Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: Results of a phase II study. **Haematologica** 102:903-909.

Rodenhiser D, Mann M (2006) Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **Canadian Medical Association Journal** 174(3):341-48.

Ronzoni S, Faretta M, Ballarini M, Pelicci P, Minucci S (2005) New Method to Detect Histone Acetylation Levels by Flow Cytometry. **Cytometry Part** 66:52-61.

Rosa HS, Caldas C (2005) Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. **European Journal of Cancer** 41:2381-402.

Roth SY, Allis CD (1996) Histone acetylation and chromatin assembly: a single escort, multiple dances? **Cell** 87:5–8.

Rothhammer T, Bosserhoff AK (2007) Epigenetic events in malignant melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research** 20:92-111.

Sato M, Mochizuki H, Goto-Koshino Y, Fujiwara-Igarashi A, Takahashi M, Ohno K, Tsujimoto H et al (2018) Prognostic significance of hypermethylation of death-associated protein kinase (DAPK) gene CpG island in dogs with high-grade B-cell lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology** 16:409-415.

Seidel C, Florean C, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M (2012) Chromatinmodifying agents in anti-cancer therapy. **Biochimie** 94(11):2264–2279.

Sena BVD (2019) **Imunomarcção das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em sarcomas de tecidos moles em cães**. 31 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

Senhorello ILS (2020) **Avaliação do padrão de acetilação das histonas H3 e H4 e expressão das enzimas HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em tumores mamários de cadelas**. 94 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

Sermer D, Pasqualucci L, Wendel HG, Melnick A, Younes A (2019) Emerging epigenetic-modulating therapies in lymphoma. **Nature Reviews Clinical Oncology** 16:494–507.

Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW (2012) Non-Hodgkin lymphoma. **The Lancet** 380:848–857.

Sloan SL, Renaldo KA et al. (2021) Validation of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) as a candidate therapeutic target in the spontaneous canine model of non-Hodgkin lymphoma. **PloS one** 16(5):e0250839.

- Stahl M, Kohrman N, Gore SD, Kim TK, Zeidan AM, Prebet T (2016) Epigenetics in Cancer: A Hematological Perspective. **PLoS Genetics** 12:1–21.
- Stathis A, Younes A (2015) The new therapeutical scenario of Hodgkin lymphoma. **Annals of Oncology** 26(10):2026-2033.
- Stimson L, La Thangue NB (2009) Biomarkers for predicting clinical responses to HDAC inhibitors. **Cancer Letters** 280:177-183.
- Stirzaker C, Taberlay PC, Statham AL, Clark SJ (2014) Mining cancer methylomes: prospects and challenges. **Trends in Genetics** 30(2):75–84.
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. **Nature** 403:41-45.
- Struhl H (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. **Genes and Development** 12(5):599-606.
- Su Y, Nielsen D, Zhu L, Richards K., Suter S., Breen M, Motsinger-Reif A, Osborne J (2013). Gene selection and cancer type classification of diffuse large-B-cell lymphoma using a bivariate mixture model for two-species data. **Human Genomics** 7:2.
- Tang WY, Ho SM (2007) Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders** 8:173-82.
- Thiagalingam S, Cheng K., Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF (2003) Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. **Annals of New York Academy of Sciences** 983:84-100.
- Toh TB, Lim JJ, Chow EK (2017) Epigenetics in cancer stem cells. **Molecular Cancer** 16(1):29.
- Turner BM (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. **Bioessays** 22:836-845.
- Uehara N, Yoshizawa K, Tsubura A (2012) Vorinostat enhances protein stability of p27 and p21 through negative regulation of Skp2 and Cks1 in human breast cancer cells. **Oncology Reports** 28:105–110.
- Vail DM (2011) Tumors of the haemopoietic system. In.: Dobson JM, Lascelles BDX (Eds.) **BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology**. Wiley e Sons, p.285-291.
- Vail DM, Pinkerton M, Young KM (2019) Hematopoietic tumors. In.: Vail DM, Thamm DH, Liptak JM (Eds.) **Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 688-771.

- Van Lint C, Emiliani S, Verdin E (1996) The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. **Gene Expression Patterns** 5:245–253.
- Wade PA, Pruss D, Wolffe AP (1997) Histone acetylation: chromatin in action. **Trends in Biochemical Sciences** 22(4):128-132.
- Wang M, Fang X, Wang X (2020) Emerging role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma. **Leukemia and Lymphoma** 61:763–775.
- Wang X, Waschke BC, Woolaver RA, Chen SM, Chen Z, Wang JH (2020) HDAC inhibitors overcome immunotherapy resistance in B-cell lymphoma. **Protein & Cell** 11(7):472-482.
- Ward LS (2002) Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia** 46(4):351-360, 2002.
- Webber LP **Análise da acetilação de histone 3 e sua relação com proliferação celular e transição epitélio mesênquima m leucoplasias e carcinomas espinocelulares de boca.** 77 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – UFRS, Porto Alegre.
- Weichert W (2009) HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. **Cancer Letters** 280(2):168-176.
- Weichert W, Roske A, Niesporek S, Noske A, Buckendahl AC, Dietel M, Gekeler V, Boehm M, Beckers T, Denkert C (2008) Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases *in vitro* and *in vivo*. **Clinical Cancer Research** 14(6):1669-77.
- West AC, Johnstone RW (2014) New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. **The Journal of clinical investigation** 124(1):30-39.
- Wittenburg LA, Bisson L, Rose BJ, Korch C, Thamm DH (2011) The histone deacetylase inhibitor valproic acid sensitizes human and canine osteosarcoma to doxorubicin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology** 67:83-92.
- Wittenburg LA, Gustafson DL, Thamm DH (2010) Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of combined valproic acid/doxorubicin treatment in dogs with spontaneous cancer. **Clinical Cancer Research** 16:4832-42.
- Wong Doo N, Makalic E et al. (2016) Global measures of peripheral blood-derived DNA methylation as a risk factor in the development of mature B-cell neoplasms. **Epigenomics** 8(1):55–66.

- Xavier PLP, Müller S, Fukumasu H (2020) Epigenetic Mechanisms in Canine Cancer. **Frontiers in Oncology** 10, 2353.
- Xu-Monette ZY, Zhou J, Young KH (2018) PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas. **Blood** 131:68–83.
- Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J (2007) Sirtuin functions in health and disease. **Molecular Endocrinology** 21:1745–1755.
- Yamashita S, Kishino T et al. (2018). Genetic and epigenetic alterations in normal tissues have differential impacts on cancer risk among tissues. **Proceedings of the national academy of sciences** 115(6):1328-1333.
- Ying, CY, Dominguez-Sola D, Fabi M, Lorenz IC, Bansal M, Califano A, Pasqualucci L, Basso K, Dalla-Favera, R. (2012). MEF2B Mutations lead to de-regulated expression of the BCL6 oncogene in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma. **Blood** 120(21):1284.
- Zain J (2012) Role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of lymphomas and multiple myeloma. **Hematology/Oncology Clinics of North America** 26:671-704.
- Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Omoto Y, Ando Y, Mita K, Hamaguchi M, Hayashi SI, Iwase H (2004) HDAC6 Expression is correlated with better survival in breast cancer. **Clinical Cancer Reserach** 10:6962–6968.
- Zhao D, Li F, Cheng Z, Lei Q (2014) Impact of acetylation on tumor metabolism. **Molecular and Cellular Oncology** 1(3):e963452.
- Zhao WL, Wang L, Liu YH, Yan JS, Leboeuf C, Liu YY, Wu WL, Japin A, Chen Z, Chen SJ (2007) Combined effects of histone deacetylase inhibitor and rituximab on non-Hodgkin's B-lymphoma cells apoptosis. **Experimental Hematology** 35(12):1801-1811.
- Zupkovitz G, Grausenburger R et al. (2010) The cyclindependent kinase inhibitor p21 is a crucial target for histone deacetylase 1 as a regulator of cellular proliferation. **Molecular and Cellular Biology** 30(5):1171-1181.

CAPÍTULO 2 - Avaliação da acetilação das histonas H3 e H4 e expressão das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 no linfoma multicêntrico canino¹

Isabela C. Canavari^{1,*}, Igor L. S. Senhorello², Oscar S. Matiz³, Giovanni V. Hernandez⁴, Letícia A. Anai⁵, Roberto A. N. Ampuero⁶, Flávio V. Meirelles⁷, Cibele M. P. Zinni⁷, Renee Laufer-Amorim⁸, Andriago B. De Nardi¹, Mirela Tinucci-Costa¹

¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil

²Universidade de Vila Velha, Vila Velha - ES, Brasil

³Universidad de La Salle, Bogotá, Colômbia

⁴Departamento de Saude Animal, Universidad Nacional de Colombia, UNAL, Bogotá, Colômbia.

⁵Universidade Brasil, Fernandópolis – SP, Brasil

⁶Médico Veterinário Autônomo

⁷Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga – SP, Brasil

⁸Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu-SP, Brasil

*Autor para correspondência: isabela.canavari@unesp.br

RESUMO

Mecanismos epigenéticos envolvendo as modificações das histonas são relacionados à patogênese do linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) humano, e estão associados à evolução da doença, a ponto de influenciar no prognóstico desta e tornarem-se alvos terapêuticos, porém são pouco compreendidos em cães com a doença, mesmo sendo este um subtipo tumoral muito comum nessa espécie. Com este propósito, o estudo em tela avaliou a acetilação das histonas H3 e H4 e enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em amostras de linfonodos de cães com LDGCB (GL; n=20), comparando com linfonodos da mesma espécie, sem alterações patológicas (GC; n=5). A expressão imuno-histoquímica das histonas e enzimas foi validada pelo *Western blot*. A expressão de H3, H4, HDAC1, HDAC2 e

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista *Scientific Reports* e encontra-se em avaliação para publicação.

HDAC6 e variáveis clínico-patológicas dos pacientes com linfoma foram correlacionadas entre si e com o prognóstico dos cães. Os resultados mostraram que HDAC2 está mais expressa no linfoma. As histonas acetiladas e enzimas histonas desacetilases não apresentaram correlação com a expressão de Ki67, tempo livre de doença (TLD), tempo de sobrevivida (TS), estágio e subestágio da doença. Porém, o alto índice mitótico foi correlacionado à menor sobrevivida dos cães e menor expressão de HDAC6, e a presença de sinais clínicos no estadiamento da doença (subestágio b) indicou menores TLD e TS. O estudo em tela também aponta que a maior expressão de HDAC2 parece estar associada a um pior prognóstico para cães com LDGCB e futuras investigações são necessárias para corroborar nossos resultados.

Introdução

A carcinogênese é um processo resultante de danos genéticos, diretamente relacionados ao DNA, ao passo que as alterações epigenéticas [1,2], promovem o controle da expressão gênica e a regulação da transcrição, por meio de modificações químicas no DNA e na cromatina, porém sem alterar a sequência genética. Como resultado haverá alterações fenotípicas que são herdáveis durante a mitose e meiose celulares e podem sofrer influência ambiental [3-5].

O desenvolvimento celular depende da atuação equilibrada dos mecanismos epigenéticos, uma vez que a regulação transcricional interfere na regulação do crescimento e diferenciação celulares. Portanto, alterações na expressão gênica podem promover a inativação de genes supressores tumorais, desregulação do ciclo celular, inibição da apoptose, indução da proliferação celular descontrolada e ativação de oncogenes, estimulando assim, a tumorigênese [6,7].

