RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 23/04/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE ACETILAÇÃO DAS HISTONAS H3 E H4 E EXPRESSÃO DAS ENZIMAS HDAC1, HDAC2 E HDAC6 EM TUMORES MAMÁRIOS DE CADELAS

Igor Luiz Salardani Senhorello

Médico Veterinário

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE ACETILAÇÃO DAS HISTONAS H3 E H4 E EXPRESSÃO DAS ENZIMAS HDAC1, HDAC2 E HDAC6 EM TUMORES MAMÁRIOS DE CADELAS

Igor Luiz Salardani Senhorello

Orientadora: Profª. Drª. Mirela Tinucci Costa

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica.

2020

S476a

Senhorello, Igor Luiz Salardani
Avaliação do padrão de acetilação das histonas H3 e H4 e expressão das enzimas HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em tumores mamários de cadelas / Igor Luiz Salardani Senhorello. -- Jaboticabal, 2020
78 p. : il., tabs.

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

1. Epigenética. 2. Canino. 3. Hipoacetilação. 4. Neoplasmas mamários. 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.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE ACETILAÇÃO DAS HISTONAS H3 E H4 E EXPRESSÃO DAS ENZIMAS HDAC1, HDAC2 E HDAC6 EM TUMORES MAMÁRIOS DE CADELAS

AUTOR: IGOR LUIZ SALARDANI SENHORELLO
ORIENTADORA: MIRELA TINUCCI COSTA

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

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

Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA (Participaçao Virtual)
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

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

Prof. Dr. PAULO CÉSAR JARK (Participaçao Virtual)
UNICASTELO / Descalvado/SP

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

Jaboticabal, 23 de outubro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Igor Luiz Salardani Senhorello- nasceu em Venda Nova do Imigrante-ES no ano de 1989. Iniciou os estudos na Escola Estadual de Ensino Fundamental e Médio “Sirena Rezende Fonseca” concluindo o ensino fundamental no ano de 2004. Em 2005 iniciou o ensino médio e profissionalizante em técnico em agropecuária na Escola Agrotécnica Federal de Alegre-ES, concluindo em 2007, e no ano seguinte ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Durante a graduação foi aluno de iniciação científica e monitor de diversas disciplinas, concluindo a graduação em 2012. Cumpriu a Residência em Clínica Médica de Pequenos Animais pelo Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária e Saúde Pública na Universidade Estadual Paulista- UNESP Campus de Jaboticabal de 2013 a 2015, participando durante o período da Associação dos Médicos Veterinários da UNESP-Jaboticabal como tesoureiro no ano de 2013. Realizou mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na área de Clínica Médica Veterinária pela FCAV/UNESP Campus de Jaboticabal de 2015 a 2017, sob orientação da Profª. Drª Mirela Tinucci Costa e coorientação da Profª Drª Erika Maria Terra. Em 2017 ingressou no Programa de doutorado pela mesma instituição, sob a mesma orientação. Desde o início da pós-graduação participou voluntariamente do atendimento no Serviço de Oncologia Veterinária no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” na FCAV/UNESP até o momento que ingressou como docente na Universidade Brasil no Campus de Fernandópolis, no segundo semestre de 2019. Atualmente é Professor Assistente na Universidade de Vila Velha/ES.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me permitiu chegar até aqui.

À minha família (pai, mãe e irmão) meu porto seguro, minha confiança em seguir em frente, sem vocês caminhar não seria possível e também a grande família Salardani.

À minha namorada Camila Goloni, por estar ao meu lado em todos os momentos, me dando forças quando o desânimo aparecia. Você é muito importante para mim.

À minha orientadora Professora Drª. Mirela Tinucci-Costa, que desde o começo da minha trajetória na UNESP-Jaboticabal foi sempre uma mãe, me dando apoio em todas as situações. Obrigado infinitamente por toda orientação, carinho e confiança.

A todos os amigos que conquistei em Jaboticabal em especial a família HV por toda parceria, ajuda e motivação para conclusão dessa etapa.

Ao meu grupo de pesquisa e grandes amigos Isabela Canavari, Oscar Sierra e Giovanni Vargas, vocês fazem parte dessa conquista e cada momento que compartilhamos dentro do laboratório foram decisivos obtenção desse título.

Aos meus grandes amigos da República a esclarecer e República Antro do HV vocês fazem parte da minha família.

Ao Serviço de Oncologia e ao de Obstetrícia do Hospital Veterinário e ao Laboratório de Patologia Veterinária da UNESP-Jaboticabal, sem o apoio de vocês nada disso seria possível.

Ao Dr. Roberto Ampuero pelo apoio incondicional para realização das análises estatísticas de trabalho, não medindo esforços para que tudo fosse feito da melhor maneira possível.

