

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 08/11/2022.

**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<sup>a</sup> 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.

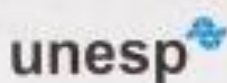


## SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA .....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT .....	v
LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
<b>CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....</b>	<b>1</b>
1. Revisão de literatura .....	1
1.1 Introdução .....	1
1.2 Epigenética.....	2
1.3 Terapias epigenéticas .....	10
1.4 Referências bibliográficas .....	15
<b>CAPÍTULO 2 - Avaliação da acetilação das histonas H3 e H4 e expressão das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 no linfoma multicêntrico canino .....</b>	<b>29</b>
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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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.

*Fabiana Pilarski*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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.

## 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. & Laine, M.A. Histones and histone 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* 3<sup>th</sup> 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* 6<sup>th</sup> 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. Imunomarcacão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em sarcomas de tecidos moles em cões (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.