Os principais mecanismos epigenéticos envolvidos na regulação da transcrição e adequada expressão gênica são as modificações das histonas, metilação do DNA e os microRNAs (miR) [8,9]. Histonas são proteínas que atuam como uma matriz na qual o DNA se enrola, formando o nucleossomo. Essas proteínas possuem caudas, agrupamentos amino-terminais (N-terminal) contendo diversos resíduos de aminoácidos, sujeitos a modificações pós-transcricionais [10,11], constituindo um ponto-chave na regulação epigenética e na fisiopatogenia de muitas neoplasias [12,13].

Dentre os mecanismos de modificações das histonas, a acetilação é um dos processos epigenéticos mais estudados [14] e ocorre de acordo com a atividade das enzimas histonas acetilases (HAT) e histonas desacetilases (HDAC), as quais adicionam e removem grupos acetil às caudas N-terminais (principalmente lisinas), respectivamente [15,16]. A atividade equilibrada desses dois grupos enzimáticos influencia na interação entre as histonas e o DNA, resultando em mudanças no grau de enovelamento da cromatina e, conseqüentemente, na expressão gênica, permitindo o controle da proliferação celular [17,18].

As HDAC tornam a cromatina condensada, diminuindo a acessibilidade aos fatores de transcrição e resultando no bloqueio da expressão gênica [19,20]. Desta forma, algumas enzimas podem ser expressas de forma aberrante em diversas neoplasias, promovendo o silenciamento de genes inibidores do ciclo e diferenciação celulares e estimulando a tumorigênese por meio de fatores responsáveis pela angiogênese, invasão, adesão e progressão tumorais [21-23]. Em humanos, alterações na acetilação das histonas H3 e H4, e expressão anormal das enzimas HDAC1, HDAC2 e HDAC6 parecem exercer papel importante na desregulação epigenética [24-28]. Destarte, as modificações epigenéticas na patogênese do câncer, contribuem para a progressão da doença e são potenciais alvos de estudos para intervenção terapêutica, já que os mecanismos enzimáticos são reversíveis [1,29,30].

Em humanos, alterações nos mecanismos epigenéticos de modificações das histonas são relatados em diferentes neoplasias hematopoiéticas, incluindo no LDGCB [31-36]. Estudos mostram que o grau de acetilação das histonas está diretamente relacionado ao silenciamento de genes supressores tumorais, ativação da oncogênese e desenvolvimento do linfoma [7,26,37]. Todavia, esses mecanismos ainda são pouco elucidados na medicina veterinária [38,40].

O linfoma é uma das neoplasias de maior frequência em cães, sendo que a forma multicêntrica chega a ocorrer em 80% dos casos e o subtipo LDGCB é a forma mais comum [41-43]. No entanto, a acetilação das histonas e expressão de HDAC ainda é pouco estudada no linfoma canino e a identificação de possíveis alterações epigenéticas é um importante passo para a elucidação da patogênese tumoral, como também para o futuro desenvolvimento de terapias-alvo que poderiam interferir no prognóstico.

O objetivo desse estudo foi avaliar a acetilação das histonas H3 e H4 e a expressão das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em linfonodos de cães com linfoma multicêntrico. A seguir, os resultados obtidos e os dados clínico-patológicos foram correlacionados entre si e com o prognóstico dos pacientes com linfoma.

Resultados

Caracterização dos animais. O grupo de cães com LDGCB (GL) foi constituído por fêmeas (13/20; 65%) e machos (7/20; 35%) com idade média de 8.8 anos, sendo Rottweiler (4/20; 20%) a raça mais prevalente. A avaliação clínica e estadiamento tumoral revelaram que os cães se encontravam em estágio III (4/20; 20%) ou IV (16/20; 80%) da doença, indicando o acometimento generalizado dos linfonodos sem e com envolvimento hepático e/ou esplênico, respectivamente. A maioria dos animais não apresentavam sinais clínicos sistêmicos quando foram atendidos (12/20; 60%). Os fatores clínicos e de proliferação celular do grupo linfoma (GL) estão descritas na Tabela 1.

Perfil epigenético no LDGCB em cães. As proteínas histonas e enzimas histonas desacetilases foram identificadas em amostras de linfonodos de cães por meio da marcação imuno-histoquímica. Esse foi o primeiro estudo que validou as proteínas H3 e H4 acetiladas em tecido linfóide de cão, enquanto as enzimas HDAC1, HDAC2 e HDAC6 foram revalidadas nessa espécie, pela técnica de *Western blot* (WB) (Figura 1).

Na imuno-histoquímica, o padrão de marcação no tecido linfóide canino foi comparado e apresentou semelhanças aos controles positivos, representados por amostras de linfonodos normais de cães, de forma que H3K9Ac, H4K12Ac, HDAC1 e HDAC2 apresentaram marcação predominantemente nuclear e HDAC6, marcação predominantemente citoplasmática (Figura 2). Vale ressaltar que a histona H4 acetilada e as enzimas HDAC1, HDAC2 e HDAC6 foram expressas em 100% das amostras, enquanto H3 acetilada foi expressa em 95% das amostras do GL. Dessa forma, a similaridade de imunomarcação dos anticorpos avaliados entre os tecidos, confirmou a sua expressão em linfócitos neoplásicos de cães.

A análise univariada (teste de Wilcoxon) dos escores de marcação de cada anticorpo entre os grupos GC (n=5) e GL (n=20) revelou aumento significativo na expressão de HDAC2 (P=0,031) nas amostras de LDGCB, em comparação com as amostras do grupo controle (Tabela 2). As demais marcações das histonas acetiladas H3, H4 e enzimas histonas desacetilases HDAC1 e HDAC6 não diferiram entre os grupos.

À análise multivariada de componentes principais e fatores, relacionada ao comportamento das histonas e HDAC, foram determinados três processos independentes. O primeiro relaciona as histonas acetiladas H3K9 e H4K12, ambas correlacionadas positivamente (F1), ou seja, apresentam tendência semelhante de comportamento no LDGCB canino, sendo que com a maior ou menor expressão de uma, a outra também é mais ou menos expressa, respectivamente. O segundo processo correlaciona as enzimas HDAC1 e HDAC6 de forma oposta (F2), ou seja, a tendência de maior expressão de uma enzima reflete menor expressão da outra. Por último, a enzima HDAC2 mantém um comportamento individual e independente da expressão das outras proteínas (F3) (Figura 3).

Correlação da avaliação epigenética e variáveis clínico-patológicas com o prognóstico. A expressão das histonas acetiladas H3, H4 e enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6, no LDGCB, foram categorizadas em alta e baixa expressão, de acordo com o valor da mediana de cada variável, e relacionadas ao tempo livre de doença (TLD) e tempo de sobrevivência (TS) dos animais do grupo linfoma (GL). A análise multivariada determinou que as variáveis epigenéticas (histonas e HDAC) não se correlacionaram com o TLD e TS dos cães. As curvas de sobrevivência estão apresentadas na Figura 4.

As avaliações referentes à proliferação celular no tecido neoplásico também foram correlacionadas com os fatores epigenéticos e o prognóstico dos animais do GL. A expressão de Ki67, proteína expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto G0, foi categorizada em alta (>35%) ou baixa (<35%), de acordo com a mediana, e não apresentou diferença significativa em relação ao TLD (P=0,263) e TS (P=0,609) dos animais doentes (Figura 5), nem foi correlacionado à expressão das histonas acetiladas e enzimas HDAC. O índice mitótico, também categorizado em alto (>26) e

baixo (<26), apresentou diferença significativa ($P=0,037$) em relação ao TS dos animais (Figura 6), sendo o tempo médio de 15 e 52 semanas, respectivamente. Na análise do teste de qui-quadrado de Pearson foi observada regressão linear inversa entre alto índice mitótico (>26) e expressão de HDAC6, ou seja, animais com maior IM exibiram menor expressão de HDAC6 (Figura 6).

As variáveis clínicas não apresentaram correlação com os fatores epigenéticos. Os estágios da doença (III e IV) também não se correlacionaram com o prognóstico dos animais com linfoma, porém o subestágio clínico diferiu significativamente ($P=0,033$) em relação ao TLD e TS dos cães doentes (Figura 7), de forma que os animais sem sinais clínicos, no momento do diagnóstico, apresentaram maior tempo de remissão da doença e sobreviveram por maior tempo.

Os dados das variáveis epigenéticas e clínico-patológicas e sua correlação com a média de TLD e TS, de acordo com a categoria dos animais, estão apresentados na Tabela 3.

Discussão

Um dos objetivos envolvidos em estudos sobre modificações nas histonas é a possibilidade de encontrar biomarcadores diagnóstico e prognóstico, além de alvos terapêuticos [44,45], o que contribuiria para o tratamento de muitos tipos de neoplasias. Diversos estudos envolvendo a identificação das modificações das histonas no câncer já foram realizados em humanos, incluindo neoplasias hematopoiéticas [32,36], gastrintestinais [46,47], hepatobiliares [48], mamárias [49] e ósseas [50]. As similaridades epigenéticas existentes entre o homem e a espécie canina estimulam investigar possíveis modificações de histonas na oncologia veterinária [51]. Com vistas a isso, nosso grupo de pesquisa tem se empenhado em avaliar as modificações de histonas no carcinoma mamário [52], linfoma cutâneo de células T [53] e no estudo em tela. Estudos similares foram desenvolvidos no carcinoma mamário [54], sarcoma de tecidos moles [55] e carcinoma urotelial [56].

Outros estudos em cães demonstraram hiperacetilação de H4 [53-55] e hipoacetilação de H3 [52,53,56] na maioria das neoplasias já avaliadas. Com relação às enzimas histonas desacetilases, HDAC2 apresentou menor expressão nos carcinomas mamários [52], enquanto HDAC1, HDAC2 e HDAC6 está mais expressa

nos sarcomas de tecidos moles [55], linfoma cutâneo de células T [53] e tumores de mama [52], respectivamente.

Adicionalmente, alterações epigenéticas envolvendo a acetilação das histonas foram incriminadas como fatores importantes na compreensão da patogênese dos linfomas B, em humanos [36,57], fato que motivou o desenvolvimento desse estudo; o primeiro que investigou alterações relacionadas à acetilação das histonas e enzimas histonas desacetilases no LDGCB, em cães. Por se tratar de uma das neoplasias mais frequentes na espécie canina, acreditamos na importância de buscar o melhor entendimento do processo patológico envolvido e a possibilidade de comparar a expressão das histonas e enzimas HDAC no LDGCB com linfonodos caninos normais, relacionando os aspectos epigenéticos e variáveis clínico-patológicas com o prognóstico dos pacientes, nos pareceu ainda mais importante.

Na caracterização epidemiológica do estudo em tela foi observado que a idade média dos animais foi de 8.8 anos e Rottweiler foi a raça com maior prevalência, seguida dos animais sem raça definida (SRD), Schnauzer, Pitbull, Labrador e Poodle, sendo a maioria fêmeas. Esses resultados, comparados com os da literatura, são parcialmente condizentes, pois embora os linfomas possam afetar cães de qualquer idade, a maior frequência oscila entre 6 e 9 anos. Entretanto, há variação entre as raças e gênero mais predispostos, sendo nos EUA e Europa o Boxer, Mastiff, Basset Hound, São Bernardo, Pitbull, Rottweiler, Scottish Terrier e Bulldog, sem aparente predileção sexual [43,58]. Essas variações podem ser entendidas pelo número de animais avaliados e as próprias diferenças entre os países e cidades onde os estudos foram desenvolvidos.

Alguns fatores clínicos podem interferir no prognóstico de cães com a apresentação nodal do linfoma, como estágio e subestágio da doença [59]. A correlação dessas variáveis mostrou que animais em subestágio b apresentaram TLD e TS consideravelmente menores, mostrando que a manifestação de sinais clínicos sistêmicos interfere na sobrevivência dos animais. Esses resultados são conhecidos e concordantes com o observado por Marconato et al. (2015) [60], mesmo sob tratamento quimioterápico.