À UNESP-Jaboticabal pela oportunidade oferecida.

Ao Laboratório VetPat pela parceria realizada nesse e em outros trabalhos.

À USP-Pirassununga pela parceria realizada nesse trabalho, em especial ao Prof. Dr. Flávio Meireles e a Pesquisadora Drª. Cibele Zinni.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2016 / 00128-5) pela concessão do auxílio regular a pesquisa.

Aos cães que participaram desse trabalho, espero poder retribuir de alguma maneira.

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

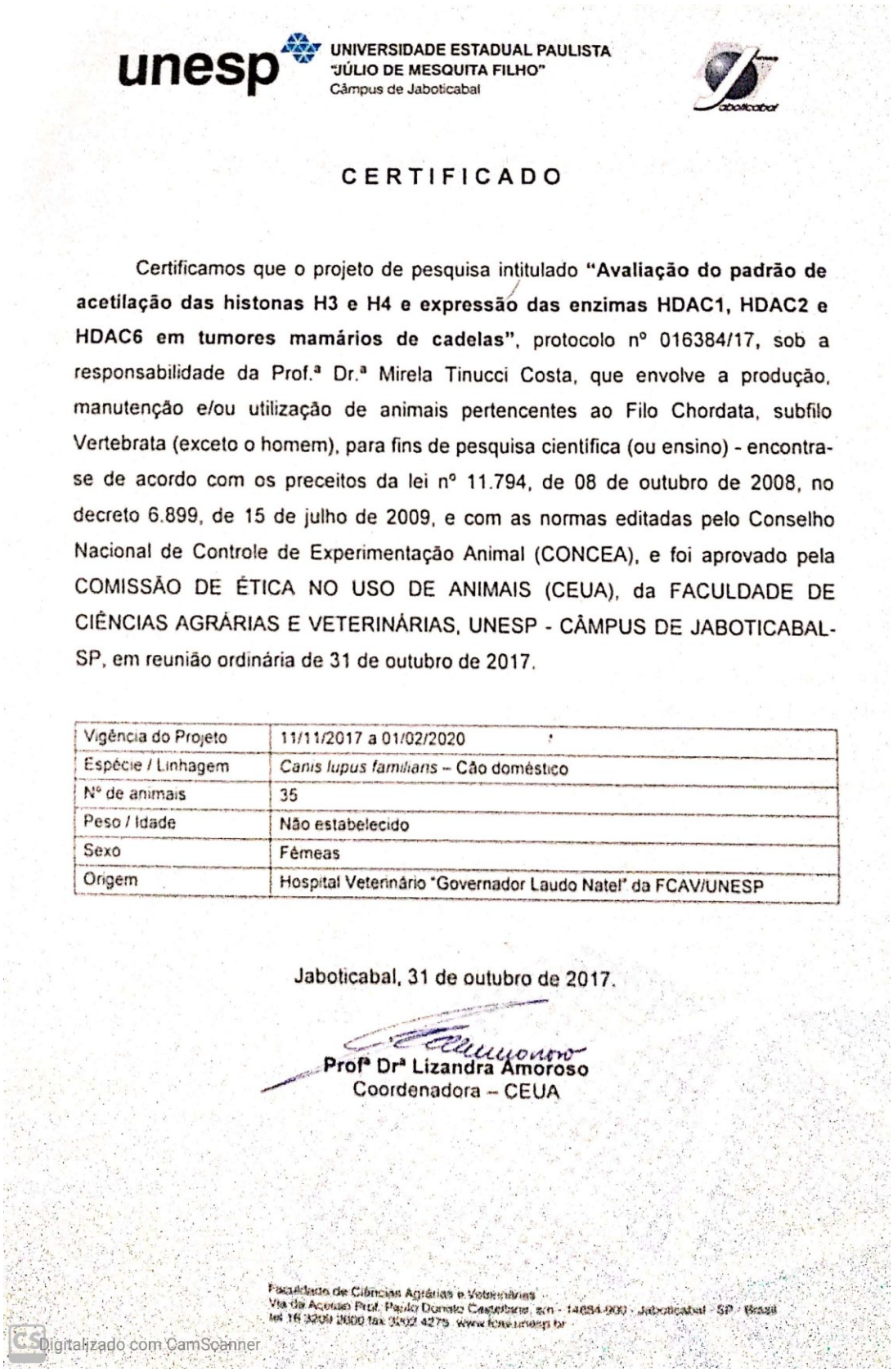
SUMÁRIO

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA iii
LISTA DE TABELAS vi
LISTA DE FIGURAS viii
CAPÍTULO 1- Considerações gerais 1
1.Revisão de literatura 1
1.1 Introdução 1
1.2 Fatores fisiológicos da epigenética 3
1.3 Epigenética e o câncer 10
1.4 Referências 15
CAPÍTULO 2 - Comparação da expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas desacetilases HDACs 1, 2 e 6 em tecidos mamários caninos neoplásicos e não neoplásicos 20
1. Resumo e palavras-chaves 20
2. Introdução 21
3. Material e métodos 23
3.1 Seleção dos pacientes e coleta das amostras 23
3.2 Validação dos anticorpos pela técnica de Western Blot 25
3.3 Reação imuno-histoquímica para histonas e enzimas desacetilases 26
3.4 Avaliação dos resultados das reações imuno-histoquímicas 28
3.5 Análise estatística 29
4. Resultados 30
4.1 Validação dos anticorpos pela técnica de Western Blot 31
4.2 Imunoexpressão das histonas acetiladas e isoenzimas desacetilases pela análise univariada 31
4.3 Imunoexpressão das histonas acetiladas e enzimas desacetilases pela análise multivariada 35
5. Discussão 40
6. Declaração de disponibilidade de dados 47
7. Declaração de conflito de interesses 47
8. Referências 48

Capítulo 3- Expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em carcinomas mamários simples de cadelas 52

1. Resumo e palavras-chaves 52
2. Introdução 53
3. Material e métodos 55
   3.1 Seleção dos pacientes e coleta das amostras 55
   3.2 Avaliação de parâmetros clínico-patológicos 56
   3.3 Validação dos anticorpos pela técnica de Western Blot 56
   3.4 Reação imuno-histoquímica 57
   3.5 Interpretação dos resultados da imuno-histoquímica 59
   3.6 Análise estatística 60
4. Resultados 60
   4.1 Validação dos anticorpos pela técnica de Western Blot 61
   4.2 Expressão imuno-histoquímica das histonas acetiladas e enzimas desacetilases e a correlação com as variáveis clínico-patológicas 62
   4. 3 Correlação entre histonas acetiladas e HDACs com o tempo de sobrevida 64
5. Discussão 69
6. Declaração de disponibilidade de dados 73
7. Declaração de conflito de interesses 73
8. Referências 73

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



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

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação do padrão de acetilação das histonas H3 e H4 e expressão das enzimas HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em tumores mamários de cadelas"**, protocolo nº 016384/17, 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 31 de outubro de 2017.

Vigência do Projeto	11/11/2017 a 01/02/2020
Espécie / Linhagem	*Canis lupus familiaris* – Cão doméstico
Nº de animais	35
Peso / Idade	Não estabelecido
Sexo	Fêmeas
Origem	Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/UNESP

Jaboticabal, 31 de outubro de 2017.

Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
tel 16 3209 7600 fax 3202 4275 www.fcav.unesp.br

Digitalizado com CamScanner

AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE ACETILAÇÃO DAS HISTONAS H3 E H4 E EXPRESSÃO DAS ENZIMAS HDAC1, HDAC2 E HDAC6 EM TUMORES MAMÁRIOS DE CADELAS

RESUMO- Modificações epigenéticas assumiram importância na patogênese do câncer a partir de pesquisas que mostraram que mudanças na expressão de proteínas associadas ao DNA podem afetar a expressão gênica e podem ser reversíveis após tratamento. As modificações nas histonas vêm sendo estudas em larga escala na medicina, particularmente no câncer de mama. O presente estudo será apresentado em três capítulos. No primeiro, descreveremos mecanismos epigenéticos e suas implicações no câncer, apontando estudos já realizados na medicina e na veterinária. No segundo capítulo serão apresentados os resultados da expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas desacetilases 1, 2 e 6 em tecidos mamários caninos tumorais e sadios, a fim de comparar possíveis alterações por expressão dessas proteínas. No terceiro capítulo serão apresentados os resultados da expressão apenas em carcinomas mamários simples de cadelas e sua associação com fatores prognósticos. A imuno-histoquímica foi empregada com o intuito de se pesquisar a expressão das proteínas e a validação dos anticorpos foi conseguida pela técnica de Western Blot em linfonodo canino. Os resultados de expressão imuno-histoquímica foram avaliados semiquantitativamente, levando-se em consideração a intensidade de marcação e a porcentagem de células marcadas. Para análise estatística univariada utilizaram-se os testes de Kruskal Wallis, qui-quadrado e o teste exato de Fischer com nível de significância de 5%. Para determinar o comportamento e associação das histonas e das enzimas HDACs dentro e entre os grupos foram utilizadas estatísticas multivariadas. Especificamente no capítulo dois, houve diferença na expressão das histonas acetiladas e enzimas desacetilases entre os grupos experimentais ($p<0,05$), com menor acetilação de H3 (H3K9Ac) em carcinomas mamários em relação ao tecido mamário normal, além disso, houve menor expressão de HDAC1 e HDCA2 em tecidos mamários neoplásicos em relação ao tecido normal ($p<0,05$). Em contrapartida, a HDAC6 foi mais expressa em tecidos mamários neoplásicos ($p<0,05$). Não houve diferença na expressão de H4 acetilada (H4K12Ac) entre os grupos ($p>0,05$). Pela análise multivariada houve associação positiva entre a expressão de HDAC1 e HDAC2 e associação negativa entre a expressão de H3K9Ac e HDAC6. No capítulo três foi observada associação entre a baixa expressão de HDAC1 e presença de metástase em linfonodos ($p=0,035$), e alta expressão de HDAC1 associou-se a fatores prognósticos favoráveis pela análise multivariada. Ainda pela análise multivariada a baixa expressão de HDAC6 apresentou relação com baixa expressão de Ki67 e com tumores de menor tamanho, apresentando relação com fatores de melhor prognóstico. A partir desse estudo foi possível observar alterações epigenéticas em tecidos neoplásicos mamários e que existe relação com fatores prognósticos. Além disso, a alta expressão de HDAC6 pode justificar a hipoacetilação de H3 observada em tecidos neoplásicos. Esses resultados abrem perspectivas futuras para novos estudos que confirmem essas alterações e estimulam o desenvolvimento de terapêuticas alvo no tratamento do câncer mamário em cadelas.