A correlação entre a expressão de Ki67 e o prognóstico de cães com linfoma ainda é discutida [43]. Kiupel et al. (1999) [61] concluíram que a expressão de Ki67 não é

fator prognóstico para cães com linfoma multicêntrico de alto grau, corroborando nossos resultados, em que alta (>35%) ou baixa (<35%) expressão de Ki67 não influenciou no TLD e TS dos animais. Além disso, não houve correlação entre a expressão de Ki67 e as histonas acetiladas e enzimas HDAC, no tecido neoplásico. No entanto, outro estudo demonstrou relação entre a expressão de Ki67 e menor tempo de sobrevida em cães com LDGCB [62], porém, os autores realizaram a contagem de células positivas utilizando gradícula [63] ao invés de porcentagem.

Índice mitótico (IM) foi o aspecto histopatológico avaliado no GL e os resultados desse estudo mostraram que os animais com IM > 26 (mediana) apresentaram tempo de sobrevida menor, corroborando com Valli et al. (2013) [64], o qual relatou evidente redução da sobrevida de cães com linfoma e IM > 21. Entretanto, para alguns pesquisadores, a utilização deste como fator prognóstico no LDGCB canino ainda não está bem estabelecido [61,62].

Western blot e imuno-histoquímica são técnicas de eleição para detectar a acetilação das histonas e outras proteínas envolvidas nos mecanismos epigenéticos, como as enzimas [65] e foram úteis para confirmarem a reatividade dos anticorpos testados no tecido linfóide canino. O padrão imuno-histoquímico também confirmou a marcação nuclear de H3K9Ac, H4K12Ac, HDAC1 e HDAC2, assim como a predominante marcação citoplasmática de HDAC6 nos tecidos avaliados, o que está de acordo a caracterização dessas proteínas [66,67] e avaliação prévia no tecido humano com o mesmo subtipo de linfoma [31].

Os resultados mostraram maior expressão de HDAC2 no tecido neoplásico, em comparação aos linfonodos normais, o que já havia sido demonstrado em outras neoplasias hematopoiéticas humanas [68], sendo inclusive, uma enzima altamente expressa em células linfóides [35]. Em humanos, alguns estudos também identificaram a alta expressão de HDAC2 no LDGCB [31,69,70], sugerindo que essa enzima interfira na patogênese desse subtipo tumoral [70], uma vez que está envolvida no silenciamento de genes supressores tumorais como *P21*, *P27*, *P53*, *P57*, *BAX* e *BCL2* [69,71-73]. Adicionalmente, foi identificado, em camundongos, que essa enzima promove a iniciação e progressão tumorais, impactando na proliferação e apoptose celulares em linfomas do tipo B [74].

A relação entre a expressão de HDAC2 e o prognóstico do LDGCB, em humanos, é controverso [31,70]. No presente estudo, os resultados não mostraram diferença significativa entre o escore de marcação dessa enzima e o prognóstico da doença, em cães, mas vale ressaltar que os animais que apresentaram maior expressão de HDAC2 (escore > 10,5) apresentaram menores TLD e TS, o que poderia indicar o possível envolvimento dessa enzima na agressividade da doença.

Em humanos, a HDAC1 também é implicada no desenvolvimento neoplásico, inclusive no LDGCB [69,74] e, por pertencer à mesma classe de HDAC2 (Classe I), seria esperado que ambas apresentassem comportamentos semelhantes. Todavia, os resultados desse estudo mostram que o comportamento dessas enzimas são independentes e, além disso, podem exercer funções distintas [31,75], como observado no estudo de Marquard et al. (2009) [31], no qual houve expressão aumentada de HDAC1 no linfoma T-periférico, em comparação com o LDGCB, em humanos. Em outro estudo do nosso grupo de pesquisa houve alta expressão de HDAC1 em amostras de linfoma cutâneo de células T de cães, em comparação à pele normal [53]. Em nosso estudo, o escore de marcação dessa enzima não diferiu entre os tecidos neoplásico e normal, além da sua expressão ser proporcionalmente menor do que as outras enzimas. Comparando os resultados dos dois estudos em cães, pode-se inferir que os mecanismos epigenéticos envolvidos podem estar relacionados ao tipo celular que origine o linfoma.

A correlação de HDAC1 com o prognóstico de pacientes humanos com LDGCB apresenta resultados variáveis, podendo indicar a evolução desfavorável da doença, por meio do silenciamento de genes supressores tumorais [69], ou não exercendo influência na sobrevivência dos pacientes [31]. Em cães, o estudo em tela demonstrou que HDAC1 não interferiu no prognóstico dos animais, mas quando os dados são analisados isoladamente, a alta expressão da enzima (escore >2) está relacionada com TLD consideravelmente menor (HDAC1>2 = 10 semanas; HDAC1<2 = 35 semanas), além de TS diminuída dos cães doentes. A avaliação da expressão de HDAC1 e HDAC2 em um grupo maior de animais, comparando diferentes tipos de linfoma poderiam auxiliar na melhor elucidação desses resultados.

HDAC6 é uma enzima pertencente à Classe IIb, tendo sua expressão aumentada quando relacionada ao prognóstico favorável de pacientes humanos diagnosticados

com LDGCB [31,76]. Nossos resultados corroboram com esses autores, uma vez que, mesmo não havendo diferença entre os grupos, os animais doentes com maior escore de marcação de HDAC6 (> 62,5%) tiveram maior TLD e TS. Ademais, os resultados mostraram relação inversa entre IM e HDAC6, ou seja, quanto maior a proliferação das células neoplásicas, menor foi a expressão da enzima histona desacetilase.

No carcinoma hepatocelular de humanos foi reportado que a HDAC6 apresenta efeito anti-angiogênico, já que interfere na expressão dos genes *HIF-1 α* e *VEGFA*, envolvidos no processo de angiogênese [77]. Apesar do seu exato papel em outros tipos neoplásicos, incluindo o linfoma, ainda ser pouco definido [78], nossos resultados sugerem que a menor expressão de HDAC6 possa interferir na maior progressão e gravidade do LDGCB, em cães, o que poderia ser reforçado pela tendência de comportamento oposto dessa enzima, em relação à HDAC1, e a possibilidade da maior expressão desta estar envolvida no pior prognóstico dos animais doentes.

Nas amostras de LDGCB de cães, seria esperada uma menor acetilação das histonas H3K9 e H4K12 em decorrência do aumento da HDAC2, aspectos que tornariam a cromatina de DNA mais condensada e levaria à repressão da transcrição gênica [79]. No entanto, as expressões de H3 e H4 acetiladas não diferiram entre os grupos controle e linfoma. Esses resultados podem estar relacionados a alguns fatores, como o comportamento independente de HDAC2, em relação às histonas e outras enzimas; as expressões de HDAC1 e HDAC6 não estarem acentuadamente aumentadas no tecido neoplásico, fato que poderia contribuir para uma menor desacetilação das histonas, similar ao reportado no estudo de Brusa et al. (2006) [80], no qual o grau de acetilação de H4 foi influenciado pela perda de função de HDAC1, em pacientes humanos com leucemia mieloide crônica.

Além disso, sabe-se que enzimas desacetilases pertencentes à Classe III também podem interferir na acetilação da cauda terminal lisina-9 de H3 (H3K9) [81], porém as expressões de outras HDAC não foram caracterizadas nesse estudo.

Vale ressaltar que as HDAC não promovem apenas a desacetilação de histonas, mas proteínas não-histonas também são reguladas. Consequentemente, os efeitos epigenéticos na expressão gênica podem ser atribuídos a outros mecanismos moleculares, além da acetilação das histonas [82]. Todos esses aspectos poderiam justificar H3 e H4 não sofrerem hipoacetilação, mesmo com o aumento de HDAC 2.

Considerando o mecanismo de ação das HDAC, Beyer et al. (2017) [83] relacionam a desacetilação das histonas com o pior prognóstico da doença neoplásica. Em cães com carcinoma urotelial, Eto et al. (2019) [56] confirmaram que a menor acetilação de H3K9 diminuiu significativamente o TLD (da cirurgia até a recidiva), além de terem observado uma tendência ao menor TS dos animais. No linfoma cutâneo de células T canino também houve correlação entre menor acetilação de H3K9 e menor tempo de sobrevivência dos animais [53]. Comparativamente, o fato de que a redução global da acetilação das histonas está correlacionada com a proliferação e sobrevivência de linfócitos B e T [68], e que nossos resultados não demonstraram hipoacetilação de H3 e H4 no LDGCB, a expressão dessas histonas não interferiu no TLD e TS. Esses resultados corroboram, em parte, com os de Marquard et al. (2009) [31], que também não observaram correlação entre acetilação de H4 e o prognóstico dos pacientes humanos com o mesmo subtipo de linfoma.

Uma das terapias epigenéticas mais promissoras no tratamento do câncer são os inibidores de HDAC (iHDAC), que aumentam a acetilação das histonas e outras proteínas, resultando na interrupção do ciclo e diferenciação celulares atípicos [23,84]. Esse mecanismo de ação levou à suposição de que a expressão de HDAC1 e a acetilação de H4 são importantes fatores preditivos para a resposta a essa classe terapêutica, de forma que pacientes com menores taxas de acetilação de H4 seriam mais sensíveis ao tratamento, pois células com histonas hiperacetiladas, inicialmente, poderiam não responder aos iHDAC [31,85]. Os resultados do estudo em tela demonstraram que o tecido linfóide neoplásico não exibiu aumento significativo de HDAC1 e hipoacetilação de H4, o que poderia sinalizar a efetividade dos iHDAC nas células do LDGCB, em cães.

Por outro lado, um estudo que elucidou os mecanismos de ação de diferentes inibidores de HDAC em cultivos celulares de linfoma B canino (CLBL-1), demonstrou que os fármacos, principalmente o panobinostat, um potente iHDAC, induziu a hiperacetilação de H3, resultando em efeitos citotóxicos e alto potencial antiproliferativo das células neoplásicas, validando sua eficácia [86]. Isso demonstra que a expressão de HDAC1 e a acetilação de H4 não são os únicos fatores preditivos e que diferentes mecanismos epigenéticos, muitos ainda desconhecidos, seriam

capazes de influenciar na resposta terapêutica aos iHDAC nos diferentes tipos neoplásicos e devem motivar mais estudos.

Outro ponto de discussão importante sobre o uso de iHDAC no LDGCB em cães, refere-se à seletividade de ação desses fármacos, já que a maioria dos inibidores aprovados pela US Food and Drug Administration (FDA) são não seletivos e atuam sobre diversas classes de HDAC [39]. Os resultados desse estudo podem indicar que a eficácia antineoplásica dos iHDAC não depende da inibição de todos os tipos de HDAC, corroborando com resultados encontrados em estudo com células neoplásicas hepáticas, no qual o uso de um inibidor seletivo exibiu atividade antitumoral, o que poderia ser aplicado a outros tipos de câncer, provavelmente causando menor toxicidade e efeitos adversos [87]. Além dos nossos resultados mostrarem maior expressão de HDAC2 no LDGCB e sua potencial influência no pior prognóstico dos animais, sugere-se que HDAC6 possa interferir de forma benéfica no prognóstico da doença, indicando, novamente, que o uso de iHDAC seletivos possam ter melhor eficácia nesse tipo neoplásico.

Em humanos, sugere-se que a resposta terapêutica de pacientes com linfomas B utilizando iHDAC requer o estabelecimento de protocolos baseados em biomarcadores prognósticos e perfil de HDAC, sendo a utilização de inibidores de HDAC - classe I mais apropriada em linfomas B do que inibidores de classe II ou não seletivos [78]. Estudos com o tucidinostat, um iHDAC-classe I, corroboram com essas afirmações, por meio da identificação do efeito supressor tumoral desse fármaco em cultivos celulares de LDGCB e demonstração de resultados clínicos terapêuticos promissores em pacientes humanos [9,88].