Palavras-chave: epigenética, canino, hipoacetilação, neoplasmas mamários

EVALUATION OF THE ACETYLATION PATTERN OF HISTONES H3 AND H4 AND EXPRESSION OF ENZYMES HDAC1, HDAC2 AND HDAC6 IN MAMMARY TUMORS OF BITCHES

ABSTRACT- Epigenetic changes have assumed importance in cancer pathogenesis from research that showed that changes in the expression of proteins associated with DNA can affect gene expression, however, these changes can be reversible after treatment. Histone changes have been studied on a large scale in medicine, particularly in breast cancer. The present study will be presented in three chapters, aiming to describe in the first chapter epigenetic mechanisms and their implications for cancer, pointing out studies already carried out in medicine and veterinary medicine. In the second chapter, the results of the expression of acetylated histones H3 and H4 and of the enzymes deacetylases 1, 2 and 6 in canine tumoral breast and healthy tissues will be presented, in order to compare possible alterations by expression of these proteins. In the third chapter, the results of expression will be presented only in simple mammary carcinomas of bitches and their association with prognostic factors. The tissues were subjected to immunohistochemistry for analysis of protein expression and the validation of antibodies was achieved by the Western Blot technique using canine lymph nodes. The results of immunohistochemical expression were evaluated semiquantitatively, taking into account the labeling intensity and the percentage of labeled cells. For univariate statistical analysis, Kruskal Wallis, chi-square and Fischer's exact tests were used with a 5% significance level and to determine the behavior and association of histones and HDAC enzymes within and between groups, multivariate statistics were used. Specifically in chapter two, there was a difference between the expression of acetylated histones and deacetylase enzymes between the experimental groups ($p < 0.05$), with less H3 acetylation (H3k9Ac) in breast carcinomas compared to normal breast tissue, in addition, there was lower expression of HDAC1 and HDCA2 in neoplastic breast tissues compared to normal tissue ($p < 0.05$). In contrast, HDAC6 was more expressed in neoplastic breast tissues ($p < 0.05$). There was no difference in the expression of acetylated H4 (H4K12Ac) between the groups ($p > 0.05$). Multivariate analysis showed a positive association between the expression of HDAC1 and HDAC2 and a negative association between the expression of H3K9Ac and HDAC6. In chapter three, an association was observed between low HDAC1 expression and the presence of metastasis in lymph nodes ($p = 0.035$), and high HDAC1 expression was associated with favorable prognostic factors by multivariate analysis. Still through multivariate analysis, the low expression of HDAC6 was related to low expression of Ki67 and to smaller tumors, showing a relationship with factors of better prognosis. From this study it was possible to observe epigenetic changes in breast neoplastic tissues and that there is a relationship with prognostic factors. In addition, the high expression of HDAC6 may justify the H3 hypoacetylation observed in neoplastic tissues. These results open future perspectives for new studies that confirm these changes and stimulate the development of target therapies for the treatment of mammary cancer in female dogs.