Os resultados desse estudo mostram a maior expressão da enzima HDAC2 no LDGCB em cães e sugerem sua possível associação com o pior prognóstico dos pacientes, confirmando existirem mecanismos epigenéticos relacionados às modificações das histonas na patogênese desse tumor, na espécie canina. Também nesse estudo validamos a reatividade dos anticorpos anti-histonas acetiladas H3, H4 e revalidamos a reatividade das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6, em tecido linfóide canino. Esses resultados encorajam o desenvolvimento de outros estudos que identifiquem alterações adicionais relacionadas às histonas e

enzimas histonas desacetilases no LDGCB, possibilitando o melhor entendimento da patogênese tumoral e a identificação de potenciais alvos terapêuticos.

Métodos

Comitê de ética. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP-Jaboticabal (FCAV/Unesp) (protocolo nº 007973/18) e o material foi coletado mediante autorização dos tutores e assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido.

Seleção de amostras. Foi realizado um estudo retrospectivo com a seleção de amostras de linfonodos neoplásicos de 20 cães (20 amostras em parafina, sendo destas, 13 amostras também sob congelação a -196°C), provenientes de pacientes do Serviço de Oncologia (SOV) da FCAV/UNESP, atendidos entre os anos de 2009 e 2015. Os critérios de inclusão dos casos neste estudo foram a confirmação do diagnóstico de LDGCB por meio das análises histopatológica e imuno-histoquímica, de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde [64]; e as amostras serem coletadas antes de os cães serem submetidos ao tratamento quimioterápico e/ou corticoterapia. Após a confirmação do diagnóstico, os pacientes iniciaram o tratamento preconizado [43].

Protocolarmente, no momento do atendimento, todos os animais do grupo linfoma (GL) foram submetidos ao estadiamento tumoral (Estágios I-V), mediante exame físico detalhado, exames laboratoriais, punção de medula óssea e exames de imagem (radiografia torácica e ultrassonografia abdominal), e classificados nos subestágios “a” e “b”, de acordo com a ausência ou presença de sinais clínicos, respectivamente. Os dados patológicos referentes à proliferação celular neoplásica foram avaliados nas amostras, por meio da expressão imuno-histoquímica de Ki67 e índice mitótico (IM), este último determinado a partir da contabilização das figuras de mitose presentes em 10 campos de grande aumento (400x), em amostras coradas por Hematoxilina-eosina, como descrito anteriormente [89]. As variáveis epigenéticas e patológicas foram correlacionadas entre si e com a avaliação prognóstica do GL, incluindo tempo livre de doença (TLD) e tempo de sobrevivência (TS).

O grupo controle (GC) foi composto por amostras de linfonodos poplíteos normais provenientes de 5 cães hípidos submetidos a procedimentos cirúrgicos eletivos, como orquiectomia/ovariohisterectomia.

O material coletado foi, em parte, fixado em formalina tamponada a 10% (pH 7,6) por um período de 24 a 48 horas e, em seguida, armazenado em álcool 70% até o momento do processamento histotécnico para inclusão em parafina e preparação das lâminas para posterior análise imuno-histoquímica. Outra parte das amostras de linfonodos normais foram mantidas em nitrogênio líquido (-196°C) para posterior análise de *Western blot*.

Western blot. A técnica de *Western blot* (WB) foi conduzida no Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo, Pirassununga – São Paulo.

Para esta análise foram empregadas as amostras dos grupos controle e linfoma, as quais foram armazenadas sob congelamento (-196°C). Os tecidos foram homogeneizados a 4°C em tampão RIPA (pH 7,4), contendo Tris HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, 1% NP-40, desoxicolato de sódio a 0,5%, SDS a 0,1% e coquetel inibidor de protease (# P8310 - Sigma). O homogenato foi centrifugado a 14000g a 4°C durante 20 min. A concentração de proteína do sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford usando albumina bovina (BSA) como padrão. O sobrenadante foi misturado com tampão da amostra (2x Laemmli Sample Buffer, BioRad) e a mistura foi fervida e submetida à análise de SDS-PAGE a 10% em géis de poliacrilamida. A seguir, as proteínas foram transferidas do gel para as membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com albumina a 5% por 4 h e incubadas durante a noite a 4°C com os anticorpos primários anti-acetil Histona H3 [Ac-Lys9] (1:1000, anti-camundongo, Sigma-Aldrich®), anti-acetil Histona H4 [Ac-Lys12] (1:1000, anti-coelho, Sigma-Aldrich®), anti-HDAC1 (1:1000, anti-coelho, Sigma-Aldrich®), anti-HDAC2 (1:2000, anti-camundongo, Sigma-Aldrich®) e anti-HDAC6 (1:3000, anti-coelho, Sigma-Aldrich®). GAPDH (1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA) e β -actina (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) foram utilizados como controle de carregamento. A seguir, foi adicionado o anticorpo secundário conjugado com peroxidase e visualizado, empregando-se os

reagentes ECL. A documentação do gel e a quantificação do sinal foram identificadas empregando-se o Bio-Image Analysis do sistema Molecular Imager ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA). Os resultados foram normalizados usando GAPDH e β -actina para H3Ac, HDAC6 e H4Ac, HDAC1, HDAC2, respectivamente.

Imuno-histoquímica. A técnica foi realizada no Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, UNESP, Jaboticabal – São Paulo a partir das amostras de linfonodos caninos normais (GC; n=5) e neoplásicos (GL; n=20) incluídos em blocos de parafina. Os blocos parafinados contendo as amostras foram cortados na espessura de 3 μ m e estendidos em lâminas de vidro silanizadas, as quais foram utilizadas nas reações imuno-histoquímicas para avaliação da expressão das histonas acetiladas H3 lisina 9 (H3K9Ac) e H4 lisina 12 (H4K12Ac) e das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6.

A padronização da técnica foi conduzida em cortes histológicos de amostras de linfonodos caninos (controles positivos). Como controle negativo os anticorpos primários foram substituídos por diluente de anticorpos.

No momento da reação, as lâminas foram mantidas em estufa a 67°C por 24 horas e desparafinizadas em duas imersões sequenciais (10 minutos cada) em Xilol, à temperatura ambiente, seguida da reidratação das amostras em imersões sequenciais (5 minutos cada) em álcool com concentrações decrescentes (100%, 96% e 70%) e banho em água corrente (10 minutos).

A recuperação antigênica pelo calor foi conseguida utilizando-se Retrieval Solution pH 6 (Leica®) a 10% para H3, H4, HDAC2 e HDAC6, e Retrieval Solution pH 9 (Leica®) a 10% para HDAC1. Para a imunomarcção de HDAC1, as lâminas foram colocadas com a solução em micro-ondas por 3 ciclos de 5 minutos cada, na potência máxima e temperatura padrão do aparelho, de forma que ao fim de cada ciclo, a cubeta de vidro contendo as lâminas era completada com água destilada. Para as demais imunomarcções, as lâminas foram submetidas a 3 ciclos de 4 minutos no micro-ondas, sendo a cubeta completada com a solução Retrieval pH 6 a 10% ao final de cada ciclo.

Após a recuperação antigênica, seguiu-se o resfriamento das lâminas em temperatura ambiente até atingir 37°C para H3, H4, HDAC2 e HDAC6. O processo de

detecção dos anticorpos foi realizada por meio da utilização de sistema de detecção de polímero (Novolink Polymer DS, Leica Byosystems®). O bloqueio da peroxidase endógena foi obtido pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 30% em metanol (30 minutos), em local protegido da luz, seguido de duas lavagens (5 minutos cada) em TBS (Tris-Buffered-Saline – TBS, pH 7,6) e incubação com Peroxidase Block (Novolink), em câmara úmida e escura (30 minutos). Especificamente para as reações de HDAC 1, após a recuperação antigênica, as lâminas foram mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente e o bloqueio da peroxidase endógena foi feito em solução de peróxido de hidrogênio a 10% em metanol por 20 minutos, seguida de lavagem em TBS e incubação com Peroxidase Block, como já descrito.

Finalizada a etapa de bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram lavadas duas vezes em TBS, durante 5 minutos cada e incubadas com Protein Block (Novolink) por 30 minutos. Seguiu-se a incubação com os anticorpos primários anti-acetil Histona H3 [Ac-Lys9] (1:100, anti-camundongo, Sigma-Aldrich®), anti-acetil Histona H4 [Ac-Lys12] (1:500, anti-coelho, Sigma-Aldrich®), anti-HDAC1 (1:75, anti-coelho, Sigma-Aldrich®), anti-HDAC2 (1:500, anti-camundongo, Sigma-Aldrich®) e anti-HDAC6 (1:500, anti-coelho, Sigma-Aldrich®) (Tabela 4).

Após 2 horas de incubação à temperatura de 22°C, as lâminas foram lavadas duas vezes em TBS (5 minutos cada), incubadas com o anticorpo secundário Post Primary – Anti-rabbit IgG (Novolink), lavadas novamente em TBS por 2 vezes (5 minutos) e incubadas com Polymer- Anti-rabbit Poly-HRP-IgG (Novolink), durante 30 minutos.

A seguir, as lâminas foram novamente lavadas em tampão TBS e a reação revelada pelo cromógeno DAB (Diaminobenzidina - Novolink™Leica®), por aproximadamente 4 minutos, seguida da lavagem das lâminas em água corrente (10 minutos) para interrupção da reação.

Por fim, foi realizada a contra coloração com hematoxilina de Harris (6 banhos), seguida da lavagem em água corrente por 10 minutos. A desidratação foi realizada pela imersão rápida e sequencial das lâminas em concentrações crescentes de álcoois, seguida de uma solução álcool-xilol (1:1) e xilol (2 vezes). Por fim, foi realizada a montagem das lâminas com lamínula e secagem para posterior avaliação.

A reação imuno-histoquímica para avaliação da expressão do marcador de proliferação celular Ki67 (clone MIB-1, Dako; 1:100) nas amostras do GL foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Matiz et al., 2018 [62].

Avaliação das imunomarcações. A confirmação da expressão nuclear de H3K9Ac, H4K12Ac, HDAC1 e HDAC2 foi por meio da visibilização de tonalidades do marrom difusas nos núcleos das células das amostras que compuseram os grupos experimentais (GC e GL) e semelhantes às expressões observadas nos controles positivos. Para a avaliação das imunomarcações nucleares, foi obtido um escore de marcação baseado em dois parâmetros: número de células tumorais positivas e intensidade da imunorreatividade [26]. Para isso, cinco campos aleatórios de cada lâmina foram fotografados em magnificação de 40 vezes, usando o microscópio Novel (BM2100) acoplado à câmera Bioptika (CMOS-HD) e realizada a contagem manual de 100 células por campo utilizando a ferramenta "Contador de células" do programa Image J software (v. 1.44p.), com posterior extração da média aritmética desses valores. O campo de células foi ranqueado por porcentagem de células positivas (negativo= 0; 1-25%=1; 26-50% =2; 51-75% =3; 76-100% =4) e pela intensidade de marcação, que foi avaliada de forma cega por dois observadores (negativo=0; fraca=1; moderada= 2 e intensa =3). Por fim, os dois ranques (porcentagem e intensidade de marcação) foram multiplicados e o escore de marcação obtido foi utilizado para as análises estatísticas entre os grupos.