Keywords: epigenetics, canine, hypoacetylation, mammary tumor

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2- Comparação da expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas desacetilases HDACs 1, 2 e 6 em tecidos mamários caninos neoplásicos e não neoplásicos

Tabela 1. Anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica para pesquisa da expressão de histonas e histonas desacetilases em amostras de tecido mamário normal e neoplásico de cadelas.....26

Tabela 2. Variáveis clínico-patológicas observadas nos animais com carcinoma mamário simples.....30

Tabela 3. Resultado da análise multivariada exploratória de fatores, teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, da histona acetilada H3 (H3K9), histona acetilada H4 (H4K12) e das enzimas histonas desacetilases (HDAC 1,2,6) em tecido mamário normal (G1), adenoma simples (G2), carcinoma mamário simples (G3) e carcinoma mamário simples metastático (G4) de cadelas.....37

Tabela 4. Resultado da análise exploratória de fatores, ANOVA e curva ROC da histona H3 (H3K9Ac) e das enzimas desacetilases (HDAC 1,2,6) em tecidos mamários normais (G1), adenomas simples (G2), carcinomas simples (G3) e carcinomas simples metastáticos (G4) de cadelas.....40

CAPÍTULO 3- Expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em carcinomas mamários simples de cadelas

Tabela 1. Anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica para expressão de histonas acetiladas e enzimas desacetilases.....58

Tabela 2. Variáveis clínico-patológicas observadas nos animais com carcinoma mamário simples.....61

Continua...

...Continuação

Página

Tabela 3. Expressão imuno-histoquímica de H3K9Ac, H4K12Ac, HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em 61 amostras de carcinomas mamários simples de cadelas.....64

Tabela 4. Correlação entre os escores obtidos para as histonas acetiladas e enzimas desacetilases e as variáveis clínico-patológicas das amostras de carcinomas mamários simples de cadelas.....66

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1- Considerações gerais

Figura 1. Organização nucleossômica do DNA. A fita de DNA é enrolada em torno de um octâmero de subunidades de histonas e o DNA ligante é estabilizado pela histona H1 (Adaptado, Thankam et al., 2019).....07

Figura 2. A acetilação das histonas é controlada pelas enzimas histonas acetiltransferases (HAT) que adicionam grupos acetil na região N-terminal das histonas ativando a transcrição gênica por favorecer a abertura da cromatina, por sua vez, as enzimas histonas desacetilases (HDAC) são responsáveis pela desacetilação N-terminais das histonas, compactando a cromatina e causando repressão da transcrição gênica (Adaptado, Oronsky et al., 2014).....09

CAPÍTULO 2- Comparação da expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas desacetilases HDACs 1, 2 e 6 em tecidos mamários caninos neoplásicos e não neoplásicos

Figura 1. Validação da expressão proteica das histonas acetiladas (H3K9 e H4K12) e das enzimas desacetilases (HDAC1, HDAC2 e HDAC6) pela técnica de Western Blot em linfonodo canino.....31

Figura 2. Representação gráfica dos escores de marcação da H4K12Ac, H3K9Ac, HDAC1 e HDAC2 para os grupos tecido mamário normal (G1), adenoma simples (G2), carcinoma simples (G3) e carcinoma metastático (G4)

Continua...

...Continuação

Página

de cadelas. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística (p<0,05).....32

Figura 3. Fotomicrografia das marcações de histonas acetiladas e isoenzimas HDACs, bem como, os escores de marcação para cada grupo experimental. Imunomarcação predominantemente nuclear das histonas acetiladas H4K12 e H3K9 e das isoenzimas HDAC1 e HDAC2 e marcação citoplasmática da HDAC6 em tecido mamário normal (G1), adenoma mamário simples (G2) carcinoma mamário simples não metastático (G3), carcinoma mamário simples metastático (G4) de cadelas. Reação imuno-histoquímica, X400 34

Figura 4. Análise multivariada de componentes principais para cada grupo experimental, conforme associação entre a expressão das histonas acetiladas (H3K9 e H4K12) e enzimas desacetilases (HDAC1, HDAC2 e HDAC6). As cores representam os diferentes anticorpos e estão devidamente identificadas na legenda. 36

Figura 5. Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para os subgrupos A e B do grupo G3 (A) e G4 (B) em relação à associação entre imunomarcação identificada pela análise multivariada exploratória dos fatores.....38

Figura 06- Representação gráfica do ponto de corte estabelecidos pela curva ROC para o Fator 1 (A) e Fator 2 (B) baseados a análise exploratória dos fatores. Letras diferentes indicam de houve diferença estatística (p<0,05)....39

Capítulo 3- Expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em carcinomas mamários simples de cadelas

Figura 1. Validação da expressão proteica das histonas acetiladas (H3K9Ac e H4K12Ac) e das enzimas desacetilases (HDAC1, HDAC2 e HDAC6) pela técnica de Western Blot em linfonodo canino.....62

Figura 2. Coloração imuno-histoquímica das histonas acetiladas e enzimas desacetilases (HDACs) em carcinomas simples (× 400). (A) H3K9Ac, (B) H4K12Ac, (C) HDAC1, (D) HDAC2 e (E) Ki67 foram expressos nos núcleos das células tumorais. A coloração para (F) HDAC6 foi observada predominantemente no citoplasma.....63