Em razão da imunomarcação citoplasmática do anticorpo HDAC6 e impossibilidade de contar as células separadamente, a expressão positiva foi caracterizada pelo aparecimento de tonalidades de marrom no citoplasma das células, considerando-se a área marcada. A porcentagem total de área positiva para HDAC6 foi calculada obtendo-se imagens com amplificação de 40 vezes de cinco campos aleatórios, da mesma forma que para os demais anticorpos e conforme descrito anteriormente [90]. Primeiro, a área celular total foi determinada e medida para cada imagem e as áreas não celulares foram excluídas pela seleção manual. Depois disso, uma área positiva foi selecionada manualmente e limiarizada para destacar apenas as células positivas. A área selecionada foi medida e o resultado foi dividido pela área celular total dessa

imagem e multiplicada por 100. Assim, uma porcentagem foi calculada para cada amostra e a porcentagem final foi estimada a partir da média das cinco imagens.

A análise das imunomarcações pelo Ki67 foi realizada em cada amostra do GL a partir da seleção de cinco campos com magnificação de 40 vezes e apresentando maiores proporções de células com marcação nuclear positiva, sendo essas áreas fotografadas pelo mesmo método descrito anteriormente. Em cada campo, foram manualmente contabilizadas 200 células, totalizando 1000 células por amostra, das quais foi obtida a porcentagem de células positivas [61].

Análise estatística. Para a comparação da expressão imuno-histoquímica das histonas acetiladas (H3K9Ac e H4K12Ac) e das enzimas histonas desacetilases (HDAC1, HDAC2 e HDAC6), entre os grupos controle (GC) e linfoma (GL) foram utilizados o teste de Wilcoxon para os dados não paramétricos e o teste T para os paramétricos.

Para a análise multivariada de correspondência, foram categorizados os valores das histonas, HDAC, Ki67 e índice mitótico (IM) em alta expressão ($>$) e baixa expressão (\leq), em relação à mediana de cada variável. As variáveis categóricas (estágios clínicos 3 e 4; subestágios a e b) foram classificadas em presente (1) ou ausente (0). Para determinar a correlação linear entre as variáveis, foi utilizado o teste de Pearson ou de Spearman, de acordo com a distribuição dos dados (paramétrica ou não paramétrica).

As curvas de sobrevida foram determinadas pelo método de Kaplan-Meier para o tempo livre de doença (TLD) e tempo de sobrevida (TS), comparadas pelo teste de Long-rank. O TLD considerou o total de semanas entre a remissão completa e a recidiva do linfoma, enquanto o TS compreendeu o total de semanas entre o diagnóstico e o óbito ou último registro de acompanhamento do paciente, no hospital.

Para determinar o comportamento e associação das histonas e enzimas desacetilases no GL, foram utilizadas técnicas de análise multivariadas.

Primeiramente foi realizada a análise de componentes principais com o intuito de obter a interação das histonas e enzimas. O número de componentes principais determinados correspondeu aos dois primeiros autovalores (F1, F2).

Em seguida foi realizada a análise exploratória de fatores para identificar os processos que explicariam esta interação. Foram considerados os três primeiros autovalores (F1 a F3) maiores que uma unidade, segundo o critério de Kaiser. As variáveis que apresentavam cargas absolutas maiores a 0,5 foram consideradas como relevantes. Foi utilizada a rotação de fatores pelo método Varimax.

Para a análise estatística foram utilizados os programas R, SPSS e Statistica, adotando um nível de significância de 5%.

Referências

1. Hassler, M., Schiefer, A.I. & Egger, G. Combating the epigenome: epigenetic drugs against non-Hodgkin's lymphoma. *Epigenomics* **5**, 397–415, DOI: <https://doi.org/10.2217/epi.13.39> (2013).
2. Baylin, S.B. & Jones, P.A. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, a019505 (2016).
3. Tang, W. Y. & Ho, S.M. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **8**, 173-82 (2007).
4. Jirtle, R. L. & Skinner, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 253-262, DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg2045> (2007).
5. Costa, E.B.O. & Pacheco, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. *Semin., Ciênc. Biol. Saúde* **34**, 125-136, DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2013v34n2p125> (2013).
6. Marks, P.A., Richon, V.M. & Rifkind, R.A. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1210–1216 (2000).
7. Kisseberth, W.C., Murahari, S., London, C.A., Kulp, S.K. & Chen, C.S. Evaluation of the effects of histone deacetylase inhibitors on cells from canine cancer cell lines. *Am. J. Vet. Res.* **69**, 938-945 (2008).
8. Croce, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 704–714 (2009).

9. Zhang, P. & Zhang, M. Epigenetic alterations and advancement of treatment in peripheral T-cell lymphoma. *Clin. Epigenetics* **12**, 1-17, DOI: <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00962-x> (2020).
10. Peterson, C.L. & Laniel, M.A. Histones and histones modifications. *Curr. Biol.* **14**, 546-51 (2004).
11. Martins, M.D. & Castilho, R.M. Histones: controlling tumor signaling circuitry. *J. Carcinog. Mutagen.* **1**, 1-12 (2013).
12. Howell, P. M. Jr *et al.* Epigenetics in human melanoma. *Cancer Control* **16**, 200-218, DOI: <https://doi.org/10.1093/jmcb/mju027> (2009).
13. Elmallah, M. I. & Micheau, O. Epigenetic regulation of TRAIL signaling: implication for cancer therapy. *Cancers* **11**, 850 (2019).
14. Song, S.H., Han, S.W. & Bang, Y.J. Epigenetic-Based Therapies in Cancer—Progress to Date. *Drugs* **71**, 2391–2403 (2011).
15. Thiagalingam, S. *et al.* Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann. NY Acad. Sci.* **983**, 84-100 (2003).
16. Lawrence, M., Daujat, S. & Schneider, R. Lateral thinking: how histone modifications regulate gene expression. *Trends Genet.* **32**, 42-56 (2016).
17. D’Alessio, A.C. & Szyf, M. Epigenetic tête-à tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem. Cell Biol.* **84**, 463-76 (2006).
18. Moss, T. J. & Wallrath, L. L. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. *Mutat. Res.* **618**, 163-174 (2007).
19. Bhattacharya, S.K., Ramchandani, S., Cervoni, N. & Szyf, M. A mammalian protein with specific demethylase activity form CpG DNA. *Nature* **397**, 579–583 (1999).
20. Ausió, J., Levin, D. B., DE Amorim, G. V., Bakker, S. & Macleod, P. M. Syndromes of disordered chromatin remodeling. *Clin. Genet.* **64**, 83-95, DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2003.00124.x> (2003).
21. Chang, H.H. *et al.* Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients. *Oral. Oncol.* **45**, 610–614 (2009).
22. Kroesen, M. *et al.* HDAC inhibitors and immunotherapy; a double edged sword? *Oncotarget* **5**, 6558–6572 (2014).

23. Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M. & Hrabeta, J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1–25 (2017).
24. Fraga, M.F. *et al.* Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* **37**, 391–400 (2005).
25. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705 (2007)
26. Marquard, L. *et al.* Prognostic significance of the therapeutic targets histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in cutaneous T-cell lymphoma. *Histopathology* **53**, 267-277 (2008).
27. Weichert, W. HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett.* **280**, 168-176 (2009).
28. Jones, P.A., Issa, J.P.J. & Baylin, S. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 630-641, DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.93> (2016).
29. Pfister, S.X. & Ashworth, A. Marked for death: targeting epigenetic changes in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 241-263 (2017).
30. Pasyukova, E. G., Symonenko, A. V., Rybina, O. Y., & Vaiserman, A. M. Epigenetic Enzymes: A Role in Aging and Prospects for Pharmacological Targeting. *Ageing Res. Rev.* **67**, 101312 (2021).
31. Marquard, L. *et al.* Histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in B-and T-cell lymphomas. *Histopathology* **54**, 688-698 (2009).
32. Zain, J. Role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of lymphomas and multiple myeloma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **26**, 671–704 (2012).
33. Cycon, K.A., Mulvaney, K., Rimsza, L.M., Persky, D. & Murphy, S.P. Histone deacetylase inhibitors activate CIITA and MHC class II antigen expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Immunology* **140**, 259–272 (2013).
34. Sermer, D., Pasqualucci, L., Wendel, H.G., Melnick, A. & Younes, A. Emerging epigenetic- modulating therapies in lymphoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **16**, 494–507 (2019).
35. Ribeiro, M. L., Reyes-Garau, D., Armengol, M., Fernández-Serrano, M., & Roué, G. Recent advances in the targeting of epigenetic regulators in B-cell non-Hodgkin

- lymphoma. *Front. Genet.* **10**, 986, DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00986> (2019).
36. Huang, Y. H. *et al.* CREBBP/EP300 mutations promoted tumor progression in diffuse large B-cell lymphoma through altering tumor-associated macrophage polarization via FBXW7-NOTCH-CCL2/CSF1 axis. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 1-14 (2021).
 37. Turner, B.M. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**, 836-845, 2000.
 38. Ferrareso, S. *et al.* Epigenetic Silencing of TFPI-2 in Canine Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Plos One* **9**, e92707, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092707> (2014).
 39. Xavier, P. L. P., Müller, S., & Fukumasu, H. Epigenetic Mechanisms in Canine Cancer. *Front. Oncol.* **10**, 2353, DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.591843> (2020).
 40. Parachini-Winter, C. *et al.* Prospective evaluation of the lymph node proteome in dogs with multicentric lymphoma supplemented with sulforaphane. *J. Vet. Intern. Med.* **34**, 2036-2047, DOI: <https://doi.org/10.1111/jvim.15898> (2020).
 41. Vail, D.M. Tumors of the haemopoietic system. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* 3th edn (2011).
 42. Aresu, L. Canine Lymphoma, More Than a Morphological Diagnosis: What We Have Learned about Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Front Vet Sci.* **3**, 77 (2016).
 43. Vail, D.M, Pinkerton, M. & Young, K.M. Hematopoietic tumors. In *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology* 6th edn (2019).
 44. Hull, E.E., Montgomery, M.R. & Leyva, K.J. HDAC Inhibitors as Epigenetic Regulators of the Immune System: Impacts on Cancer Therapy and Inflammatory Diseases. *Biomed. Res. Int.* **2016**, 8797206 (2016).
 45. Biswas, S. & Rao, C.M. Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *Eur. J. Pharmacol.* **837**, 8–24 (2018).
 46. Yasui, W. *et al.* Histone acetylation and gastrointestinal carcinogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **983**, 220–231 (2003).

47. Qin, J., Wen, B., Liang, Y., Yu, W. & Li, H. Histone modifications and their role in colorectal cancer. *Pathol. Oncol. Res.* **26**, 2023-2033 (2019).
48. Fu, W. *et al.* Mechanisms and importance of histone modification enzymes in targeted therapy for hepatobiliary cancers. *Discov. Med.* **28**, 17-28 (2019).
49. Xi, Y. *et al.* Histone modification profiling in breast cancer cell lines highlights commonalities and differences among subtypes. *BMC genomics* **19**, 1-11 (2018).
50. Vaidya, H., Rumph, C. & Katula, K. S. Inactivation of the WNT5A alternative promoter B is associated with DNA methylation and histone modification in osteosarcoma cell lines U2OS and SaOS-2. *Plos One* **11**, e0151392 (2016).
51. Epiphanio, T. M. F. *et al.* Global DNA methylation of peripheral blood leukocytes from dogs bearing multicentric non-Hodgkin lymphomas and healthy dogs: A comparative study. *Plos One* **14**, e0211898 (2019).
52. Senhorello, I. L. S. Avaliação do padrão de acetilação das histonas H3 e H4 e expressão das enzimas HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em tumores mamários de cadelas. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal (2020).
53. Matiz, O. R. S. Evaluation of acetylated histones 3 and 4 and histone deacetylases 1, 2 and 6 in cutaneous T-cell lymphoma in dogs. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal (2019).
54. Liu, D. *et al.* Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. *Cancer Res.* **74**, 5045–5056 (2014).
55. Sena, B. V. Imunomarcção das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em sarcomas de tecidos moles em cães (2019).
56. Eto, S. *et al.* Anti-tumor effects of the histone deacetylase inhibitor vorinostat on canine urothelial carcinoma cells. *Plos One* **14**, e0218282, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218382> (2019).
57. Pan, H. *et al.* Epigenomic evolution in diffuse large B-cell lymphomas. *Nat. Commun.* **6**, 6921 (2015).
58. Ernst, T., Kessler, M., Lautscham, E. *et al.* Multicentric lymphoma in 411 dogs - an epidemiological study. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* **44**, 245–251 (2016).