Figura 3. - Análise estatística das variáveis clínico-patológicas e tempo de sobrevida global de cadelas portadoras de carcinomas mamários simples pelo método de Kaplan-Meier.....67

Figura 4. Resultado de expressão das histonas acetiladas e enzimas desacetilases em relação ao tempo de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier.....68

Figura 5. Análise de correspondência multivariada das associações entre a expressão das histonas acetiladas (H3K9Ac e H4K12Ac) e das enzimas desacetilases (HDAC 1, 2 e 6) e as variáveis clínico-patológicas em carcinomas mamários simples de cadelas.....69

CAPÍTULO 1- Considerações gerais

1.Revisão de literatura

1.1 Introdução

O cão tem figurado como um modelo experimental para várias doenças humanas, inclusive as neoplasias malignas, tornando-os uma espécie atraente como modelo para a investigação do câncer (Lindblad-Toh et al., 2005; Ranieri et al., 2013), há semelhança com as mulheres, porém com uma incidência até três vezes maior em se tratando de neoplasias mamárias (Shafiee et al., 2013). Nas fêmeas caninas adultas e inteiras, as neoplasias mamárias espontâneas são as mais frequentes, sendo 60% destas malignas. Assim, nas últimas décadas as neoplasias mamárias caninas são alvo de muitas pesquisas em medicina veterinária (Brodey et al., 1983; Rodaski e Piekarz, 2008; Peña et al., 2014).

Cadelas com neoplasias mamárias malignas possuem uma sobrevida significativamente curta, quando comparadas àquelas com neoplasias benignas. Uma causa comum de mortalidade por esta enfermidade, tanto nas mulheres quanto nas cadelas, deve-se ao aparecimento de novos tumores e às metástases do tumor primário, principalmente para linfonodos regionais, pulmões, fígado, baço, entre outros órgãos (De Nardi et al., 2008; Klopfleisch e Gruber, 2009).

A sobrevida de dois anos de cadelas com neoplasias mamarias malignas é variável e pode ser influenciada por vários fatores dependendo do tipo e grau histológico do tumor, presença de metástases regionais ou à distância, estágio da doença e tratamento utilizado (Sorenmo, 2003; Sorenmo et al., 2020). Todavia, é sabido que pacientes com neoplasias que possuem o mesmo tipo, grau histológico e

estadiamento nem sempre apresentam a mesma evolução da doença (Eisenberg e Koifman, 2001).

O tratamento inclui, primeiramente, a retirada cirúrgica do tumor que apresenta abordagens diferenciadas, de acordo com cada caso. Entretanto, alguns animais irão se beneficiar de tratamentos adjuvantes com quimioterapia e outros medicamentos, a fim de evitar recidivas e metástases distantes. Nem sempre a evolução do tumor mamário é favorável, mesmo com abordagens mais agressivas de tratamento. O que sugere que outros mecanismos ainda pouco conhecidos possam estar relacionados ao prognóstico e resposta ao tratamento nessas pacientes (Cassali et al., 2014; Sorenmo et al., 2020).

Recentes estudos apontam mecanismos epigenéticos no desenvolvimento do câncer (Wittenburg et al., 2011; Ferraresso et al., 2014; Eckschlager et al., 2017). A epigenética foi definida como uma disciplina há mais de 50 anos e originalmente descreveu alterações no desenvolvimento de organismos que não podiam ser explicadas por mutações no DNA (Huang et al., 2011). As modificações epigenéticas são descritas como alterações hereditárias na expressão gênica, no entanto, sem haver modificação na sequência de DNA. Os padrões epigenéticos podem sofrer influências ambientais, de tal forma que modificações fenotípicas podem ser transmitidas para os descendentes (Feinberg, 2001).

Nos últimos anos ficou clara a influência dessas modificações no desenvolvimento das neoplasias (Momparler, 2003; Guerriero et al., 2017). Modificações químicas das histonas como acetilação e metilação, assim como metilação do DNA são eventos epigenéticos amplamente implicados no desenvolvimento e progressão do câncer, potencialmente reversíveis com

tratamentos medicamentosos, desta forma melhoram o prognóstico do paciente (Kristensen et al, 2009).

Predizer a resposta de um tumor a uma determinada terapia deve ser prioridade na pesquisa oncológica (Marquard et al, 2008). O entendimento de todas essas alterações epigenéticas e sua contribuição para a tumorigênese da mama é muito importante para o progresso no campo do diagnóstico, prognóstico e terapia do câncer de mama de humanos e animais. Existe, portanto, uma necessidade premente de entender o genoma funcional, isto é, as mudanças definidas pelos mecanismos reguladores que cobrem a estrutura genética (Jovanovi et al., 2010).