59. Dobson, J.M., *et al.* Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J. Small Anim. Pract.* **42**, 377–384 (2001).
60. Marconato, L. *et al.* Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio as a useful prognostic factor in dogs with diffuse large B-cell lymphoma receiving chemoimmunotherapy. *Vet. J.* **206**, 226–230, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.07.009> (2015).
61. Kiupel, M., Teske, E. & Bostock, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet. Pathol.* **36**, 292–300 (1999).
62. Matiz, O. R. S. *et al.* Prognostic significance of Ki67 and its correlation with mitotic index in dogs with diffuse large B-cell lymphoma treated with 19-week CHOP-based protocol. *J. Vet. Diagn. Invest.* **30**, 263-267 (2018).
63. Webster, J.D. *et al.* Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with c-KIT and Its Role in Prognostication. *Vet. Pathol.* **44**, 298-308 (2007).
64. Valli, V.E. *et al.* Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet. Pathol.* **50**, 738–748 (2013).
65. Zhang, K. *et al.* Differentiation between peptides containing acetylated or trimethylated lysines by mass spectrometry: An application for determining lysine 9 acetylation and methylation of histone H3. *Proteomics* **4**, 1-10 (2004).
66. Johnstone, R.W. Histone-deacetylase inhibitors : novel drugs for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Drug Discovery* **1**, 287–299 (2002).
67. Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F., & Yao, T.P. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455–458 (2002).
68. Haery, L., Thompson, R. C., & Gilmore, T. D. Histone acetyltransferases and histone deacetylases in B-and T-cell development, physiology and malignancy. *Genes Cancer* **6**, 184-213 (2015).
69. Min, S. K. *et al.* Expression of HAT1 and HDAC1, 2, 3 in diffuse large B-cell lymphomas, peripheral T-cell lymphomas, and NK/T-cell lymphomas. *Korean J. Pathol.* **46**, 142-150 (2012).

70. Lee, S. H. *et al.* Expression of histone deacetylases in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical significance. *Int. J. Med. Sci.* **11**, 994-1000 (2014).
71. Yamaguchi, T. *et al.* Histone deacetylases 1 and 2 act in concert to promote the G1-to-S progression. *Genes Dev.* **24**, 455–469 (2010).
72. Zupkovitz, G. *et al.* The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is a crucial target for histone deacetylase 1 as a regulator of cellular proliferation. *Mol. Cell Biol.* **30**, 1171–1181 (2010).
73. Jung, K. *et al.* HDAC2 overexpression confers oncogenic potential to human lung cancer cells by deregulating expression of apoptosis and cell cycle proteins. *J. Cell Biochem.* **113**, 2167-2177 (2012).
74. Pillonel, V. *et al.* Histone deacetylase 1 plays a predominant pro-oncogenic role in Eμ-myc driven B cell lymphoma. *Sci. Rep.* **6**, 1-13 (2016).
75. Chen, Y. *et al.* Histone deacetylase (HDAC) inhibition improves myocardial function and prevents cardiac remodeling in diabetic mice. *Cardiovasc. Diabetol.* **14**, 99 (2015).
76. Lin, X. *et al.* Increased histone deacetylase 6 expression serves as a favorable prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma. *OncoTargets Ther* **10**, 5129-5136 (2017).
77. Lv, Z. *et al.* Downregulation of HDAC6 promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma cells and predicts poor prognosis in liver transplantation patients. *Mol. Carcinog.* **55**, 1024–1033 (2015).
78. Wang, M., Fang, X. & Wang, X. Emerging role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **61**, 763-775 (2020).
79. Marmorstein, R. Structure of histone deacetylases: insights into substrate recognition and catalysis. *Structure* **9**, 1127–1133 (2001).
80. Brusa, G. *et al.* P210 Bcr-abl tyrosine kinase interaction with histone deacetylase 1 modifies histone H4 acetylation and chromatin structure of chronic myeloid leukaemia haematopoietic progenitors. *Br. J. Haematol.* **132**, 359–369 (2006).
81. Pruitt, K. *et al.* Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *Plos Genet.* **2**, e40 (2006).

82. Da Ros, S. *et al.* Validation of epigenetic mechanisms regulating gene expression in canine B-cell lymphoma: An in vitro and in vivo approach. *Plos One* **13**, e0208709, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208709> (2018).
83. Beyer, S. *et al.* Histone H3 acetyl K9 and histone H3 trimethyl K4 as prognostic markers for patients with cervical cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 477 (2017).
84. Li, Y. & Seto, E. HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026831 (2016).
85. Pelicci, G. P. *et al.* U.S. Patent No. 7,858,329. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office (2010).
86. Dias, J. N. *et al.* The histone deacetylase inhibitor panobinostat is a potent antitumor agent in canine diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* **9**, 28586 (2018).
87. Liao, B., Sun, Q., Yuan, Y., Yin, Y., Qiao, J., & Jiang, P. Histone deacetylase inhibitor MGCD0103 causes cell cycle arrest, apoptosis, and autophagy in liver cancer cells. *J. Cancer* **11**, 1915-1926 (2020).
88. Zhang, H. *et al.* Chidamide induces apoptosis in DLBCL cells by suppressing the HDACs/STAT3/Bcl-2 pathway. *Mol. Med. Rep.* **23**, 1-9, DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.11947> (2021).
89. Romansik, E.M. *et al.* Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.* **44**, 335–341 (2007).
90. Withers, S.S. *et al.* Association of macrophage and lymphocyte infiltration with outcome in canine osteosarcoma. *Vet. Comp. Oncol.* **17**, 49– 60 (2019).

Agradecimentos

Os autores agradecem aos médicos veterinários do Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal, SP e aos responsáveis pelo Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2016/00128-5 e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), processo número 88882.330352/2019-01.

Contribuição dos autores

Delineamento experimental, I.C.C., I.L.S.S., O.S.M., G.V.H., L.A.A e M.T.C.; coleta de amostras, I.C.C. e L.A.A.; análises experimentais, I.C.C., I.L.S.S., O.S.M., C.M.P.Z. e F.V.M.; análise e interpretação dos dados, I.C.C., R.A.N.A. e M.T.C.; escrita e revisão do manuscrito, I.C.C., R.L.A., A.B.D.N., M.T.C. Todos os autores aprovaram a versão submetida.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Informações adicionais

Correspondência e requisição de materiais devem ser solicitados a I.C.C.

Variável		N (animais)	%	Média (intervalo)
Raça	Rottweiler	4	20	
	SRD	3	15	
	Schnauzer	2	10	
	Pitbull	2	10	
	Labrador	2	10	
	Poodle	2	10	
	Dachshund	1	5	
	Basset Hound	1	5	
	Pastor Alemão	1	5	
	Boxer	1	5	
	Fox Terrier	1	5	
Idade				8,8 (5-14)
Estágio	III	4	20	
	IV	16	80	
Subestágio	A	12	60	
	B	8	40	
Ki67	<35%	10	50	
	>35%	10	50	
Índice mitótico	< 26	8	40	
	> 26	12	60	

SRD – sem raça definida; Índice mitótico e Ki67 equivalem à mediana; Estágio III: envolvimento generalizado dos linfonodos; Estágio IV: envolvimento hepático e/ou esplênico.

Tabela 1. Variáveis clínico-patológicas referentes aos cães diagnosticados com linfoma difuso de grandes células B.

Proteína	Grupo Controle	Grupo Linfoma	P
H3K9Ac	6 [4-6]	6 [2,5-9]	0,783
H4K12Ac	6 [4-9]	8 [6-12]	0,170
HDAC1	1 [1-2]	2 [1,75-6]	0,098
HDAC2	6 [4-9]	10,5 [8-12]	0,031
HDAC6	54,53 [51,42-56,41]	62,26 [55,39-71,95]	0,067

Mediana [Amplitude interquartil-IQR]; diferença significativa: P<0,05.

Tabela 2. Resultado da análise univariada (teste de Wilcoxon) de comparação da expressão imuno-histoquímica das histonas acetiladas e enzimas histonas desacetilases entre os grupos experimentais.

Variável	TLD (semanas)	P	TS (semanas)	P
H3K9Ac				
>6	16	0,473	8	0,294
<6	13		19	
H4K12Ac				
>8	10	0,861	10	0,886
<8	35		21	
HDAC1				
>2	10	0,292	14	0,803
<2	35		21	
HDAC2				
>10,5	12	0,726	15	0,999
<10,5	16		19	
HDAC6 (%)				
>62,26	35	0,801	19	0,886
<62,26	12		15	
Ki67 (%)				
>35	13	0,263	15	0,609
<35	35		48	
Índice mitótico				
>26	13	0,144	15	0,037
<26	42		52	
Estágio				
III	10	0,635	10	0,213
IV	16		19	
Subestágio				
A	42	0,033	48	0,021
B	13		4	

Tabela 3. Análise multivariada das variáveis epigenéticas e clínico-patológicas das amostras de LDGCB e sua correlação com o tempo livre de doença (TLD) e tempo de sobrevivência (TS) dos cães.

Anticorpo*	Clone	Origem	Tipo	Diluição	Recuperação Antigênica**
Anti-acetyl-Histone H3 (Ac-Lys ⁹)	AH3-120	Camundongo	Monoclonal	1:100	Retrieval solution (pH 6,0)
Anti-acetyl-Histone H4 (Ac-Lys ¹²)	SAB4200353	Coelho	Policlonal	1:500	Retrieval solution (pH 6,0)
Anti-HDAC1	AV38530	Coelho	Policlonal	1:75	Retrieval solution (pH 9,0)
Anti-Histone Deacetylase 2	HDAC2-62	Camundongo	Monoclonal	1:500	Retrieval solution (pH 6,0)
Anti-HDAC6	AV31451	Coelho	Policlonal	1:500	Retrieval solution (pH 6,0)

* Sigma-Aldrich; todos os anticorpos foram incubados por duas horas à temperatura de 22°C.

** Leica®

Tabela 4. Anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica para pesquisa da expressão de histonas e histonas desacetilases, em amostras de linfonodo normal e LDGCB de cães.

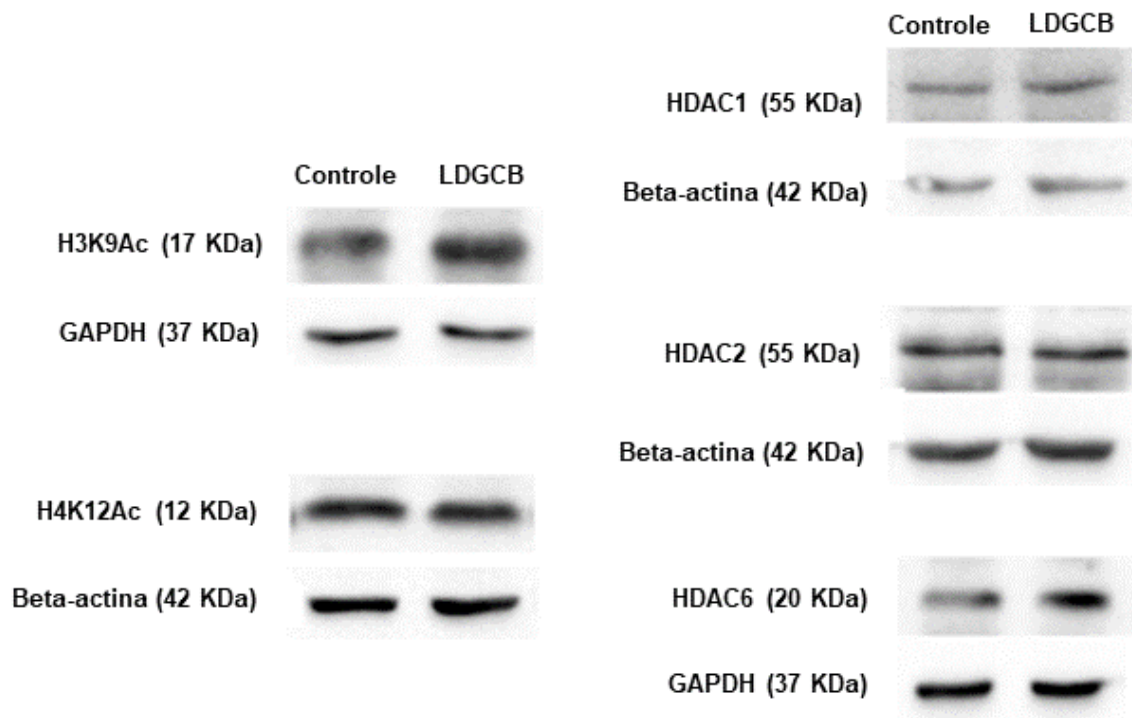


Figura 1. Validação da expressão proteica das histonas acetiladas (H3K9Ac e H4K12Ac) e enzimas desacetilases (HDAC1, HDAC2 e HDAC6) em linfonodo canino normal (controle) e neoplásico (LDGCB), pela técnica de *Western blot*.

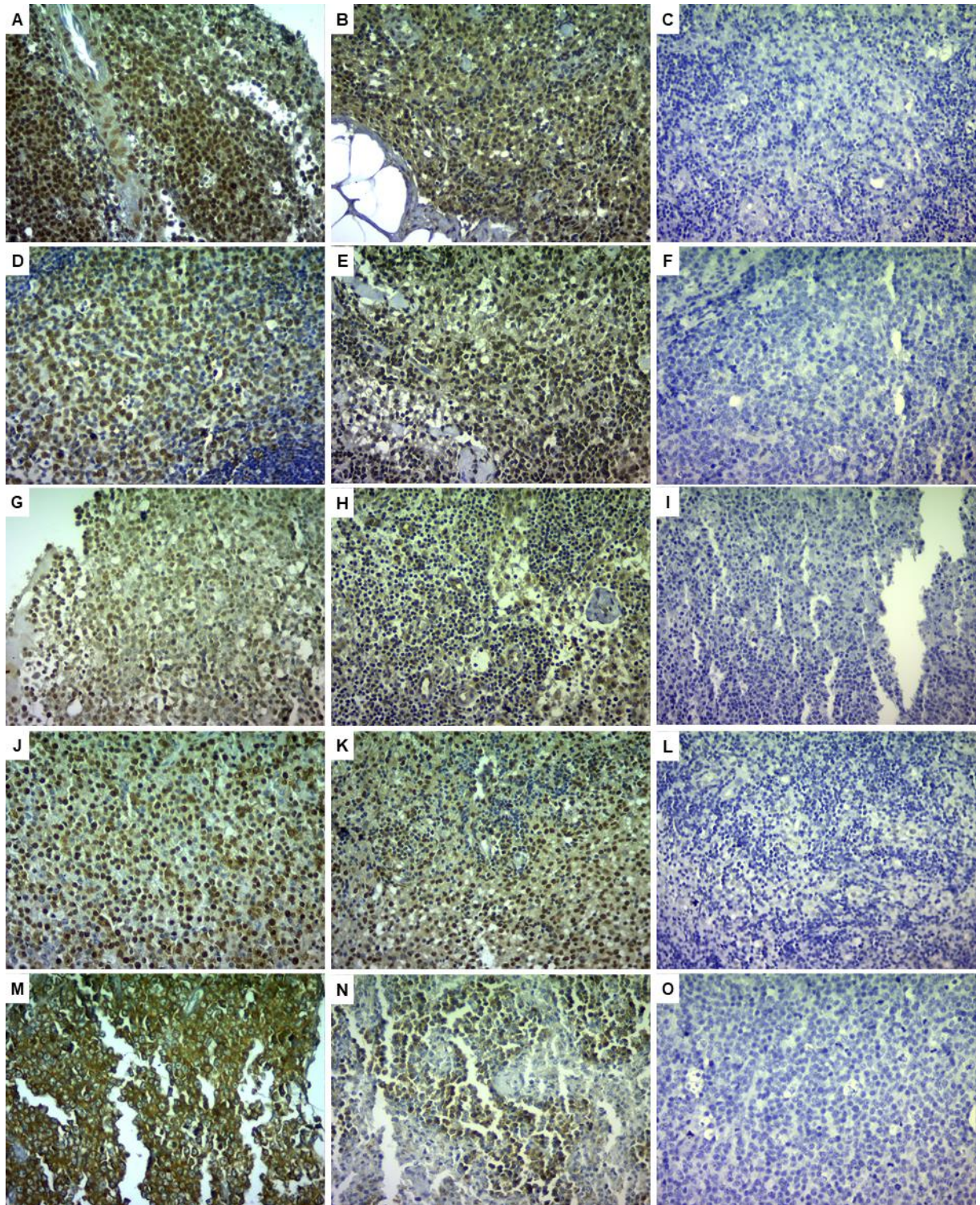


Figura 2. Fotomicrografia mostrando a reatividade das histonas acetiladas e histonas desacetilases em linfonodo neoplásico canino (LDGCB; esquerda) e linfonodo normal canino (controles positivos no centro e controles negativos à direita). Imunomarcção de H3K9Ac (a; b; c), H4K12Ac (d; e; f), HDAC1 (g; h; i), HDAC2 (j; k; l) e HDAC6 (m; n; o). Reação imuno-histoquímica, x40.

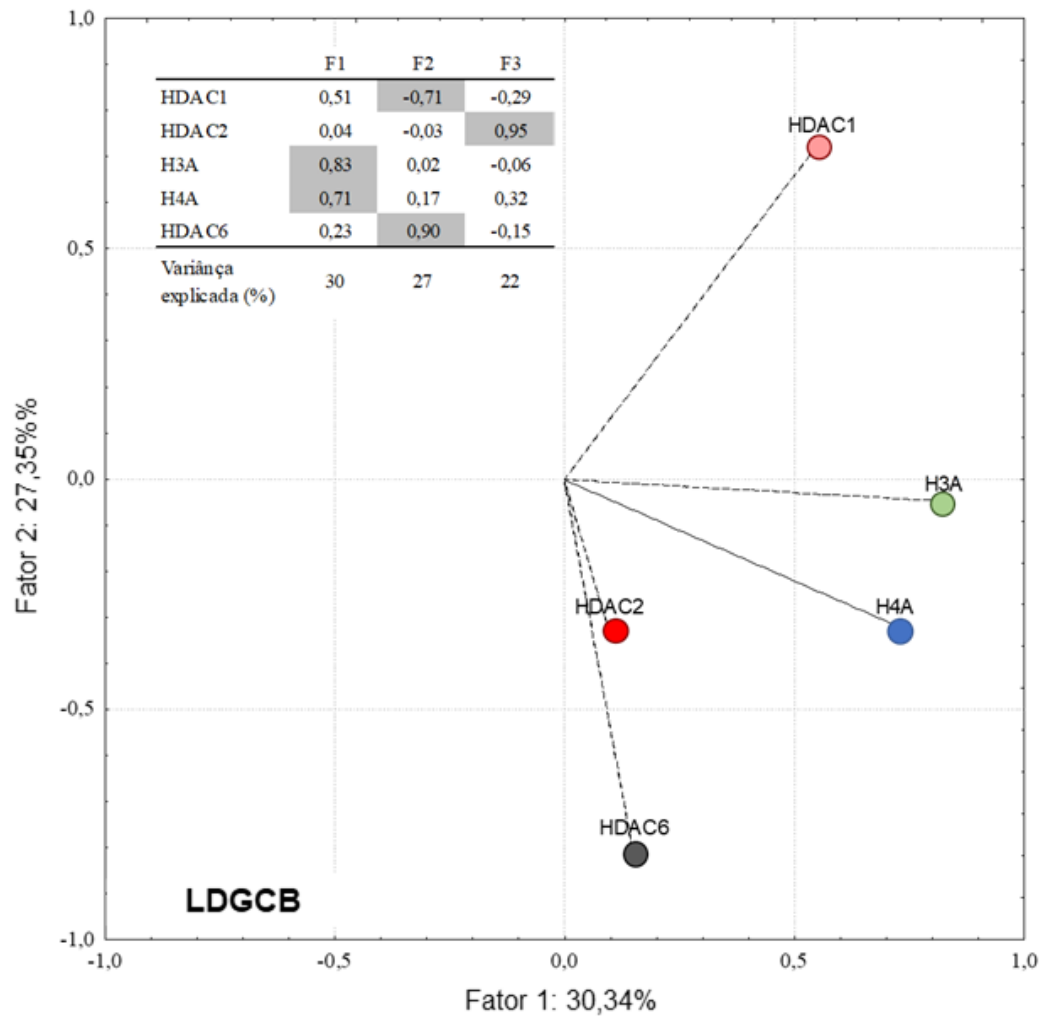


Figura 3. Comportamento e distribuição da expressão das histonas acetiladas (H3K9, H4K12) e enzimas histonas desacetilases (HDAC1, HDAC2 e HDAC6) em amostras de LDGCB canino, por meio da análise multivariada de componentes principais. A tabela superior esquerda ilustra a análise exploratória de fatores, indicando a correlação positiva entre H3K9Ac e H4K12Ac (F1), a correlação oposta entre HDAC1 e HDAC6 (F2) e o comportamento independente de HDAC2 (F3).