Este estudo foi concebido com o intuito de identificar possíveis modificações epigenéticas em tumores mamários caninos, e avaliar o padrão de acetilação das histonas H4 e H3 e correlacionar com a expressão das enzimas HDAC1, 2 e 6 nos tecidos mamários caninos, buscando implicações dessas com a severidade e evolução da doença, e com o prognóstico, por meio da avaliação do tempo de sobrevida global das pacientes.

Conclusão

Em conclusão podemos ressaltar que existem diferenças entre a expressão das histonas e enzimas desacetilases em tecidos mamários normais e neoplásicos de mamas de cadelas, com uma maior evidência em neoplasias malignas. Os resultados encontrados dão suporte a novas pesquisas para o emprego de terapias alvo moleculares para HDACs de classe II em tumores mamários em cadelas. Ademais, o estudo representou um passo importante para compreensão das alterações epigenéticas envolvendo acetilação de histonas e enzimas desacetilases em neoplasia mamária de cadelas.

6. Declaração de disponibilidade de dados

Os dados que sustentam as conclusões deste estudo estão disponíveis com o autor, mediante solicitação pertinente.

7. Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Cavalcanti MF, Cassali G, Cardoso S, et al. Fatores prognósticos na abordagem clınica e histopatológica dos carcinomas mamários de cadelas: estadiamento TNM e sistema de Nottingham [MS thesis]. *Prática Hospitalar*. 2006;8(44):97-97.

Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*. 2000;103(2):263-271.

De Matos AJF, Lopes CCC, Faustino AMR, et al. MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. *Anticancer research*, v. 26, n. 3A, p. 1821-1826, 2006.

Derr RS, van Hoesel AQ, Benard A, et al. High nuclear expression levels of histone-modifying enzymes LSD1, HDAC2 and SIRT1 in tumor cells correlate with decreased survival and increased relapse in breast cancer patients. *BMC câncer*. 2014;14(1):604.

Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(7):1414.

Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer research*. 2009;69(9):3802-3809.

Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer research*. 2009;69(9):3802-3809.

Elston CW, Ellis IO. Assessment of histological grade. *The breast*. 1998;13:356-384.

Eto S, Saeki K, Yoshitake R, et al. Anti-tumor effects of the histone deacetylase inhibitor vorinostat on canine urothelial carcinoma cells. *PloS one*. 2019;14(6).

Fang C, Jian ZY, Shen XF, et al. Promoter methylation of the retinoic acid receptor beta2 (RARβ2) is associated with increased risk of breast cancer: A prisma compliant meta-analysis. *PloS one*. 2015;10(10).

Ferreira, E., Bertagnolli, A. C., Cavalcanti, M. F., Schmitt, F. C., & Cassali, G. D. (2009). The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. Veterinary and Comparative Oncology, 7(4), 230-235.

Fraga M, Ballestar E, Villar-Garea BM, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics*. 2005;37:391-400.

Gizinski S, Boryczko Z, Katkiewicz M, et al. Bialko Ki-67 jako wskaznik prognostyczny w nowotworach gruczolu mlekowego u suk. *Medycyna Weterynaryjna*.2003;59(10):888-891.

Guerriero JL, Sotayo A, Ponichtera HE, et al. Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages. *Nature*. 2017;543(7645):428-432.

Hou H, Zhao L, Chen W, et al. Expression and significance of cortactin and HDAC 6 in human prostatic foamy gland carcinoma. *International journal of experimental pathology*. 2015;96(4):248-254.

Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001;293(5532):1074-1080.

Jones PA, Issa JPJ, Baylin. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nature Reviews Genetics*. 2016;17(10):630.

Kadthur JC, Rao S, Sonnahallipura BM, et al. Prognostic Value of Ki 67 Proliferation Antigen in Canine Malignant Mammary Gland Tumours. *Braz J Vet Pathol*. 2011;4(1):36-40.

Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. Cell. 2007;128(4):693-705.

Krusche CA, Wülfing P et al. Histone deacetylase-1 and-3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2005;90(1):15-23.

Lansigan, F, Foss F. Current and Emerging Treatment Strategies for Cutaneous T-cell Lymphoma. *Drugs*. 2010;70(3):273-286.

Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. Nature. 2005;438(7069):803-819.

Lu Z, Zou J, Li S, et al. Epigenetic therapy inhibits metastases by disrupting premetastatic niches. *Nature*. 2020;579(7798):284-290.

Misdorp W. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. *World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals second series*. 1999;7: 1-59.

Moufarrij S, Srivastava A, Gomez S, et al. Combining DNMT and HDAC6 inhibitors increases anti-tumor immune signaling and decreases tumor burden in ovarian cancer. *Scientific reports*. 2020;10(1):1-12.

Müller BM, Jana L, Kasajima A, et al. Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer-overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC câncer*. 2013;13(1):215.

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

Murahari S, Jalkanen AL, Kulp SK, et al.. Sensitivity of osteosarcoma cells to HDAC inhibitor AR-42 mediated apoptosis. *BMC cancer*. 2017;17(1):67.

Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T, et al. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncology reports*. 2007;18(4):769-774.

Nowak, M., Madej, J. A., Pula, B., Dziegiel, P., & Ciaputa, R. (2015). Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), E-cadherin and Ki-67 in metastatic and non-metastatic canine mammary carcinomas. *Irish veterinary journal*, 69(1), 9.

Oronsky B, Oronsky N, Scicinski J, et al. Rewriting the epigenetic code for tumor resensitization: a review. *Translational oncology*. 2014;7(5):626-631.

Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, et al. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*. 2005;122(4):517-527.

Qiao W, Liu H, Liu R, et al. Prognostic and clinical significance of histone deacetylase 1 expression in breast cancer: A meta-analysis. *Clinica chimica acta*. 2018;483:209-215.

Ranieri G, Gadaleta CD, Patruno, R et al. A model of study for human cancer: Spontaneous occurring tumors in dogs. Biological features and translation for new anticancer therapies. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2013;88(1):187-197.

Rasotto R, Berlato D, Goldschmidt MH, Zappulli, V. Prognostic significance of canine mammary tumor histologic subtypes: an observational cohort study of 229 cases. *Veterinary pathology*. 2017;54(4):571-578.

Santos AA, Lopes CC, Ribeiro, JR, et al. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Veterinary Research*. 213;9(1):1.

Seo J, Min SK, Park HR., et al. Expression of histone deacetylases HDAC1, HDAC2, HDAC3, and HDAC6 in invasive ductal carcinomas of the breast. *Journal of breast cancer*. 2014;17(4):323-331.

Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014;6(4):a018713.

Shafiee R, Javanbakht J, Atyabi N et al. Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytohistopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. *Cancer Cell International*. 2013;13:79.

Sierra OR, Santilli J, Anai LA 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* 2018; 30: 263–267

Sierra, OMR. Evaluation of acetylated histones 3 and 4 and histone deacetylases 1, 2 and 6 in cutaneous t-cell lymphoma in dogs. 2019. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária na área

de Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2019. Disponível em: < https://repositorio.unesp.br/handle/11449/191235>. Acesso em: 27-01-2020.

Sorenmo, K. Canine mammary gland tumors. Veterinary Clinics: Small Animal Practice. 2003;33(3): 573-596.

Sorenmo KV, Workey RD, Zappulli V .Tumors of the mammary gland. In: Withrow SJ, Vail DM, Thamm D, Liptak J, Page, R. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology-E-Book. Elsevier Health Sciences, Inc;2020:604-615.

Suzuki J, Chen YY, Scott GK, et al. Protein acetylation and histone deacetylase expression associated with malignant breast cancer progression. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(9):3163-3171.

Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*.1996;272(5260):408-411.

Uehara N, Yoshizawa K, Tsubura A. Vorinostat enhances protein stability of p27 and p21 through negative regulation of Skp2 and Cks1 in human breast cancer cells. *Oncology reports*. 2012;28(1): 105-110.

Webber LP, Wagner VP, Curra M, et al. Hypoacetylation of acetyl-histone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer. *Histopathology*. 2017;71(2):278-286.

Weichert W. Expressão de HDAC e prognóstico clínico em neoplasias malignas humanas. *Cartas de câncer*. 2009;280 (2):168-176.

Withers SS, Skorupski KA, York D, et al. Association of macrophage and lymphocyte infiltration with outcome in canine osteosarcoma. *Veterinary and comparative oncology*. 2019;17(1):49-60.

Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene.* 2007;26(37):5541-5552.

Yamagami, T, Kobayashi T, Takahashi K, Sugiyama, M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. Journal of Veterinary Medical *Science*. 1996;58(11):1079-1083.

Zhang X, Zhang X, Yuan B, et al. Subchronic toxicities of HZ1006, a hydroxamate-based histone deacetylase inhibitor, in beagle dogs and sprague-dawley rats. *International journal of environmental research and public health*. 2016;13(12):1190.

Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, et a. HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. Clinical Cancer Research. 2004;10(20):6962-6968.

Zhao H, Yu Z, Zhao L, et al. HDAC2 overexpression is a poor prognostic factor of breast cancer patients with increased multidrug resistance-associated protein expression who received anthracyclines therapy. Japanese journal of clinical oncology. 2016;46(10):893-902.