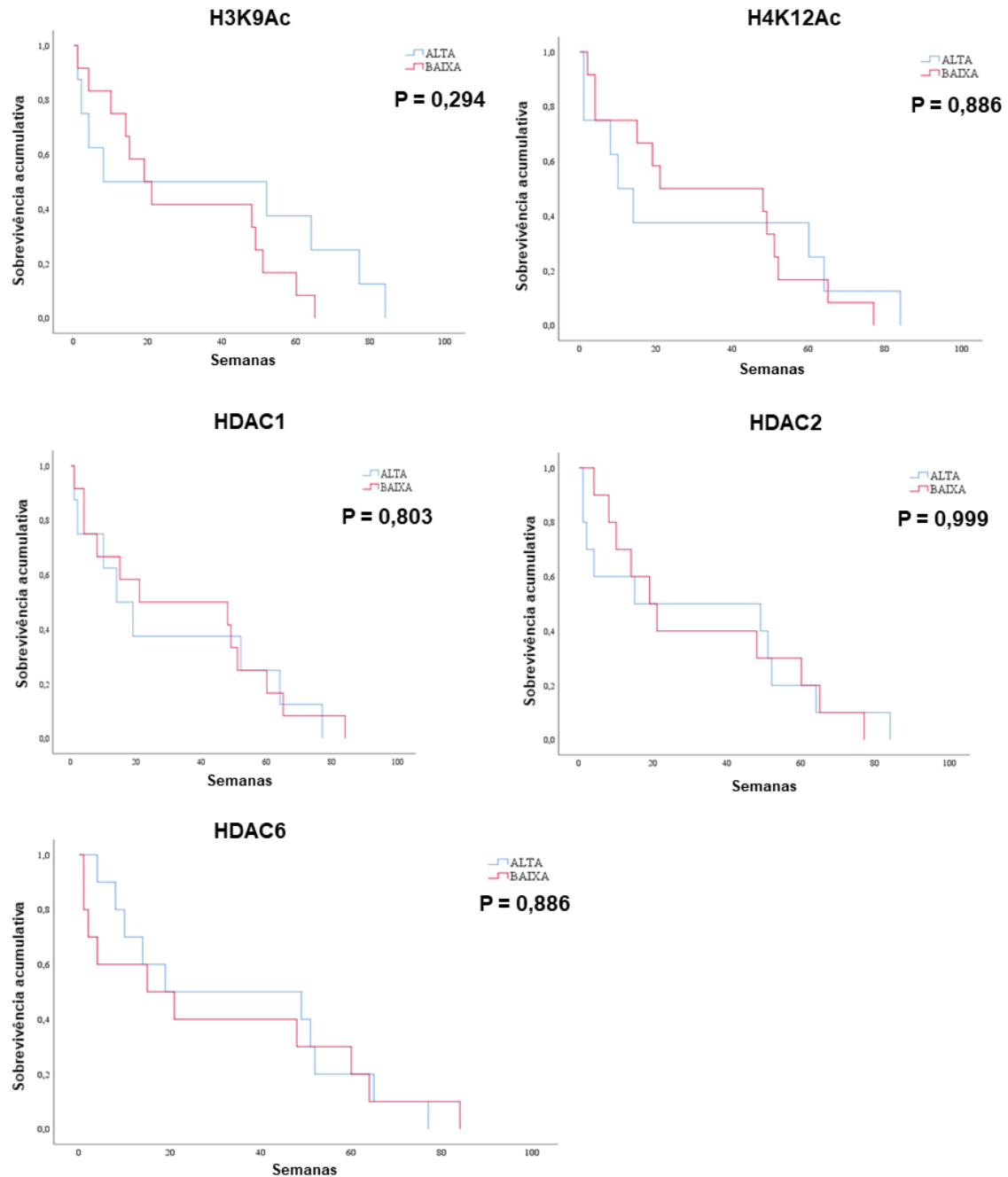


Figura 4. Expressão das histonas acetiladas H3, H4 e enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em relação ao tempo de sobrevida (semanas) dos cães com LDGCB. As curvas de sobrevida foram determinadas pelo método de Kaplan-Meier e as variáveis comparadas pelo teste de Long-rank.

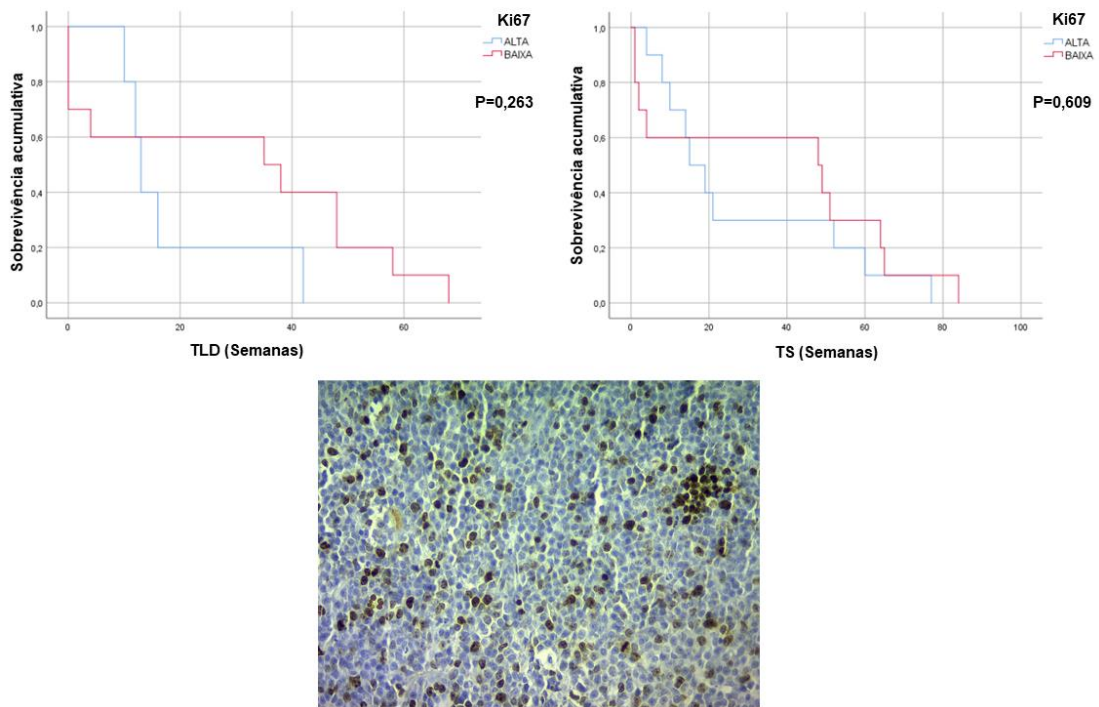


Figura 5. Relação entre a alta (>35%) ou baixa (<35%) expressão de Ki67 e fatores prognósticos (TLD e TS) do LDGCB, em cães. As curvas de sobrevida foram determinadas pelo método de Kaplan-Meier e as variáveis comparadas pelo teste de Long-rank (acima). Representação da marcação nuclear de Ki67 em amostra de LDGCB canino. Reação imuno-histoquímica, x40.

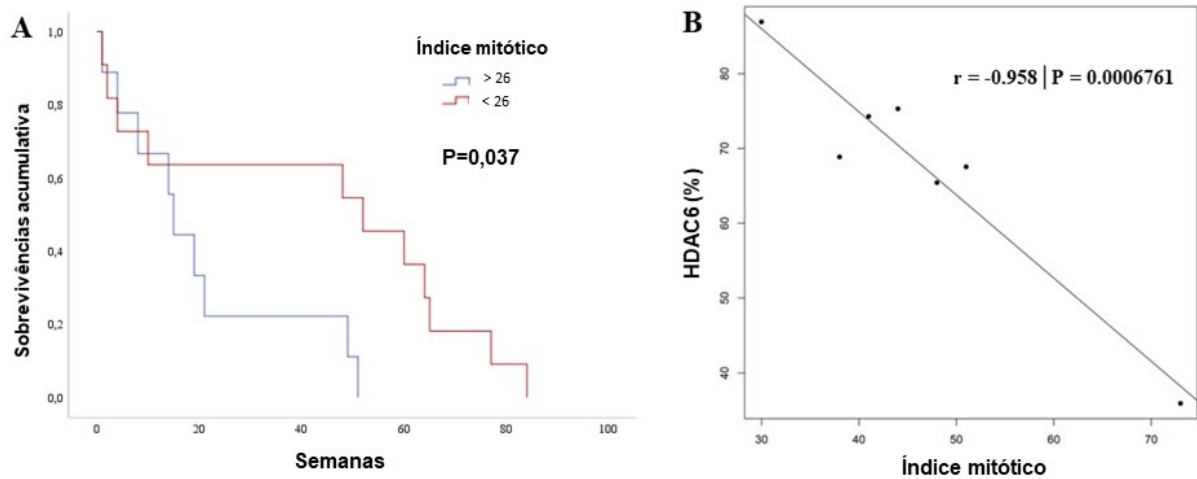


Figura 6. (A) Índice mitótico em relação ao tempo de sobrevida (semanas) dos cães com LDGCB. Curva de sobrevida determinada pelo método de Kaplan-Meier e as variáveis comparadas pelo teste de Long-rank ($P = 0,037$). (B) Análise multivariada e regressão linear inversa entre a expressão da enzima desacetilase HDAC6 e o índice mitótico (IM) > 26 ($P = 0,0006761$).

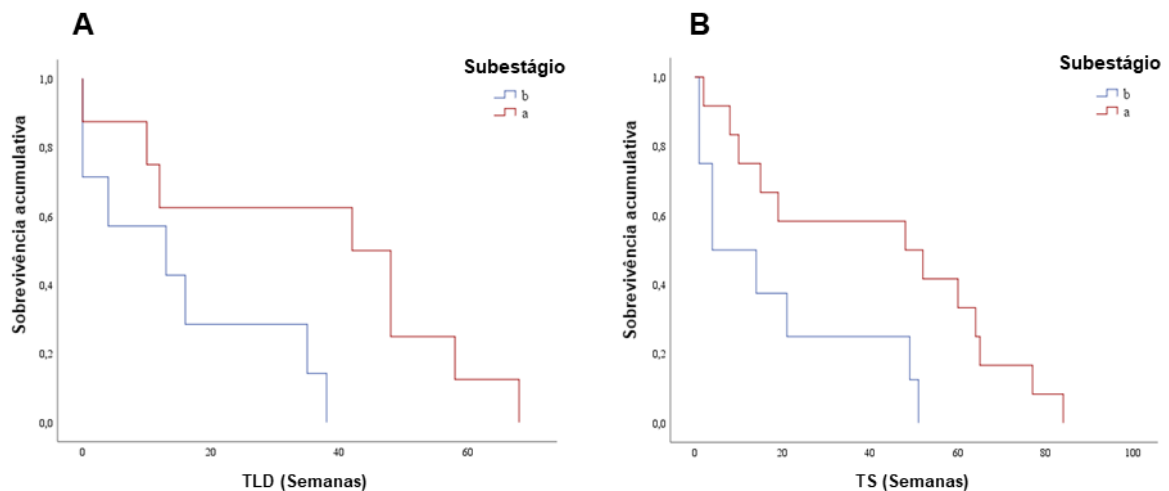


Figura 7. Ausência (a) ou presença (b) de sinais clínicos em relação ao tempo livre de doença (A) e tempo de sobrevida (B) dos cães com LDGCB. Curvas determinadas pelo método de Kaplan-Meier e variáveis comparadas pelo teste de Long-rank.

APÊNDICE A – Dados individuais referentes aos animais do Grupo Linfoma.

Animal	Idade (anos)	Raça	Sexo	Estágio	Subestágio	TLD (semanas)	Sobrevida (semanas)	Índice Mitótico	Ki67 (%)
1	5	Rottweiler	Fêmea	3	B		21	32	52,7
2	7	SRD	Macho	4	A	48	64	0	20,5
3	5	Schnauzer	Macho	4	A	68	84	14	6,9
4		Basset Hound	Fêmea	4	B	0	1	10	30,6
5	7	Pastor Alemão	Macho	3	A	48	48	18	26,9
6	8	Rottweiler	Fêmea	4	A		60		41,5
7	9	Pitbull	Fêmea	4	A	12	15	51	40,2
8	12	Labrador	Fêmea	4	B	0	1	48	25,8
9	14	Poodle	Fêmea	4	A	0	2	3	0
10	6	Basset Hound	Fêmea	4	B	16	4	44	41,8
11	9	Rottweiler	Fêmea	3	B	4	4	10	0
12	7	Schnauzer	Macho	4	A	0	8	38	39,3
13	11	Poodle	Fêmea	4	B	38	49	30	0,4
14	13	Pitbull	Fêmea	4	A		77	3	61,3
15	7	Fox Terrier	Fêmea	4	B	13	14	41	53,4
16	13	SRD	Macho	4	A	42	52	4	55,5
17	13	Boxer	Fêmea	4	A		19	73	65,7
18	11	Rottweiler	Fêmea	4	B	35	51	34	26,2
19	5	SRD	Macho	4	A	58	65	13	0
20	5	Labrador	Macho	3	A	10	10	23	55,7